

USO DA TÉCNICA METABARCODE PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS
INTESTINAIS DE *MELIPONA SCUTELLARIS* (APIDAE: MELIPONINI)

por

DAYANA ROSALINA DE SOUSA

(Sob Orientação do Professor Valdir Queiroz Balbino -UFPE)

RESUMO

Membro da Tribo Meliponini, *Melipona scutellaris* é originalmente restrita ao nordeste brasileiro. Atualmente, é possível encontrar essa espécie sendo criada no sudeste e sul do país, isso devido principalmente à sua produtividade e qualidade do seu mel, e à translocação feita por criadores. É uma das abelhas mais criadas na Região Nordeste por pequenas famílias que comercializam o mel, saburá (pólen) e geoprópolis, e é uma importante polinizadora para a mata nativa e diversas culturas comerciais. Estudos direcionados à composição da microbiota de Meliponini são raros e ainda não permitem que possamos generalizar padrões de sua importância e influência nesses polinizadores. Bactérias e fungos comprovadamente desempenham papéis de grande relevância no seu sistema digestivo. Esses microrganismos atuam no processo de nutrição, ajudam no sistema imunológico combatendo patógenos, dentre outras funções que beneficiam as abelhas. Portanto, a caracterização de bactérias e fungos presentes no intestino de *M. scutellaris* abre um leque de informações a respeito da saúde, alimentação e adaptação dessas abelhas, podendo ser utilizado como modelo para outras espécies da tribo. Uma das ferramentas com melhor desempenho atualmente para caracterização de comunidade microbiana é a técnica “metabarcoding”. Através do sequenciamento de regiões do gene 16S e ITS é possível identificar bactérias e fungos, respectivamente, em grande escala e conhecer a identidade dos microrganismos presentes no intestino das abelhas. Nesse

trabalho descrevemos a microbiota dessa importante espécie e discutimos os impactos na saúde e manutenção colonial. O sistema digestivo de *M. scutellarias* foi dominado principalmente pelos gêneros bacterianos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Floricoccus*, *Bombella*, *Pectinatus* e *Fruticobacillus* e *Snodgrassella* e fúngicos *Starmerella*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Malassezia*, *Lachancea*, *Aspergillus*, *Sterigmatomyces* e *Meyerozyma*. E apresentamos dados importantes a respeito da diferenciação na composição microbiana das abelhas das três ecorregiões coletadas.

PALAVRAS-CHAVE: Microbiota, 16S, ITS, Abelha sem ferrão, Bioinformática.

USE OF THE METABARCODING TOOL FOR IDENTIFICATION OF FUNGI AND
BACTERIA OF *MELIPONA SCUTELLARIS* (APIDAE: MELIPONINI) GUT

por

DAYANA ROSALINA DE SOUSA

(Sob Orientação do Professor Valdir Queiroz Balbino)

ABSTRACT

Member of the Meliponini tribe, *Melipona scutellaris* is originally restricted to the northeastern region of Brazil, but nowadays it is possible to find this species being raised in Brazil's southeast and south region, mainly due to its productivity, quality of honey and the translocation made by breeders. It is one of the most raised bees in the northeast region by small family farms that produce and sell honey, mainly saburá (pollen) and geopropolis. Also, it is an important pollinator for native forest and several commercial crops. The composition of the microbiota of Meliponini, is poorly studied and still do not allow us to generalize patterns of its importance and influence on these pollinators. Bacteria and fungi have proven to play important roles in bee digestive system. These microorganisms act in the nutrition process, help in the immune system by fighting pathogens, among other functions that benefit the bees. The bacterial and fungal communities are also affected by stresses from diseases and insecticide poisoning, indicating disturbances in the colony. Therefore, the characterization of bacteria and fungi present in the gut of *M. scutellaris* opens a range of information about the health, nutrition, and adaptation of these bees, and can be used as a model for other species of the tribe. One of the best performing tools currently for microbial community characterization is the metabarcoding tool. Through the sequencing of 16S and ITS gene regions it is possible to identify bacteria and fungi, respectively, in large scale and to know the identity of microorganisms present in the gut of bees. In this work we aimed to describe the

microbiota of this important species and discuss the impacts on colonial health and maintenance. The digestive system of *M. scutellarias* was dominated mainly by the bacterial genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Floricoccus*, *Bombella*, *Pectinatus*, *Fruticobacillus* and *Snodgrassella* and fungal *Starmerella*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Malassezia*, *Lachancea*, *Aspergillus*, *Sterigmatomyces* and *Meyerozyma*. We present important data regarding the differentiation in the microbial composition of bees from the three ecoregions collected.

KEY WORDS: Microbiota, 16S, ITS, Stingless bee, Bioinformatics.

USO DA FERRAMENTA METABARCODE PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS E
BACTÉRIAS INTESTINAIS DE *MELIPONA SCUTELLARIS* (APIDAE: MELIPONINI)

por

DAYANA ROSALINA DE SOUSA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Entomologia.

RECIFE - PE

Dezembro – 2021

USO DA FERRAMENTA METABARCODE PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS E
BACTÉRIAS INTESTINAIS DE *MELIPONA SCUTELLARIS* (APIDAE: MELIPONINI)

por

DAYANA ROSALINA DE SOUSA

Comitê de Orientação:

Valdir Queiroz Balbino – UFPE

Airton Torres Carvalho – UFERSA

USO DA FERRAMENTA METABARCODE PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS E
BACTÉRIAS INTESTINAIS DE *MELIPONA SCUTELLARIS* (APIDAE: MELIPONINI)

por

DAYANA ROSALINA DE SOUSA

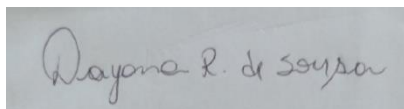
Banca Examinadora:

Maria Imaculada Zucchi – USP/Esalq

Karen Luisa Haag – UFRGS

Wilson José da Silva Junior – Hospital Albert Einstein

José Dijair Antonino de Souza Junior – UFRPE



Dayana Rosalina de Sousa
Doutora em Entomologia



Prof. Valdir Queiroz Balbino – UFPE
Orientador

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

S725u Sousa, Dayana Rosalina de
 Uso da técnica metabarcoding para identificação de fungos e bactérias intestinais de *Melipona scutellaris*
(Apidae:Meliponini) / Dayana Rosalina de Sousa. - 2021.
 130 f. : il.

 Orientador: Valdir Queiroz Balbino.
 Coorientador: Airton Torres Carvalho.
 Inclui referências.

 Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Entomologia
Agrícola, Recife, 2022.

 1. Microbiota. 2. Abelha sem ferrão. 3. Bioinformática. 4. 16S. 5. ITS. I. Balbino, Valdir Queiroz, orient. II.
Carvalho, Airton Torres, coorient. III. Título

CDD 632.7

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia por terem me recebido e contribuído com meu conhecimento. A CAPES pela concessão da bolsa, ao CNPq pelo financiamento do projeto.

Agradeço ao meu orientador Valdir Balbino e co-orientador Airton Torres por terem aceitado a missão de me encaminhar e orientar durante o doutorado, por terem oferecido subsídio e base para que o presente trabalho se concretizasse.

Agradeço também a professora Karen Haag pelas dicas, discussões proveitosas e fornecimento de material para meu trabalho e conhecimento.

Agradeço aos meus colegas de trabalho que tiveram um grande papel e foram de grande ajuda para que eu pudesse concluir minha tese, dentre eles destaco Marcos Regueira, Wilson Junior e Caio Andrey que me apoiaram, incentivaram e me ensinaram coisas que jamais imaginava que poderia aprender e fazer, além deles, Heide Lacerda e Bruno que fazem parte do time do sequenciamento, e Lilian pela coleta de material. Aos colegas de pós-graduação, aos colegas do LABBE que me receberam de braços abertos, com muito café e risadas.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte da minha formação dentro do programa de Pós-Graduação em Entomologia, e todos aqueles que os antecederam.

Fica aqui minha gratidão aos meus amigos que sempre me apoiaram e que de alguma forma contribuíram através da revisão dos meus textos, dicas de escrita, incentivo, conversas e parcerias nas horas de descontração. Agradeço a família Recifense que construí.

Agradeço as pessoas mais importantes, minha família, especialmente minha mãe Luzia, tia Te, Vó Maria, irmã Daniella, minha linda sobrinha Maria e prima Gislaine, que me amparam sempre e me trazem amor. Graças a essas mulheres incríveis na minha vida, sigo em frente lutando sempre pelo melhor.

E por fim agradeço a Ciência, e todos aqueles que fazem ciência, dedicam sua vida a pesquisa, que acreditam e carregam essa árdua tarefa ainda mais nesses tempos tão difíceis.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	viii
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS GERAIS DAS ABELHAS	1
1.2 ASPECTOS GERAIS DA TRIBO MELIPONINI E GENERO <i>MELIPONA</i>	4
1.3 <i>MELIPONA SCUTELLARIS</i>	9
1.4 MICROBIOTA BACTERIANA DE ABELHA	12
1.5 MICROBIOTA FUNGICA (MICOBiota) DE ABELHA.....	17
1.6 METABARCODE (METABARCODING).....	20
LITERATURA CITADA.....	23
2 IDENTIFICAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA INTESTINAL DE <i>MELIPONA SCUTELLARIS</i> PARA TRÊS ECORREGIÕES DISTINTAS NO BRASIL COM BASE EM DADOS METABARCODE DO GENE 16S	42
RESUMO	43
ABSTRACT	44
INTRODUÇÃO	45
MATERIAL E MÉTODOS	47
RESULTADOS.....	50
DISCUSSÃO.....	54

	AGRADECIMENTOS.....	63
	LITERATURA CITADA.....	63
3	CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE FUNGICA DO INTESTINO DE <i>MELIPONA SCUTELLARIS</i> DE TRÊS ECORREGIÕES DISTINTAS DO BRASIL COM BASE EM DADOS METABARCODE DO GENE ITS	81
	RESUMO	82
	ABSTRACT	83
	INTRODUÇÃO	84
	MATERIAL E MÉTODOS	86
	RESULTADOS	89
	DISCUSSÃO.....	90
	AGRADECIMENTOS.....	98
	LITERATURA CITADA.....	98
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	115

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS DAS ABELHAS

Abelhas são insetos holometábolos e apresentam o sistema de determinação sexual haplodiploide. Morfologicamente, apresentam aparelho bucal do tipo lambedor, corpo com cerdas plumosas e ramificadas. Além disso, as abelhas da família Apidae, apresentam uma estrutura na perna traseira, denominada corbícula, onde armazenam o pólen coletado na flor e transportam para dentro da colônia. Estas características tornam as abelhas eficientes polinizadores, uma vez que estas estruturas morfológicas facilitam a aderência e transferência de pólen entre as diferentes plantas visitadas (Wille 1979, Heard 1999, Michener 2000) Estão classificadas dentro da superfamília Apoidea, dividida em 7 famílias que são: Stenotritidae, Colletidae, Andrenidae), Halictidae, Melittidae, Megachilidae e Apidae (GBIF 2019; Michener 2000), divididas em subfamílias e tribos, apresentam 443 gêneros (Michener 2000).

A família Apidae, composta pelas tribos Apini e Meliponini, encontra-se presente em todos os continentes, exceto Antártica, em virtude de sua grande diversidade de comportamento, hábitos e preferências por habitats (GBIF 2020, Michener 2000). Os Meliponini, por sua vez, apresentam sua distribuição restrita às regiões tropicais e subtropicais do globo. A bioecologia das diferentes espécies de abelhas é bem diversa, diferindo desde o tempo de desenvolvimento de larva, pupa e adultos; até a quantidade de rainhas por ninho; temperatura de desenvolvimento; arquitetura do ninho; preferências florais; comportamento de limpeza e acasalamento; tipo de colônia e comportamento social (Kerr 1948, Wille & Michener, 1973, Michener 2000).

As abelhas apresentam hábitos que vão desde solitário ao eussocial, (Michener, 1974; Wilson & Hölldobler 2005). Contudo, de um extremo (solitário) ao outro (eussocial), existem comportamentos intermediários como o subsocial, comunal, quasessocial e o semissocial, que vão agregando características até chegar eussocialidade, ou sociedade verdadeira (Michener 2000).

As abelhas eussociais provisionam alimento para suas crias, apresentam castas reprodutivas, divisão de tarefas conforme a idade das operárias, sobreposição de gerações e cuidado cooperativo da prole (Michener 1969, Wilson & Hölldobler 2005, Hartfelder *et al.* 2006). Somente duas tribos apresentam esses aspectos: Apini (abelhas melíferas) e Meliponini (abelhas sem ferrão) (Michener 1974, Imperatriz-Fonseca *et al.* 2017). De modo contrário às abelhas eussociais, as abelhas solitárias não apresentam esta divisão etária, já que vivem sozinhas no ninho e cada abelha fêmea é responsável pela sua própria prole, obtenção de alimento e normalmente sem contato entre gerações (Michener 2000, Wittwer *et al.* 2017).

Nas abelhas eussociais a divisão de trabalho se dá de acordo com a idade, caracterizando a divisão etária do trabalho. Desta forma, abelhas recém-emergidas e mais jovens permanecem no interior da colônia realizando tarefas geralmente relacionadas ao ninho, como limpeza da colônia, alimentação da prole e produção de cera (Kerr 1948, Michener 1974, Kerr *et al.* 1996, Nogueira-Neto 1997). À medida que as abelhas vão se tornando mais velhas, as tarefas tornam-se externas à colônia e, geralmente, iniciam o forrageamento na busca de pólen e néctar (Kerr 1948, Michener 1974, Kerr *et al.* 1996, Nogueira-Neto 1997). Já a rainha, por sua vez, desempenha o papel principal de reprodução, sendo essa a única a reproduzir dentro da colônia e sai somente para acasalar ainda enquanto jovem (Michener 1974, Kerr *et al.* 1996, Nogueira-Neto 1997, Santos & Cruz-Landim 2002). No caso dos meliponíneos, a rainha realiza o voo nupcial somente uma vez durante toda a sua vida e com um único macho, enquanto a rainha de abelhas melíferas pode acasalar com diversos machos (Kerr 1948, Kerr *et al.* 1996, Imperatriz-Fonseca *et al.* 2017).

As diferenças entre as castas dentro da colônia de abelhas eussociais são refletidas também na morfologia de seus indivíduos. Enquanto a rainha apresenta abdômen largo, em virtude de sua condição fisiogástrica, as abelhas operárias são menores e possuem estruturas nas pernas que possibilitam a coleta de pólen, denominadas corbícula. Machos, embora não formem uma casta, são comuns na época de enxameação e normalmente produzidos somente poucos meses por ano (Koedam 2017).

Diversos insetos contribuem para polinização, porém as abelhas se destacam prontamente nesse exercício (Giannini *et al.* 2015, IPBS 2016, BPBES 2019) devido as suas características morfológicas que incluem estruturas especializadas para coletar e carregar pólen e néctar – principais fontes de proteínas e carboidratos desde a fase larval das abelhas, até a fase adulta (Nogueira-Neto 1997, Nicolson 2011, Feás *et al.* 2012, da Silva *et al.* 2014, Mohammad *et al.* 2021). Durante visitas, nas mais diversas flores, o pólen se desprende das abelhas e chaga ao estigma de outras flores, fertilizando-as.

Apesar de diversos insetos serem de extrema importância para polinização, são as abelhas as principais responsáveis pela polinização de culturas de cunho econômico. Estima-se que 75% das culturas agrícolas que se beneficiam da polinização, são polinizadas por abelhas (Klein *et al.* 2007). Apesar de uma longa lista de espécies de abelhas existentes em todo o mundo, *A. mellifera* com certeza ainda é a espécie mais difundida, estudada e utilizada para fins lucrativos, por ser uma espécie generalista, de conhecido manejo e fácil aclimação (Klein *et al.* 2007, Kleijn *et al.* 2015, Klein *et al.* 2018). Porém espécies nativas contribuem significativamente para esse serviço ecossistêmico (Garibaldi *et al.* 2016, Klein *et al.* 2018).

Além do serviço ecossistêmico de regulação gerado pelas abelhas, elas oferecem ainda serviços de provisão e cultural através do meio de subsistência de apicultores e meliponicultores. O uso dos produtos gerados por sua criação e exploração, como mel, cera, resina, entre outros para

72 rituais religiosos, medicina popular e artesanato são muito disseminados desde a pré-história (Jaffé
73 *et al.* 2013, Maia *et al.* 2015, Quezada-Euán *et al.* 2018). Desta forma, nota-se extensão da
74 notoriedade desses insetos para o homem, e o juízo que se deve ter com esses insetos, o que leva a
75 elevada preocupação da conservação desses pequenos animais (IBPES 2016, Potts *et al.* 2016, Klein
76 *et al.* 2018, Quezada-Euán *et al.* 2018).

77 Embora seja reconhecido que as abelhas possuam papel fundamental na manutenção de
78 ecossistemas e na provisão de alimento, as ameaças a sua sobrevivência são prementes em virtude,
79 principalmente, das rápidas alterações climáticas, aliadas à perda e fragmentação de habitat, uso de
80 pesticidas, bem como as ameaças provenientes de parasitas e patógenos (Morandin *et al.* 2005,
81 Brown & Paxton, 2009, Winfree *et al.* 2009, Winfree 2010, Hanley *et al.* 2015, Maia-Silva *et al.*
82 2015, Giannini *et al.* 2017, Rêgo *et al.* 2017).

83 Estes fatores são acentuados quando levado em consideração a associação dos impactos de
84 espécies invasoras sob espécies nativas, tendo em vista que abelhas introduzidas competem por
85 recursos e são potenciais hospedeiras e propagadoras de doenças infecciosas emergentes (Thomson
86 2006, Inoue *et al.* 2008, Morales *et al.* 2013, Barbosa *et al.* 2015). Doenças em abelhas são causadas
87 por diversos organismos como vírus, fungos, bactérias e nematóides e esse tema será um pouco
88 mais explorado em tópico a seguir.

90 **1.2. ASPECTOS GERAIS DA TRIBO MELIPONINI E GÊNERO MELIPONA**

91 As abelhas sem ferrão, também conhecidas como abelhas nativas ou indígenas, pertencentes
92 à tribo Meliponini, são amplamente distribuídas na região tropical e subtropical do globo, com cetro
93 de diversidade a região Neotropical s (Camargo & Pedro 1992, Zanella & Martins 2003, Pedro
94 2014). Segundo Michener (2013) as espécies desse grupo se distinguem das outras abelhas pela

falta ou quase inaparentes veias cruzadas submarginais e da segunda veia recorrente nas asas anteriores comparada a outras veias.

O Brasil possui quase a metade das 516 espécies de abelhas sem ferrão descritas no mundo (Ascher & Pickering, 2019). A diversidade de espécies é refletida nas muitas diferenças interespecíficas, como, por exemplo, o tamanho do corpo, o raio de ação, as estratégias de forrageamento e as preferências florais (Kerr 1948, Michener 1974, Nascimento & Nascimento 2012, Oliveira *et al.* 2013, Silva *et al.* 2013).

A origem da tribo Meliponini está datada no Mesozoico e se agrupa com a tribo Bombini em análises moleculares (Ramirez *et al.* 2010, Rasmussen & Cameron 2010, Bossert *et al.* 2019). O gênero *Melipona* tem seu ponto de partida no Mioceno, apesar de haver ainda uma divergência entre os trabalhos de Rasmussen & Cameron (2010) e Ramirez *et al.* (2010) a respeito da idade certa que o gênero surgiu nesse período. Dentro da Tribo Meliponini, segundo o catálogo de abelhas Moure, são reconhecidos 33 gêneros exclusivos da região Neotropical, incluindo o gênero *Melipona* que ocorre exclusivamente nessa região. Essas espécies por sua vez formam um clado bem sustentado nas análises filogenéticas, enquanto as outras espécies da tribo se dividem em mais dois clados que são um Afrotropical e Indo-Malaio/Australiano (Rasmussen & Cameron 2010). Porto & Almeida (2021) através de análises morfológicas e filogenéticas sugere que Meliponini é grupo irmão de Apini e não de Bombini.

Dentro da tribo os gêneros que mais se destacam em termos de número de espécie são *Trigona*, *Plebeia*, *Scaptotrigona*, *Trigonisca* e *Melipona* que é representado por 74 espécies, das quais 40 ocorrem no Brasil (Camargo & Vit 2003, Ramírez *et al.* 2010, Pedro 2014, Lavinhas *et al.* 2019). As abelhas sem ferrão, assim como *Apis* sp., são eussociais, porém podem apresentar marcantes diferenças no estilo de vida e comportamento. Apresentam ninhos perenes compostos por uma rainha-mãe e centenas a milhares de operárias (Michener 1974, Wille 1983). Devido sua

baixa capacidade de dispersão, a incapacidade de a rainha voar e a dependência da colmeia-filha em relação a colônia-mãe para se manter até conseguir se estabelecer, a busca por novos locais de nidificação são bem diferentes quando comparado com o processo de enxameação de *A. mellifera*. (Michener 1974, van Veen & Sommeijer 2000, Batista *et al.* 2003, Araújo *et al.* 2004). Além disso, nas abelhas sociais nativas, este processo é pouco frequente.

Os locais de nidificação das abelhas sem ferrão são variados (Wille & Michener 1973, Siqueira *et al.* 2007, Barbosa *et al.* 2013), apesar da maioria das espécies utilizarem cavidades pré-existent, principalmente em troncos de árvores, como é o caso da maioria das espécies de *Melipona* (Alves *et al.* 2009b, Cortopassi-Laurino *et al.* 2009). A maioria das espécies desse gênero habita florestas úmidas, com a maior diversidade de espécies concentradas na Bacia Amazônica (Brosi *et al.* 2008). Este grupo faz uso dessa vegetação para nidificar. Do mesmo modo, na caatinga, *Melipona subnitida* também utiliza os troncos de árvores, principalmente vivas para estabelecer suas colônias (Kerr *et al.* 1996, Nogueira-Neto 1997, Camargo & Pedro 2003, Michener 2007, Pedro 2014).

Outra característica das importante dos meliponíneos é a arquitetura dos ninhos, suas células de crias, potes de alimento (mel e pólen) construídos horizontalmente (Camargo 1970, Wille & Michener 1973). As células de crias são arredondadas e separadas dos potes de mel e pólen e muitas vezes essa separação é feita por um invólucro (finas lâminas de cerume) que tem a função de ajudar na manutenção da temperatura do ninho. Células de cria são agrupadas em favos (*Melipona*) ou em cachos dependendo da espécie (Camargo & Pedro 2003, Villas-Bôas 2012, Oliveira *et al.* 2013).

Os potes para armazenar o alimento tem a forma oval ou arredondada construídas com cerume (mistura de cera e própolis), mesmo material utilizado para a construção das células de cria. Espécies do gênero *Melipona* utilizam barro e argila que, quando misturados com própolis, formam o geoprópolis, que será utilizado para vedar o ninho e delimitar o espaço da colônia, e serve ainda

como um sistema de defesa contra microrganismos patogênicos (Wille 1983, Nogueira-Neto 1997, da Cunha *et al.* 2013).

Na maioria das espécies abelhas sem ferrão, a determinação da casta é alimentar e baseada na quantidade de alimento que cada célula recebe. No caso de *Scaptotrigona postica* e *Tetragona clavipes* (Kerr 1948, Santos & Cruz-Landim 2002, Luna-Lucena *et al.* 2019), há a formação de realeiras (células de tamanhos diferentes) o que proporciona a maior quantidade de alimento. Há gêneros como *Frieseomellita* e *Leurotrigona*, em que as células de cria são todas do mesmo tamanho e as larvas que darão origem a rainha, invadem a célula vizinha, matam a larva presente nela e comem o alimento da célula atacada (Ribeiro *et al.* 2006). Já no gênero *Melipona* essa diferenciação é genético/ alimentar, e as células de crias são do mesmo tamanho, tanto para as larvas que formarão operárias, quanto para as rainhas (Kerr 1948).

As células de cria recebem todo alimento necessário para a larva de uma única vez, esse tipo de alimentação é chamado de massiva. Assim, antes da rainha ovipositar, as operárias enchem as células com alimento, e após a postura dos ovos essas células são totalmente vedadas e permanecem assim até o momento de o adulto emergir (Kerr 1948, Sakagami 1965, Roubik 2006).

Outra característica das espécies do gênero *Melipona* é o fato de serem as únicas abelhas eussociais que realiza “*buzz polination*” ou polinização por vibração, despreendendo o pólen das flores de anteras poricidas (Fidalgo & Kleinert 2009, Nunes-Silva *et al.* 2010, Rosi-Denadai *et al.* 2018, Vallejo-Marín 2019). Espécies da família Solanaceae, como tomate e berinjela, são bons exemplos de plantas com anteras poricidas e polinizadas com sucesso por abelhas do gênero (Bispo dos Santos *et al.* 2009, Nunes-Silva *et al.* 2013).

Klein *et al.* 2020 cita várias espécies de *Melipona* como importantes visitantes florais ou polinizadores de diversas espécies agrícolas como abobrinha, açaí, algodão, caju, feijão-caupi, frutas cítricas, girassol, goiaba, pêssgo, entre outros. Pesquisas envolvendo manejo e domesticação

de *Melipona* spp. para polinização de cultivos agrícolas levam em consideração algumas características desse gênero, como a ausência de ferrão e menor agressividade, que facilita criação em caixas racionais, constância floral e recrutamento de forrageiras (de Carvalho *et al.* 2014, Slaa *et al.* 2000, Bruening 2001, Nieh 2004, Hrncir *et al.* 2008). Esta abordagem destaca as abelhas nativas como um potencial alternativo no aumento da produção agrícola (Villas-Bôas 2012, Garibaldi *et al.* 2013, Witter & Nunes-Silva 2014, BPBES/REBIPP 2019).

A tribo Meliponini é responsável por grande parte da polinização da flora nativa em diversos biomas brasileiros contribuindo para a conservação da biodiversidade (Silveira *et al.* 2002, Klein *et al.*, 2007, Imperatriz-Fonseca & Nunes-Silva 2010, Pioker-Hara *et al.* 2014, Boff *et al.* 2013, Lima & Silvestre, 2017). A flora utilizada por esses meliponíneos varia amplamente conforme a região, o que pode elevar seu papel ecológico no reflorestamento e conservação de remanescentes florestais (Kerr *et al.* 1996, Imperatriz-Fonseca *et al.* 2011, Silva & Paz, 2012, Boff *et al.* 2013, Silva *et al.* 2013, Pedro 2014, Imperatriz-Fonseca *et al.* 2017, Imperatriz-Fonseca & Alves 2020).

A criação racional de abelhas sem ferrão é conhecida como meliponicultura e vem sendo praticada há muitos anos por povos nativos no continente americano, principalmente no Brasil e no México (Quezada-Euán *et al.* 2001, Cortopassi-Laurino *et al.* 2006, Vit *et al.* 2013). Segundo Jaffé *et al.* (2015) em um levantamento feito no território brasileiro, 19 espécies são mantidas por meliponicultores entrevistados e as espécies criadas pela maioria dos meliponicultores são *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris*, *Melipona subnitida* e *Melipona fasciculata*. Sendo que *M. subnitida* e *M. scutellaris* são as abelhas mais procuradas e mais criadas no nordeste brasileiro, por produzirem um mel muito apreciado ao paladar, apresentarem propriedades medicinais e terem alto valor de mercado; além de serem muito bem adaptadas ao clima quente dessa região (Kerr 1996, Villas-Bôas 2012, Carvalho *et al.* 2014 Maia *et al.* 2015).

A prática racional da criação de abelhas beneficia não somente os meliponicultores, mas também a continuidade e existência dessas espécies, reduzindo o risco de extinção dessas abelhas. Portanto, essa prática seria uma forma de manter o serviço ecossistêmico de polinização local, o que se tornaria um ciclo, favorecendo a manutenção das espécies de abelhas sem ferrão.

1.3. *Melipona scutellaris*

Uruçu, urucu nordestina, urucu verdadeira, urucu da Bahia são todos nomes populares que se referem a espécie de abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* Latreille 1811 (Figura 1). Originalmente ocorrem em florestas úmidas e quentes, particularmente em zonas de transição entre a Mata Atlântica e a Caatinga do Nordeste brasileiro, se estendendo do Rio Grande do Norte até a Bahia (Kerr 1996, Bruening 2001, Alves *et al.* 2012, Camargo e Pedro, 2013). Em virtude do seu potencial produtivo de mel, atualmente, podem ser encontradas criações racionais da espécie em outras regiões do Brasil incluindo a região Sul (Ferreira *et al.* 2019).

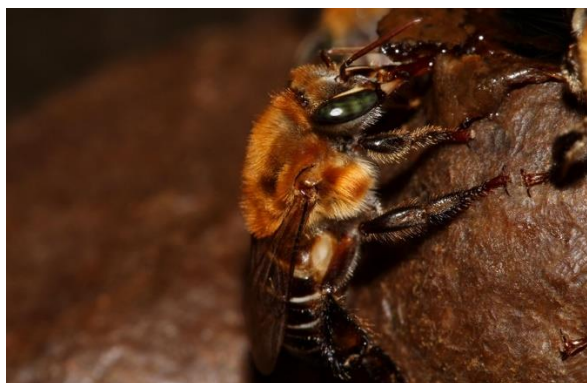


Figura 1. Abelha adulta da espécie *Melipona scutellaris* (Fonte: Cristiano Menezes).

M. scutellaris é uma espécie robusta com aproximadamente 10 a 13 mm de comprimento total, apresenta face com coloração escura e linhas do clípeo amareladas, mandíbulas ferrugíneas, pelo do tórax quase amarelado e abdômen com presença de linhas brancas (Imperatriz-Fonseca *et al.* 2017).

O destaque atual dessa abelha no Nordeste se dá principalmente em razão da grande quantidade de mel produzido, bem como por sua qualidade, sabor, aroma característicos, textura mais fluida e lenta cristalização (Evangelista-Rodrigues *et al.* 2005, da Silva *et al.* 2013). Alguns trabalhos realizados com urucu são referentes à qualidade, caracterização química, nutricional e potenciais farmacológicos do mel (Duarte *et al.* 2012, Carvalho de Melo *et al.* 2020). Assim como o mel, a geoprópolis também tem sido amplamente estudada em relação às suas capacidades antiinflamatória, antibactericida, antioxidante e antiproliferativa (Franchin *et al.* 2013, da Cunha *et al.* 2016, Menegatti *et al.* 2018, Ferreira *et al.* 2019, Carvalho de Melo *et al.* 2020).

Além de estudos voltados ao potencial produtivo de mel e das propriedades medicinais da geoprópolis, *M. scutellaris* é modelo de estudos em pesquisas relacionadas a seus aspectos biológicos e comportamentais particulares, tais como: a presença de poliginia – um comportamento raro no gênero *Melipona*, caracterizado pela presença de mais de uma rainha fisiogástrica na colmeia responsável pela postura de ovos (Carvalho *et al.* 2010, Carvalho *et al.* 2011, Souza *et al.* 2017); parasitismo intraespecífico praticado por operárias reprodutivas descendentes da rainha que foi substituída (Alves *et al.* 2009a) e por rainhas virgens que saem do seu ninho e invadem colônias órfãs (Wenseleers *et al.* 2011); diferentes estratégias de forrageamento (Silva *et al.* 2011, Roselino & Hrncir, 2012, Schorkopf *et al.* 2016); localização de alimento através das vibrações torácicas (Hrncir *et al.* 2008); provisionamento e oviposição de células (Pereira *et al.* 2009); caracterização de células do sistema imunológico, cromossomos e glândulas *corpora allata* (Amaral *et al.* 2010, Piccoli *et al.* 2018, Schumann *et al.* 2019).

A necessidade de preencher a lacuna em estudos como doenças e simbioses, sobre essa abelha se faz urgente, principalmente em virtude das ameaças de sobrevivência que esta espécie vem sofrendo por conta das ações antrópicas. De acordo com os estudos de levantamento de espécies arbóreas utilizadas como sítios de nidificação para *M. scutellaris* (Alves *et al.* 2009b), um

total de 19 plantas foram identificadas abrigando colônias dessa espécie. Dentre elas, Anacardiaceae, Caesalpiniaceae, Meliaceae e Mimosaceae se destacaram entre as 12 famílias vegetais identificadas. Na mesma região de estudo, Carvalho *et al.* (2001) analisando o mel desses meliponíneos, identificaram 28 tipos de pólen, Caesalpiniaceae (14%), Mimosaceae (25%) e Myrtaceae (56%) tiveram maior representatividade, e as mesmas famílias são citadas por Alves *et al.* (2009) utilizadas para nidificação. Outros estudos analisando pólen coletados por *M. scutellaris* identificaram as mesmas famílias as mesmas famílias dos estudos citados (Ramalho *et al.* 2007, Matos & Santos 2017). O desmatamento, por exemplo, tem destruído os locais de nidificação dessas abelhas, assim como suas fontes de recursos, diminuindo e limitando a oferta de habitats adequados.

Por conta deste cenário, *M. scutellaris* se encontra na lista de espécies ameaçadas de extinção do ICMBio na categoria em perigo (EN) segundo o critério B2ab (i,ii,iii). Esse critério está ligado a uma distribuição geográfica restrita e apresentando fragmentação, declínio ou flutuações; onde a Área de Ocupação estimada é $< 500 \text{ km}^2$; com população severamente fragmentada ou em poucas e declínio continuado (ICMBio 2013, ICMBio/MMA 2018).

Além do fator desmatamento, que leva a fragmentação e perda de habitat, o apreço pelo mel dessa espécie levou a uma forte exploração das populações naturais pelo homem em busca desse recurso, tendo como consequência um drástico declínio de ocorrência de uruçú no seu habitat natural. Vale ainda ressaltar que, além disso da perda de ambientes naturais, o uso indiscriminado de agrotóxicos, a presença de patógenos e introdução de espécies exóticas atuam em sinergia intensificando, ainda mais, os riscos de sobrevivência da espécie (Lourenço *et al.*, 2012, Jacob *et al.* 2014, Moraes *et al.* 2018, Quiroga-Murcia *et al.* 2017, Prado *et al.* 2020).

Outras particularidades a respeito desses meliponíneos devem ser mais bem estudadas e analisadas. Sua relação com microrganismos, por exemplo, é um dos temas que merece atenção para serem abordadas em pesquisas futuras. Pouco se sabe sobre essa relação, não só para essa

espécie, mas também para outras abelhas sem ferrão. Essa abordagem deve ser estudada sob a ótica dos malefícios e benefícios causadas por microrganismos, pois assim como eles atuam em processos importantes para sobrevivência dessas abelhas (Paludo *et al.* 2018), em uma interação de simbiose, outros podem ser causadores de doenças.

1.4. MICROBIOTA BACTERIANA EM ABELHAS

Com o advento das novas tecnologias moleculares, principalmente o sequenciamento de nova geração, ficou mais fácil explorar e identificar organismos que não são perceptíveis a olho nu, incluindo a microbiota encontrada nas abelhas (Romero *et al.* 2019). Microbiota é a comunidade microbiana que inclui os taxa de bactérias, vírus, fungos e protozoários. Muitas vezes esse termo é confundido com o microbioma, definido como a microbiota mais o conjunto dos seus genes (Ursell *et al.* 2012, Romero *et al.* 2019).

Os primeiros estudos voltados para microbiota geral das abelhas foram realizados através de métodos baseados em cultura. Gilliam *et al.* (1990) isolaram e identificaram bactérias (Gram-variáveis, *Bacillus* spp. e *Enterobacteriaceae*) no ninho, em abelhas operárias, nas rainhas virgens e acasaladas, no néctar e pólen de *Apis mellifera*.

Estudos baseados em sequências de DNA ou RNA como o metabarcoding e metagenômica, já estão sendo realizados pelo mundo para a identificação da microbiota intestinal de abelhas, principalmente de *A. mellifera* (Cox-Foster *et al.* 2007, Muli *et al.* 2014, Anjum *et al.* 2018). Apesar do termo microbiota abranger diversos grupos de microrganismos como mencionado, os estudos até o momento contemplam principalmente as bactérias.

Existe uma estreita relação entre abelhas e a comunidade bacteriana que habita o seu intestino, essa relação se apresenta de forma benéfica na maior parte das vezes. Estudos ao longo dos anos, conseguiram identificar os principais filotipos comuns e as discrepâncias bacterianas que

compõem a comunidade microbiana de várias espécies de abelhas, além de verificar que diversos microrganismos exercem variadas funções no sistema digestivo e imunológico (Ahn *et al.* 2012, Engel *et al.* 2012, Koch & Schmid-Hempel, 2012, Moran *et al.* 2015, Nunes-Silva *et al.* 2016).

A. mellifera abriga no seu intestino um conjunto específico de bactérias, pertencentes aos filos Proteobacteria (Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria), Firmicutes e Actinobacteria (Martinson *et al.* 2011, Moran *et al.* 2012, Sabree *et al.* 2012). As espécies *Snodgrassella alvi* (Betaproteobacteria), *Giliamella Apicola* (Gammaproteobacteria), *Bartonella Apis* (Alphaproteobacteria), *Frischella perrar* (Gammaproteobacteria), *Lactobacillus Firma-4* (Firmicutes), *Lactobacillus Firma-5* (Firmicutes), *Bifidobacterium asteroides* (Actinobacteria) e *Parasaccharibacter apium* (Alphaproteobacteria) representam 95 a 99,9% da comunidade bacteriana intestinal na maioria dos indivíduos de *A. mellifera*. São clusters consistentes, independentemente das diferenças ambientais, geográficas e genéticas entre os hospedeiros, embora as proporções dos diferentes clusters variem entre indivíduos (Jeyaprakash *et al.* 2003, Cox-Foster *et al.* 2007, Martinson *et al.* 2011, Sabree *et al.* 2012, Moran *et al.* 2015, Kwong & Moran 2016, Anjum *et al.* 2018).

Porém alguns desses filotipos são compartilhados com outras espécies corbiculadas (*Bombus* sp. e *Apis* sp.), com exceção de *Bartonella, apis* e *Frischella perrar* que são exclusivas de *A. mellifera* (Kwong *et al.* 2017). Apesar desse compartilhamento, a prevalência e abundância dessas espécies são distintas (Koch & Schmid-Hempel 2011a, Ahn *et al.* 2012, Moran *et al.* 2015, Saraithong *et al.* 2015, Kwong *et al.* 2017), e ausentes nas espécies solitárias e na maioria dos meliponini (Martinson *et al.* 2011, Kwong *et al.* 2017). As espécies de *Bombus* apresentam duas bactérias que parecem ser exclusivas do gênero, *Bombiscardovia* e *Schmidhempelina*. Porém, existe uma diferença significativa na comunidade entre as espécies sugerindo a presença de espécies de bactérias especializadas (Koch & Schmid-Hempel 2011a, Kwong *et al.* 2017).

Para abelhas sem ferrão, e principalmente o gênero *Melipona*, estudos com esta abordagem são escassos. Pouco sabemos sobre as espécies bacterianas que habitam o intestino dessas abelhas e quais padrões de abundância, diversidade e dinâmica de sua composição. Kwong *et al.* (2017) em um dos poucos estudos com abelhas sem ferrão, compararam a microbiota intestinal de abelhas corbiculadas de diferentes continentes. O estudo abrangeu dez espécies de abelhas da tribo Meliponini, sendo duas de ocorrência no Brasil, pertencentes ao gênero *Trigona*, e uma OTU (Unidade Taxonômica Operacional) de *Acetobacter* foi identificada, que mostrou ser exclusiva nas abelhas sem ferrão (Kwong *et al.* 2017).

Leonhardt & Kaltenpoth (2014) analisaram o intestino de três espécies de abelhas sem ferrão simpátricas na Austrália, e a bactéria *Lactobacillales* esteve presente em todas as colônias com variação na abundância relativa. Também foram encontradas em quase todas as colônias duas OTUs relacionadas ao gênero *Pantoea* (*Gammaproteobacteria*, *Enterobacteriales*), e uma OTU associada à família *Acetobacteriaceae* (*Alphaproteobacteria*, *Rhodospirillales*). Nesse estudo foi dada uma maior ênfase nas bactérias do ácido lático (LAB), pois algumas cepas dessas bactérias parecem ser exclusivas de certos hospedeiros, contendo clusters presentes em abelhas sem ferrão e que não estão presentes em outras espécies fora desse grupo e tem sido explorado por outros pesquisadores (Vásquez *et al.* 2012, Leonhardt & Kaltenpoth 2014).

Outro trabalho que visa identificar a microbiota intestinal de abelhas sem ferrão, foi realizado utilizando como modelo *Melipona quadrifasciata* (Díaz *et al.* 2016). As OTUs bacterianas foram classificadas em 11 clados, sete deles pertencentes a *Firmicutes* e correspondem a 73,4% da amostra total que, junto com *Acetobacteriaceae*s, são as bactérias mais representativas no intestino dessas abelhas. As *Firmicutes* encontradas nesse estudo estão divididas em sete grupos (T, U, V, W, X, Y e Z), e os grupos mais abundantes, U e Z, estão relacionados, respectivamente, com *Lactobacillus kunkeii* e Firm-5- bactérias do ácido lático identificadas em outras abelhas.

Atualmente os trabalhos com abelhas não só visam identificar a microbiota presente no intestino das abelhas e nos demais elementos da colônia, como também visam identificar seus genes e como essas informações estão relacionadas com a distribuição geográfica, variações genéticas do hospedeiro, a relação com a fragmentação de paisagem, mudanças climáticas, doenças, efeito dos inseticidas, dentre outras variáveis. O propósito de buscar por qualquer uma destas relações é identificar possíveis alterações na composição dessa microbiota e quais os efeitos que essas alterações podem causar na sobrevivência, comportamento ou fisiologia dessas abelhas (Babendreier *et al.* 2007, Koch & Schmid-Hempel, 2012, Cariveau *et al.* 2014).

A ideia de relacionar as bactérias com sua função no metabolismo digestivo ou na atuação do sistema imunológico das abelhas, já levou a diversas descobertas. Sabemos que alguns clusters de bactérias são responsáveis pela digestão de pólen, por exemplo, agindo através de enzimas que degradam carboidratos e lipídios, participam da biossíntese e absorção de nutrientes, da fermentação, entre outras atividades de catabolismo (Gilliam *et al.* 1990, Engel *et al.* 2012, Voulgari-Kokota *et al.* 2019).

Em termos de imunidade, as bactérias atuam no combate de patógenos impedindo que outras bactérias ou fungos entomopatogênicos causem danos à saúde das abelhas (Engel *et al.* 2012, Leonhardt & Kaltenpoth *et al.* 2014, Voulgari-Kokota *et al.* 2019). Bactérias Firmicutes, por exemplo, demonstraram um efeito protetor contra dois dos principais patógenos bacterianos das abelhas, as larvas de *Paenibacillus* e *Melissococcus plutonius* (Forsgren *et al.* 2010, Vásquez *et al.* 2012, Wu *et al.* 2014). Em *Bombus* ??, recentemente foi demonstrado que a microbiota intestinal é transmitida por fezes e protege contra o patógeno intestinal tripanossomatídeo *Crithidia bombi* (Koch & Schmid-Hempel 2011b). Engel *et al.* (2012) sugeriram a possibilidade do biofilme de *Gilliamella* / *Snodgrassella* funcionar como uma camada protetora contra a invasão do parasita.

Apesar das associações benéficas entre abelhas e bactérias ou outros microrganismos, nem toda comunidade microbiana é vantajosa. Alguns grupos são agentes infecciosos, como o vírus *Varroa destructor virus*, *Kashmir bee virus*, *Israeli acute paralysis virus* (Bromenshenk *et al.* 2010, Cox-Foster, *et al.* 2007); fungos como *Ascosphaera Apis* (Chalkbrood), *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* (Stonebrood) (Jensen *et al.* 2013), *Nosema Apis* e *Nosema ceranae* (Higes *et al.* 2008, Plischuk *et al.* 2009, Bromenshenk *et al.* 2010) e bactérias *Melissococcus pluton* (*European foulbrood disease*), *Paenibacillus larvar* (*American foulbrood disease*) e *Lysinibacillus sphaericus* (Shanks *et al.* 2017).

Portanto entender a relação dos microrganismos tanto benéficos quanto maléficos com essas abelhas, traz informações essenciais para o manejo e manutenção das colmeias, já que nos últimos anos tem aumentado as preocupações dirigidas a esses insetos, por conta do chamado distúrbio do colapso das colônias (DCC), ou em inglês "*colony collapse disorder (CCD)*", e os fatores que levam a esse declínio (Cox-Foster 2007).

Como a maioria dos patógenos identificados em abelhas africanizadas é encontrada em uma vasta gama de espécies de Apoidea, essas abelhas podem ser fontes de contaminação para Meliponini já que estes são intimamente relacionados com os Apini (Brothers 1999, Plischuk *et al.* 2009, Ravoet *et al.* 2014, Nunes-Silva *et al.* 2016). Porém estudos de doenças e da microbiota em abelhas sem ferrão ainda são escassos, principalmente no Brasil (Díaz *et al.* 2016, Nunes-Silva *et al.* 2016).

No Brasil, Díaz *et al.* (2016) utilizaram o sequenciamento de alto rendimento do 16S rDNA para descrever a comunidade bacteriana de *Melipona quadrifasciata*, no intuito de encontrar um possível patógeno bacteriano causador de uma síndrome desconhecida. Apesar dos esforços não houve evidências diretas relacionando a síndrome com bactérias, porém já foi possível ter uma noção geral das bactérias que fazem parte da microbiota dessas abelhas. Outro estudo realizado por

Nunes-Silva *et al.* (2016) testou a presença de Leishmaniinae e Nosematidae em seis espécies de abelhas sem ferrão e em *A. mellifera* no Brasil. Dentre as abelhas sem ferrão estudadas, nenhuma apresentou os patógenos descritos. Por outro lado, os dois patógenos foram detectados em diferentes colônias de *A. mellifera*.

O único relato de uma possível doença causada por bactérias do gênero *Melipona* no Brasil é de 1948 pelo Prof. Warwick E. Kerr, em pupas doentes de *M. quadrifasciata* e *Melipona bicolor bicolor* que, anos mais tarde, *Bacilus paraalvei* foi identificado como o possível organismo causal (Kerr 1948, Nogueira-Neto 1997). Esses fatos evidenciam a lacuna existente nesta área do conhecimento e a importância de realizar estudos relacionados a microrganismos em abelhas nativas no Brasil. Apesar dos poucos trabalhos publicados não terem identificado doenças causadas por bactérias ou outros agentes patogênicos em abelhas sem ferrão, é importante nos atentar para a presença desses patógenos no país (Teixeira *et al.* 2013).

Não somente fica restrito a exploração de bactérias ou outros microrganismos causadores de doenças nessas abelhas, como também é necessário elevar o nível de conhecimento para entender como a comunidade microbiana se comporta ao passar por fatores de “stress” como, contaminação por agrotóxico, mudanças climáticas e perda de habitat. Explorar as tecnologias atuais, baseadas em sequenciamento de nova geração para caracterizar a microbiota, fornecem conhecimentos que podem ser aplicados na conservação e no manejo de abelhas sem ferrão.

1.5. MICROBIOTA FÚNGICA (MICROBIOTA)

A classe Insecta possui uma forte relação simbiótica de alguns grupos com fungos. Uma das relações mais conhecidas são com as formigas, cupins e besouros (Farrell *et al.* , 2001, Six 2003, Jason *et al.* 2010). Porém, a relação simbiótica com as abelhas ainda é pouco estudada. Quase nada se sabe a respeito da microbiota fúngica em sistema digestivo de abelhas, ainda mais quando se

trata de abelhas sem ferrão. Já a relação patogênica de fungos com abelhas é mais bem documentada, já que uma das principais doenças, nosemose, que acometem as abelhas é causada por fungo.

A Nosemose, uma das doenças mais importantes de abelhas, é um fungo microsporídeo do gênero *Nosema*. *N. Apis* e *N. ceranae* são algumas das doenças mais comumente encontradas em colmeias doentes e ataca a mucosa do intestino das abelhas. Apesar de ser um fungo que acomete principalmente espécies do gênero *Apis*, existem registros de *Nosema* em abelhas sem ferrão (Porrini *et al.* 2017, Guimarães-Cestaro *et al.* 2020). Outras doenças como cria giz (*chalkbrood*) e cria pedra (*stonebrood*) são causadas por *Ascophæra apis* e *Aspergillus flavus*, que atacam as larvas, agindo no seu intestino causando o que é chamado de mumificação, levando a morte.

Todavia, os fungos também podem beneficiar as abelhas através de função protetora contribuindo com o estado de saúde combatendo patógenos, oferecendo nutrientes, sendo fontes de alimento, participando de processos metabólicos e catabólicos da digestão, assim como ocorre em outros insetos (Six 2012, Kellner *et al.* 2013, Kaltenpoth & Steiger 2014, Harrison *et al.* 2016, Malacrinò *et al.* 2017, Gurung *et al.* 2019).

O pouco que sabemos sobre a relação entre fungos e abelhas está relacionado principalmente a presença desses fungos em provisões de alimentos, nas células de cria e até mesmo externamente às abelhas (Gilliam *et al.* 1984, Rosa *et al.* 2003, Brysch-Herzberg & Lachance_2004, Ferraz *et al.* 2008, Matos *et al.* 2011, Paludo *et al.* 2019, Dharampal *et al.* 2020, Disayathanoowat *et al.* 2020). Em relação a identificação da microbiota fúngica no sistema digestivo das abelhas, os dados são escassos quando comparados ao levantamento da diversidade bactérias (Rosa *et al.* 2003, Martinson 2011, Koch *et al.* 2012, Vásquez *et al.* 2012, Koch *et al.* 2013, Killer et a. 2014, Leonhardt e Kaltenpoth 2014, Powell 2016, Graystock *et al.* 2017, Kwong e Moran 2017).

No Brasil identificou-se uma simbiose entre a abelha meliponini *Scaptotrigona depilis* e um fungo do gênero *Zygosaccharomyce*, as abelhas aparentemente cultivam o fungo que cresce internamente à célula de cria e as larvas se alimentam desse fungo que fornece precursores de esteroides que são essenciais durante o seu desenvolvimento, por sua vez as abelhas perpetuam o fungo, transmitindo-o para outras gerações por meio de materiais de construção contaminados com esporos (Menzes *et al.* 2015, Paludo *et al.* 2018).

Silva de Souza *et al.* (2020) publicaram um dos poucos trabalhos no Brasil que identifica os fungos associados ao trato digestivo da abelha *Melipona seminigra*. Os isolados do gênero *Geotrichum* foram os mais encontrados neste estudo, seguido por *Penicillium*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Colletotrichum* e *Candida*. Foram encontrados na parte anterior do intestino 183 isolados, onde destes foram identificados 10 gêneros, seguido do intestino médio, com 178 isolados e 8 gêneros identificados, e o intestino posterior com 161 isolados e 7 gêneros. Devido ao método de identificação desses fungos, a partir da técnica de cultura e identificação morfológica, não foi possível identificar alguns fungos e nem todas as estruturas reprodutivas se desenvolveram (Silva de Souza *et al.* 2020).

Por sua vez, em *Apis mellifera*, os fungos pertencentes aos filos de Ascomycota (93,28%) e Basidiomycota (5,89%) foram dominantes, seguidos por fungos dos filos Glomeromycota (0,24%), Chytridiomycota (0,20%) e Zygomycota (0,05%). 373 sequências de fungos (0,35%) não foram identificadas segundo o banco de dados utilizado. Já em nível de gênero foram identificar a presença de *Saccharomyces*, *Coprinopsis*, *Schizopora*, *Agaricales*, *Pleosporales*, *Cystofilobasidium*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* (Yun *et al.* 2018).

Ludvigsen *et al.* (2021) compararam a abundância de fungos em relação às bactérias nos diferentes compartimentos do sistema digestivo (íleo, reto e intestino médio) de *Apis mellifera*, e em diferentes períodos do ano. Os filos Ascomycota e Basidiomycota dominaram o sistema

digestivo e foram encontradas espécies como *Starmerella apicola*, *Aureobasidium pullulans*, *Engyodontium* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium dominicanum*, *Malassezia restricta*, *Zygosaccharomyces mellis*, entre outras. No total, pelo menos 37 OTU's foram classificadas ao nível de gênero ou espécie.

Apesar de muitos trabalhos utilizarem a taxonomia dependente de culturas para analisar as características morfológicas para descrever espécies, ferramentas como o DNA barcode, metabarcoding e metagenômica estão se apresentando cada vez mais como uma opção mais rápida e com maior precisão. Ainda, resultando em maior quantidade de fungos identificados de uma vez, sendo possível assim ter um trabalho de identificação mais eficiente e informativo. O metabarcoding já vem sendo usado com uma boa frequência para identificar a microbiota bacteriana das abelhas com ótimos resultados. Sendo assim, a utilização dessa ferramenta para identificação da microbiota fúngica de abelhas pode ser a ferramenta ideal atualmente para suprir essa falta de informações da relação dos fungos com as abelhas.

1.6. METABARCODE (METABARCODING)

Antes de falar de metabarcoding, é importante entender a base dessa ferramenta, o DNA barcode (*DNA barcoding*). Conhecido também como código de barras da vida, essa ferramenta visa identificar espécies usando um pequeno fragmento de DNA, um marcador “padrão” de uma região do DNA mitocondrial ou nuclear que deve apresentar uma alta taxa de polimorfismo que fornece uma identidade genética única para cada táxon de estudo. Através do sequenciamento (Método de Sanger) desse fragmento direcionado é possível observar a distância genética entre os indivíduos e assim distinguir em nível de famílias, gêneros ou espécie. Inicialmente foi proposto o uso do gene citocromo oxidase subunidade I (COI), para separação de espécies em animais (Hebert *et al.* 2003a, 2003b). Porém com a propagação dessa ferramenta, outros genes passaram a ser utilizados, pois o

COI não se mostrava eficiente na identificação de todos os grupos (Meyer & Paulai 2005, Schoch *et al.* 2012).

Para fungos passou a ser mais utilizado ITS, para bactérias o gene 16S, para insetos o COI e rbcL, trnL e matK para plantas (Schoch *et al.* 2012, Lebonah *et al.* 2014). A utilização desses marcadores universais para identificação de espécies junto com um novo tipo de sequenciamento de alto rendimento (*Next Generation Sequencing* - NGS) através das plataformas Roche GS, Ion Torrent e Illumina levaram essa técnica a um outro nível, tornando-se um método mais robusto e preciso, referido como metabarcode (*metabarcoding*) (Shendure & Ji 2008, Taberlet *et al.* 2012, Mendonza *et al.* 2015). Essa abordagem fornece uma importante oportunidade de analisar o material de interesse, que contém misturas de espécies a partir de uma única amostra global composta por organismos inteiros ou DNA degradado. Essa ferramenta possibilita o sequenciamento com uma profundidade extensa de cobertura para identificação dos taxa e gerar conhecimentos ecológicos associados, como diversidades alfa e beta, enquanto o DNA barcode trabalha com a identificação de uma espécie por amostra e não fornece insights ecológicos (Taberlet *et al.* 2012, Yu *et al.* 2012, Andújar *et al.* 2018).

Essa técnica passou a ser usada principalmente para descrever taxonomicamente as espécies presentes em uma amostra, onde muitas vezes não é possível serem identificadas a olho nu ou através da taxonomia tradicional (Yu *et al.* 2012, Burgar *et al.* 2013). Sua aplicação em diversas áreas serve para analisar amostras ambientais como água e solo; conteúdo estomacal de diversos animais, para entender a cadeia alimentar; amostras de alimentos para controle sanitário; papel da microbiota na saúde e na doença de vários organismos, inclusive dos seres humanos; estimativa da riqueza de espécies microbianas; são os exemplos mais comuns (Burgar *et al.* 2013, Ji *et al.* 2013, Hamad *et al.* 2018, Bruno *et al.* 2019, Bush *et al.* 2019, Piper *et al.* 2019).

O fluxo de trabalho do metabarcode de forma geral é iniciado pela coleta da amostra, extração de DNA, seleção de um marcador ideal para identificar os táxons conforme seu objetivo, e sequenciamento. Após essa etapa, os dados são gerados e um novo fluxo de trabalho é necessário para análise dos dados gerados pela plataforma de sequenciamento, onde é realizado demultiplexação, remoção dos adaptadores, verificação qualidade das sequências, corte de ruídos, eliminação de quimeras e alinhamento de sequências em relação a um banco de dados, agrupamento de sequências em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e por fim as atribuição taxonômica, posicionamento filogenético e demais análises ecológicas (Ji *et al.* 2013, Pavan-Kumar *et al.* 2015). Existem diversos programas de bioinformática disponíveis para realizar todas essas etapas.

Diversos programas e ferramentas de bioinformática foram desenvolvidos para o tratamento e análise dos dados gerados no sequenciamento, porém a maioria foi desenvolvida para tratar dados do 16S, e que não apresentam bons resultados para ITS (Cole *et al.* 2009, Schloss *et al.* 2009, Caporaso *et al.* 2010, Giongo *et al.* 2010, Hartman *et al.* 2010). Alguns desses estão inseridos dentro de pacotes que fazem todas as análises dos amplicons como QIIME (Caporaso *et al.* 2010), MOTHUR (Schloss *et al.* 2009) e Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2014) , que apresentam um fluxo completo de trabalho. Alguns pacotes como LotuS (Hildebrand *et al.* 2014), PipeCraft (Anslan *et al.* 2017) e PIPITS (Gweon *et al.* 2015) foram criados para tentar suprir a demanda das análises de ITS, o que é de suma importância para garantir uma confiabilidade dos resultados de bioinformática para esses dados,

Mothur é um projeto criado por Patrick Schloss e colaboradores em 2009, para suprir as necessidades na área de bioinformática que analisa dados de ecologia microbiana, inicialmente voltado principalmente para sequencias do gene 16S rRNA, sendo um pacote de software de código aberto e plataforma independente para descrever e comparar a comunidade microbiana (Schloss *et al.* 2009). Sendo possível trabalhar com dados brutos como entrada, do demultiplex até as análises de

diversidades com ferramentas de visualização, um único software para analisar os dados moleculares por completo (Schloss *et al.* 2009).

Já o Lotus2 elaborado por Hildebrand e colaboradores, foi anunciado para a comunidade científica como um pipeline de processamento de OTU eficiente, fácil de usar e com grande rapidez, diferente de outros pipelines (Hildebrand *et al.* 2014). Usando apenas uma linha de comando contendo todos os parâmetros desejados é possível se obter uma análise quase completa dos dados de metabarcoding. O nome Lotus2 vem de uma junção de OTU + S (SDM), SDM é um software autônomo integrado ao Lotus2, responsável pela filtragem de qualidade, demultiplexação, mudanças de formato de sequência e sequências “Seed” (Hildebrand *et al.* 2014).

Com código aberto é possível remover sequências de baixa qualidade, eliminar quimeras e ruídos, agrupar as sequências em OTUs, matrizes de abundância, árvore filogenética das OTUs e gera saídas phyloseq para análise em outros softwares. O Lotus2 diferente do Mothur não conta com ferramentas para essas análises finais, porém, junto a documentação do pipeline, é apresentado a opção do uso do programa R com todas as etapas descritas, comandos necessários, a partir das saídas específicas compatíveis com esse programa. Um dos diferenciais do Lotus2 em relação ao Mothur é a incorporação do ITSx que extrai as sequências de ITS para uma melhor análise desse conjunto de dados (Hildebrand *et al.* 2014). Sendo assim um pipeline voltado igualmente para dados fúngicos como bacterianos. Já que a maioria dos programas de análise de dados microbianos sempre estiveram mais direcionados para conjuntos de dados de 16S.

Uma das principais etapas em um trabalho de identificação de organismos através de técnicas moleculares, depende dos bancos de dados alimentadas com as sequências de DNA dos organismos. Portanto junto com a preocupação relacionada aos programas disponíveis para analisar os dados, vem a preocupação com os bancos de dados. Especificamente para fungos, os bancos de

dados têm sido alimentados cada vez mais, é o caso por exemplo do UNITE (Abarenkov *et al.* 2010), onde as informações das sequências da região ITS são depositadas.

Alguns outros bancos de dados como o Greengene (DeSantis *et al.* 2006), Silva (bactérias) (Quast *et al.* 2013) e NCBI (Federhen 2012), são utilizados com frequência na etapa de alinhamento e agrupamento de OTUs, que iram resultar nas atribuições taxonômicas e talvez essas sejam as etapas mais importantes do processo, para uma boa análise da diversidade microbiana. Já que os dados gerados através do metabarcoding permitem que diversidades beta e alfa por exemplo sejam calculadas (Caporaso *et al.* 2010, Disayathanoowat *et al.* 2020).

Whittaker (1972) descreveu os termos alfa e beta para medir a biodiversidade em escalas espacial. A diversidade alfa refere-se à diversidade dentro de uma determinada área ou ecossistema, e geralmente é expressa pelo número de espécies (ou seja, riqueza de espécies) em uma área. Já com a diversidade beta é possível examinar a mudança na diversidade de espécies entre as áreas, contando assim o número total de espécies que são únicas para cada uma das áreas que estão sendo comparados. Assim, a diversidade beta nos permite comparar a diversidade entre as áreas.

Metabarcoding passou a ser um grande aliado na busca do conhecimento da microbiota associadas ao sistema digestivo das abelhas, de forma que seja uma ferramenta que vai além da taxonomia, pois dá um viés para entender um pouco mais sobre a riqueza, diversidade, funções e relações evolutivas entre esses organismos.

Literatura Citada

Abarenkov, K., R.H. Nilsson, K.H. Larsson, I.J. Alexander, U. Eberhardt, S. Erland, K. Høiland, R. Kjølner, E. Larsson, T. Pennanen, R. Sen, A.F.S. Taylor, L. Tedersoo, B.M. Ursing, T. Vrålstad, K. Liimatainen, U. Peintner & U. Kõljalg. 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. *New Phytologist*. 186: 281–285.

- Ahn, J-H., I-P. Hong, J-I. Bok, B-Y. Kim, J. Song & H-Y. Weon. 2012.** Pyrosequencing Analysis of the Bacterial Communities in the Guts of Honey Bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *The Journal of Microbiology*. 5: 735–745.
- Alves, R.M.O., C.A.L. Carvalho, B.A. Sousa & W.S. Santos. 2012.** Area of natural occurrence of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) in State of Bahia, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 84: 679-688.
- Alves, D.A., V.L. Imperatriz-Fonseca, T.M. Franco, P.S. Santos-Filho, P. Nogueira-Neto, J. Billen & T. Wenseleers. 2009a.** The queen is dead—long live the workers: intraspecific parasitism by workers in the stingless bee *Melipona scutellaris*. *Molecular Ecology*. 18: 4102–4111
- Alves, R.M.O., B.A. Souza, C.A.L. Carvalho, L.S. Souza & J.P. Andrade. 2009b.** Substratos vegetais utilizados pela abelha urucu (*Melipona scutellaris*) no litoral norte do Estado da Bahia. *Mensagem Doce*. 83: 44-45.
- Amaral, I.M.R., J.F. Moreira Neto, G.B. Pereira, M.B. Franco, M.E. Beletti, W.E. Kerr, A.M. Bonetti & C. Ueira-Vieira. 2010.** Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis. *Micron*. 41: 123–129.
- Andrade B.R., A.S. Nascimento, E.L. Franco, D.R. Santos, R.M.O. Alves, M.A.P.C. Costa, C.A.L. Carvalho. 2019.** Pollen Spectrum and Trophic Niche Width of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) in Highly Urbanized and Industrialized Sites. *Sociobiology* 66(2): 279-286.
- Andújar, C., P. Arribas, D.W. Yu, A.P. Vogler & B.C. Emerson. 2018.** Why the COI barcode should be the community DNA metabarcode for the metazoa. *Mol Ecol*. 27: 3968– 3975.
- Anjum, S.I., A.H. Shah, M. Aurongzeb, J. Kori, M.K. Azim, M.J. Ansari & L. Bin. 2018.** Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 25: 388–392
- Anslan, S., M. Bahram, I. Hiiesalu & L. Tedersoo. 2017.** PipeCraft: flexible open-source toolkit for bioinformatics analysis of custom high-throughput amplicon sequencing data. *Molecular Ecology Resources*. 17: 234–240.
- Araújo, E.D., M. Costa, J. Chaud-Neto & H.G. Fowler. 2004.** Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): Interference of flight range and possible ecological implications. *Brazilian Journal of Biology*. 64: 563-368.
- Ascher, J.S & J. Pickering. 2019.** Discover life: bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species&flags=HAS. Acessado em 7 Janeiro 2019.

- Babendreier, D., D. Joller, J. Romeis, F. Bigler & F. Widmer. 2007.** Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiol Ecol.* 59: 600–610.
- Barbosa, F.M., R.M.O. Alves, B.A. Souza & C.A.L. Carvalho. 2013.** Nest architecture of the stingless bee *Geotrigona subterranea* (Fries, 1901) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Biota Neotrop.* 13: 147-152.
- Barbosa, W.F., G. Smagghe & R.N.C. Guedes. 2015.** Pesticides and reduced-risk insecticides, native bees and pantropical stingless bees: pitfalls and perspectives. *Pest Manag Sci.* 71: 1049–1053.
- Batista, M.A., M. Ramalho & E.E.A. Soares. 2003.** Nesting sites and abundance of Meliponini (Hymenoptera: Apidae) in heterogeneous habitats of the Atlantic Rain Forest, Bahia, Brazil. *Lundiana.* 4: 19-23.
- Bispo dos Santos, S.A., A.C. Roselino, M. Hrncir & L.R. Bego. 2009.** Pollination of tomatoes by the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Genetics and Molecular Research.* 8: 751-757.
- Boff, S., A.C. Araujo & A. Pott. 2013.** Bees (Hymenoptera: Apoidea) and flowers in natural forest patches of southern Pantanal. *Biota Neotropica.* 13: 46-56.
- Bossert, S., E.A. Murray, E.A.B. Almeida, S.G. Brady, B.B. Blaimer & B.N. Danforth. 2019.** Combining transcriptomes and ultraconserved elements to illuminate the phylogeny of Apidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 130: 121–13.
- BPBES/REBIPP. 2019.** Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil. 1ª edição, São Carlos, SP: Editora Cubo. 184 p.
- Bromenshenk, J.J., C.B. Henderson, C.H. Wick, M.F. Stanford, A.W. Zulich, E.J. Rabih, V.D. Samir, P.E. McCubbin, R.A. Seccomb, P.M. Welch, T. Williams, D.R. Firth, E. Skowronski, M.M. Lehmann, S.L. Bilimoria, J. Gress, K.W. Wanner & R.A. Cramer Jr. 2010.** Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. *PLoS ONE.* 5: 13181.
- Brosi, B.J., G.C. Daily, T.M. Shih, F. Oviedo & G. Durán. 2008.** The effects of forest fragmentation on bee communities in tropical countryside. *Journal of Applied Ecology.* 45: 773–783.
- Brothers, D.J. 1999.** Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zoologica Scripta.* 28: 233-249.
- Brown, M.J.F. & R.J. Paxton. 2009.** The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie.* 40, 410–416.

- Bruening, H. 2001.** Abelha Jandaíra– 2ªEdição – Fundação Guimarães Duque. Fundação Vingt-Un Rosado coleção mossoroense Série “C” – Volume 1189.
- Bruno, A., A. Sandionigi, G. Agostinetto, L. Bernabovi, J. Frigerio, M. Casiraghi & M. Labra. 2019.** Food Tracking Perspective: DNA Metabarcoding to Identify Plant Composition in Complex and Processed Food Products. *Genes*. 10: 248.
- Brysch-Herzberg, M., & M.A. Lachance. 2004.** *Candida bombiphila* sp. nov., a new asexual yeast species in the Wickerhamiella clade. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1857–1859.
- Buchmann S.L. & J.H. Cane. 1989.** Bees Assess Pollen Returns while Sonicating Solanum Flowers Source: *Oecologia*. 81: 289-294.
- Burgar, J.M., D.C. Murray, M.D. Craig, J. Haile, J. Houston, V. Stokes & M. Bunce. 2014.** Who’s for dinner? High-throughput sequencing reveals bat dietary differentiation in a biodiversity hotspot where prey taxonomy is largely undescribed. *Molecular Ecology*. 23: 3605–3617.
- Bush, A., Z.G. Compson, W.A. Monk, T.M. Porter, R. Steeves, E. Emilson, N. Gagne, M. Hajibabaei, M. Roy & D.J. Baird. 2019.** Studying Ecosystems With DNA Metabarcoding: Lessons From Biomonitoring of Aquatic Macroinvertebrates. *Front. Ecol. Evol.* 7:434.
- Camargo, J.M.F. 1970.** Ninhos e biología de algumas espécies de Meliponideos (Hymenoptera: Apidae) da região de Porto Velho, Território de Rondônia, Brasil, *Rev. Biol. Trop.* 16: 207-239.
- Camargo, J.M.F. & S.R.M. Pedro. 1992.** Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie*. 23: 509-522.
- Camargo, J.M.F & S.R.M. Pedro. 2003.** Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) - bionomia e biogeografia. *Revista Brasileira de Entomologia*. 47: 311-372.
- Camargo, J.M.F. & S.R.M. Pedro. 2013.** Meliponini Lepeletier, 1836. Em Moure, JS, Urban, D. e Melo, GAR (Orgs). *Catálogo de Abelhas* (Hymenoptera, Apoidea) na Região Neotropical - versão online. Disponível em <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em 24 / abr / 2020
- Caporaso, J.G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F.D. Bushman, E.K. Costello, N. Fierer, A.G. Peña, J.K. Goodrich & J.I. Gordon. 2010.** QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 7: 335–336.
- Cariveau, D.P., J. Elijah Powell, H. Koch, R. Winfree & N.A. Moran. 2014.** Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*). *The ISME Journal*. 8: 2369–2379.

- Carvalho, C.A.L., B.A. Souza, C.S. Dias, R.M.O. Alves, A.F. Lima Melo, A.C.F. Soares, G.A. Carvalho-Zilse. 2010. Five egg-laying queens in a single colony of brazilian stingless bees (*Melipona scutellaris* Latreille). *Acta Amazonica*. 41: 123 – 126.
- Carvalho, C.A.L., A.C.C.C. Moreti, L.C. Marchini, R.M.O. Alves & P.C.F. Oliveira. 2001. Pollen spectrum of honey of “Uruçu” bee (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811). *Rev. Brasil. Biol.* 61: 63-67.
- Carvalho, C.A.L., W.S. Santos, L.A. Nunes, B.A. Souza, G.A. Carvalho-Zilse & Rogério Marcos de Oliveira Alves. 2011. Offspring Analysis in a Polygyne Colony of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae) by Means of Morphometric Analyses. *Sociobiology* 57: 347-354.
- Carvalho de Melo, F.H., F.N.D.D. Menezes, J.M. Batista de Sousa, M.S. Lima, G.S.C. Borges, E.L. Souza & M. Magnani. 2020. Prebiotic activity of monofloral honeys produced by stingless bees in the semi-arid region of Brazilian Northeastern toward *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Bifidobacterium lactis* BB-12. *Food Res Int.* 128: 108809.
- Cole, J.R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R.J. Farris, A.S. Kulam-Syed-Mohideen, D.M. McGarrell, T. Marsh, G.M. Garrity & J.M. Tiedje. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37: 141–145.
- Cortopassi-Laurino, M., V.L. Imperatriz-Fonseca, D.W. Roubik, A. Dollin, T. Heard & I. Ingrid Aguilar. 2006. Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*. 37: 275–292.
- Cortopassi-Laurino, M., D.A. Alvez & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2009. Árvores neotropicais, recursos importantes para a nidificação de abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponini). *Mensagem Doce* n° 100. Março de 2009. Available in <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/100/artigo9.htm>. Assessed in 12 de janeiro de 2020.
- Costa, M.A.D.L., G.A.R. Melo & W.S. Sheppard. 2003. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. *Apidologie*. 34: 73–84.
- Cox-Foster, D.L., S. Conlan, E.C. Holmes, G. Palacios, J.D. Evans, N.A. Moran, P. Quan, T. Briesse, M. Hornig, D.M. Geiser, V. Martinson, D. Vanengelsdorp, A.L. Kalkstein, A. Drysdale, J. Hui, J. Zhai, L. Cui, S.K. Hutchison, J.F. Simons, M. Egholm, J.S. Pettis & W.I. Lipkin. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 318: 283-287.
- da Cunha, M.G., M. Franchin, L.C.C. Galvão, A.L.T.G. Ruiz, J.E. Carvalho, M. Ikegaki, S.M. Alencar, H. Koo & P.L. Rosalen. 2013. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geoprópolis. *BMC Complement Altern. Med.* 13: 1-9.

- da Cunha, M.G., P.L. Rosalen, M. Franchin, S.M. Alencar, M. Ikegaki, T. Ransom & J.A. Beutler. 2016. Antiproliferative Constituents of Geopropolis from the Bee *Melipona scutellaris*. *Planta Med.* 82: 190–194.
- da Silva, G., T. da Natividade, C. Camara, E. da Silva, F. dos Santos & T. Silva. 2014. identification of sugar, amino acids and minerals from the pollen of Jandaíra Stingless Bees (*Melipona subnitida*). *Food and Nutrition Sci.* 5: 1015-1021.
- da Silva, I.A.A., T.M.S. da Silva, C.A. Camara, N. Queiroz, M. Magnane & J.S. de Novais. 2013. Perfil fenólico, atividade antioxidante e análise palinológica de mel de abelhas sem ferrão do Amazonas, Norte do Brasil. *Food Chem.* 141: 3552–3558.
- de Carvalho, R.M.A., C.F. Martins & J.S. Mourão. 2014 Meliponiculture in Quilombola communities of Ipiranga and Gurugi, Paraíba state, Brazil: na ethnoecological approach. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 10: 1-12.
- DeSantis, T.Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E.L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu & G.L. Andersen. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5069–5072.
- Dharampal, P.S., L. Diaz-Garcia, M.A.B. Haase, J. Zalapa, C.R. Currie, C.T. Hittinger & S.A. Steffan. 2020. Microbial Diversity Associated with the Pollen Stores of Captive-Bred Bumble Bee Colonies. *Insects.* 11: 250.
- Díaz, S., S.S. Urbano, L. Caesar, B. Blochtein, A. Sattler, V. Zuge & K.L. Haag. 2017. Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. *J. Invert. Pathol.* 143: 35–39.
- Disayathanooawat, T., H. Li, N. Supapimon, N. Suwannarach, S. Lumyong, P. Chantawannakul & J. Guo. 2020. Different Dynamics of Bacterial and Fungal Communities in Hive-Stored Bee Bread and Their Possible Roles: A Case Study from Two Commercial Honey Bees in China. *Microorganisms.* 8: 264.
- Duarte, A.W.F., M.R.S. Vasconcelos, A.P.D. Menezes, S.C. Silva, M. Oda-souza & A.M.Q. López. 2012. Composition and antioxidant activity of honey from Africanized and stingless bees in Alagoas (Brazil): a multivariate analysis, *J Apicul Res.* 51: 23-35.
- Engel, P., V.G. Martinson & N.A. Moran. 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *PNAS.* 109: 11002–11007.
- Evangelista-Rodrigues, A., E.M.S. Silva, E.M.F. Beserra & M.L. Rodrigues. 2005. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em regiões distintas no Estado da Paraíba. *Ciência Rural.* 35: 1166-1171.
- Farrell, B.D., A.S. Sequeira, B.C. O'Meara, B.B. Normark, J.H. Chung & B.H. Jordal. 2001. The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). *Evolution.* 55: 2011-2027.

- Feás, X., M.P. Vázquez-Tato, L. Estevinho, J.A. Seijas & A. Iglesias. 2012.** "Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality". *Molecules*. 17: 8359-8377.
- Federhen, S. 2012.** The NCBI taxonomy database. *Nucleic Acids Res.* 40:136–143.
- Ferraz, R.E., P.M. Lima, D.S. Pereira, C.C.O. Freitas & F.M.C. Feijó. 2008.** Microbiota Fúngica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae. *Neotropical Entomology*. 37:345-346
- Ferreira, B.L., L.V. Gonzaga, L. Vitali, G.A. Micke, H.F. Maltez, C. Ressureição, A. C.O. Costa, R. Fett. 2019.** Southern-Brazilian geopropolis: A potential source of polyphenolic compounds and assessment of mineral composition. *Food Res. Int.* 126: 1-13.
- Fidalgo, A.O. & A.M.P. Kleinert. 2009.** Reproductive biology of six Brazilian Myrtaceae: is there a syndrome associated with buzz-pollination?. *New Zealand Journal of Botany*. 47: 355-365.
- Forsgren, E., T.C. Olofsson, A. Vásquez & I. Fries. 2010.** Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*. 41: 99–108.
- Franchin, M., M.G. Cunha, C. Denny, M.H. Napimoga, T.M. Cunha, B. Bueno-Silva, S.M. Alencar, M. Ikegaki & P.L. Rosalen. 2013.** Bioactive Fraction of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Involvement of Nitric Oxide Pathway. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2013: 1-9
- Garibaldi, L.A., I. Steffan-Dewenter, R. Winfree, M.A. Aizen, R. Bommarco, S.A. Cunningham, I. Bartomeus, F. Benjamin, V. Boreux, D. Cariveau, N.P. Chacoff, J.H. Dudenhöffer, B.M. Freitas, J. Ghazoul, S. Greenleaf, J.H. Sousa, A. Holzschuh, B. Howlett, R. Isaacs, S.K. Javorek, C.M. Kennedy, K.M. Krewenka, S. Krishnan, Y. Mandelik, M.M. Mayfield, I. Motzke, T. Munyuli, B.A. Nault, M. Otieno, J. Petersen, G. Pisanty, S.G. Potts, R. Rader, T.H. Ricketts, M. Rundlöf, C.L. Seymour, C. Schüepp, H. Szentgyörgyi, H. Taki, T. Tscharntke, C.H. Vergara, B.F. Viana, T.C. Wanger, C. Westphal, N. Williams & A.M. Klein. 2013.** Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science*. 339: 1608- 1611.
- Garibaldi, L., Luísa G. Carvalheiro, Bernard E. Vaissière, Barbara Gemmill-Herren, Juliana Hipólito, Breno M. Freitas, Hien T. Ngo, Nadine Azzu, Agustín Sáez, Jens Åström, Jiandong An, Betina Blochtein, Damayanti Buchori, Fermín J. Chamorro García, Fabiana Oliveira da Silva, Kedar Devkota, Márcia de Fátima Ribeiro, Leandro Freitas, Maria C. Gaglianone, Maria Goss, Mohammad Irshad, Muo Kasina, Alípio J.S. Pacheco Filho, Lucia H. Piedade Kiill, Peter Kwapong, Guiomar Nates Parra, Carmen Pires, Viviane Pires, Ranbeer S. Rawal, Akhmad Rizali, Antonio M. Saraiva, Ruan Veldtman, Blandina F. Viana, Sidia Witter, Hong Zhang. 2016.** Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. *Science*, 351, pp. 388-391

- GBIF 2019.** Hymenoptera in GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org. Acessado em 21 de julho de 2020.
- GBIF 2020.** Hymenoptera in GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy https://www.gbif.org/pt/occurrence/map?has_coordinate=false&taxon_key=4334 Acessado em 21 de julho de 2020.
- Gilliam, M., S.L. Buchmann, B.J. Lorenz & R.J. Schmalzel. 1990.** Bacteria belonging to the genus *Bacillus* associated with three species of solitary bees. *Apidologie*. 21: 99–105.
- Giannini, T.C., G.D. Cordeiro, B.M. Freitas, A.M. Saraiva & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2015.** The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. *J. Econ. Entomol.* 108: 849-857.
- Giannini, T.C., Camila Maia-Silva, Andre L. Acosta, Rodolfo Jaffé, Airtton T. Carvalho, Celso F. Martins, Fernando C. V. Zanella, Carlos A. L. Carvalho, Michael Hrnir, Antonio M. Saraiva, José Oswaldo Siqueira, Vera L. Imperatriz-Fonseca. 2017.** Protecting a managed bee pollinator against climate change: strategies for an area with extreme climatic conditions and socioeconomic vulnerability. *Apidologie* 48:784–794.
- Giongo, A., D.B. Crabb, A.G. Davis-Richardson, D. Chauliac, J.M. Mobberley, K.A. Gano, N. Mukherjee, G. Casella, L.F. Roesch, B. Walts, A. Riva, G. King & E.W. Triplett. 2010.** PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. *ISME*. 4: 852–861.
- Graystock, P., S.M. Rehan & Q.S. McFrederick. 2017.** Hunting for healthy microbiomes: Determining the core microbiomes of *Ceratina*, *Megalopta*, and *Apis* bees and how they associate with microbes in bee collected pollen. *Conserv. Genet.* 18: 701–711.
- Gurung, K., B. Wertheim & J.F. Salles. 2019.** The microbiome of pest insects: it is not just bacteria. *Entomol. Exp. Appl.* 167: 156–170.
- Gweon, H.S., A. Oliver, J. Taylor, T. Booth, M. Gibbs, D.S. Read, R.I. Griffiths & K. Schonrogge. 2015.** PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods Ecol. Evol.* 6: 973–980.
- Hamad, I., R. Abou Abdallah, I. Ravaux, S. Mokhtari, H. Tissot-Dupont, C. Michelle, A. Stein, J.C. Lagier, D. Raoult & F. Bittar. 2018.** Metabarcoding analysis of eukaryotic microbiota in the gut of HIV-infected patients. *PLoS ONE* 13: e0191913.
- Harrison, J.G., D.M. Urruty & M.L. Forister. 2016.** An exploration of the fungal assemblage in each life history stage of the butterfly, *Lycaeides melissa* (Lycaenidae), as well as its host plant *Astragalus canadensis* (Fabaceae). *Fungal Ecol.* 22: 10-16.
- Hartfelder, K., G.R. Makert, C.C. Judice, G.A.G. Pereira, W.C. Santana, R. Dallacqua, M.M.G. Bitondi. 2006.** Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and Division of labor in stingless bees. *Apidologie*. 37: 144-163.

- Hartman, A.L., S. Riddle, T. McPhillips, B. Ludäscher & J.A. Eisen. 2010.** Introducing W.A.T.E.R.S.: a workflow for the alignment, taxonomy, and ecology of ribosomal sequences. *BMC bioinform.* 11: 317.
- Heard, T.A. 1999.** The role of stingless bees in crop pollination. *Annu. Rev. Entomol.* 44:183–206.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. deWaard. 2003a.** Biological identifications through DNA barcodes *Proc. R. Soc. Lond. B* 270, 313–321
- Hebert, P.D.N., S. Ratnasingham & J.R. deWaard 2003b.** Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)*. 270: 96–99.
- Higes, M., R. Martín-Hernández, C. Botías, E.G. Bailón, A.V. González-Porto, L. Barrios, M. Jesús del Nozal, J.L. Bernal, J.J. Jiménez, P.G. Palencia & A. Meana. 2008.** How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10: 2659–2669.
- Hildebrand, F., R.Y. Tadeo, A.Y. Voigt, P. Bork & J. Raes. 2014.** LotuS2: an efficient and user-friendly OTU processing pipeline. *Microbiome.* 2: 30.
- Hrncir, M., D.L.P. Schorkopf, V.M. Schmidt, R. Zucchi, F.G. Barth. 2008.** The sound field generated by tethered stingless bees (*Melipona scutellaris*): inferences on its potential as a recruitment mechanism inside the hive. *J Expl Biol.* 211: 686–698.
- ICMBio. 2013.** Instrução Normativa ICMBio nº 34 de 17 de outubro de 2013. Dispõe sobre as diretrizes e procedimentos para a avaliação do estado de conservação das espécies da fauna brasileira. Disponível em https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-do-risco/apostila_aplicacao_criterios_categorias_UICN_versao_2.0.pdf. Acessado em 5 de Maio de 2020.
- ICMBio/MMA. 2018.** Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VII – Invertebrados -- 1. ed. -- Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018. 7 v. : il.
- Imperatriz-Fonseca, V.L. & D.A. Alves. 2020.** Abelhas sem ferrão do Pará: a partir das expedições científicas de João M. F. Camargo. Belém, PA: ITV, 280p
- Imperatriz-Fonseca, V.L., I. Alves-Dos-Santos, P.S. Santos-Filho, W. Engels, M. Ramalho, W. Wilms, J.B.V. Aguilar, C.A. Pinheiro-Machado, D.A. Alves & A.M.P. Kleinert. 2011.** Checklist of bees and honey plants from São Paulo State, Brazil. *Biota Neotrop.* 11: 631-655.
- Imperatriz-Fonseca, V.L., D. Koedam & M. Hrncir, 2017.** Abelha jandaíra: no passado, presente e no futuro. Mossoró, EdUFERSA 254p.

- Imperatriz-Fonseca, V.L. & P. Nunes-Silva. 2010.** As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o código florestal brasileiro. *Biota Neotrop.* 10: 59-62.
- Inoue, M.N., J. Yokoyama & I. Washitani. 2008.** Displacement of Japanese native bumblebees by the recently introduced *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *J Insect Conserv.* 12:135–146.
- IPBES 2016.** The assessment report of the intergovernmental science-policy platform on biodiversity and ecosystem services on pollinators, pollination and food production. S.G. Potts, V. L. Imperatriz-Fonseca & H. T. Ngo (eds). Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany. 552 p.
- Jacob, C.R.O., H.M. Soares, R.C.F. Nocelli & O. Malaspinaa. 2015.** Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. *Pest Manag Sci.* 71: 114–122.
- Jaffé, R., U.M. Maia, A. Torres Carvalho & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2013.** Diagnóstico da Meliponicultura no Brasil. *Mensagem Doce* 120: 7-9.
- Jaffé, R., N. Pope, A. Torres Carvalho, U.M. Maia, B. Blochtein, C.A.L. de Carvalho, G.A. Carvalho-Zilse, B.M. Freitas, C. Menezes, M.F. Ribeiro, G.C. Venturieri & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2015.** Bees for Development: Brazilian Survey Reveals How to Optimize Stingless Beekeeping. *PLoS ONE* 10: e0121157.
- Jensen, A.B., K. Aronstein, J.M. Flores, S. Vojvodic, M.A. Palacio & M. Spivak. 2013.** Standard methods for fungal brood disease research. *J Apicul Res*, 52: 1-20.
- Jeyaprakash, A., M.A. Hoy & M.H. Allsopp. 2003.** Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *J. Invert. Pathol.* 84: 96–103
- Ji, Y., L. Ashton, S.M. Pedley, D.P. Edwards, Y. Tang, A. Nakamura, R. Kitching, P.M. Dolman, P. Woodcock, F.A. Edwards, T.H. Larsen, W.W. Hsu, S. Benedick, K.C. Hamer, D.S. Wilcove, C. Bruce, X. Wang, T. Levi, M. Lott, B.C. Emerson & D.W. Yu. 2013.** Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology Letters.* 16: 1245–1257.
- Kaltenpoth, M. & S. Steiger. 2014.** Unearthing carrion beetles' microbiome: characterization of bacterial and fungal hindgut communities across the Silphidae. *Mol Ecol.* 23: 1251–1267.
- Kellner, K.H., H.D. Fernandez-Marin, R. Ishak, T. Sen, A. Linksvayer & U.G. Mueller. 2013.** Co-evolutionary patterns and diversification of ant–fungus associations in the asexual fungus-farming ant *Mycocepurus smithii* in Panama. *J. Evol. Biol.* 26: 1353–1362
- Kerr, W.E. 1948.** Estudos sobre o gênero *Melipona*. *An. Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz*, 5: 181-276.

- Kerr, W.E., G.A. Carvalho & V.A. Nascimento. 1996.** A Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação. Belo Horizonte, Fundação Acangaú, 144 p.
- Killer, J., S. Dubná, I. Sedláček & P. Švec. 2014.** *Lactobacillus Apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 152–157.
- Klein, A.M., V. Boreux, F. Fornoff, A-C. Mupepele & G. Pufal. 2018.** Relevance of wild and managed bees for human well-being. *Curr Opin Insect Sci.* 26: 82–88
- Klein, A.M., B.M. Freitas, I.G.A. Bomfim, V. Boreux, F. Fornoff & M.O. Oliveira. 2020.** A Polinização Agrícola por Insetos no Brasil - Um Guia para Fazendeiros, Agricultores, Extensionistas, Políticos e Conservacionistas. Albert-Ludwigs University Freiburg, Nature Conservation and Landscape Ecology.149p.
- Klein, A.M., B.E. Vaissière, J.H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunningham, C. Kremen & T. Tscharntke. 2007.** Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B.* 274: 303–313
- Kleijn, D., R. Winfree, I. Bartomeus, L.G. Carvalheiro, M. Henry, R. Isaacs, A.M. Klein, C. Kremen, L.K. M’Gonigle, R. Rader, T.H. Ricketts, N.M. Williams, N. Lee Adamson, J.S. Ascher, A. Báldi, P. Batáry, F. Benjamin, J.C. Biesmeijer, E.J. Blitzer, R. Bommarco, M.R. Brand, V. Bretagnolle, L. Button, D.P. Cariveau, R. Chifflet, J.F. Colville, B.N. Danforth, E. Elle, M.P. Garratt, F. Herzog, A. Holzschuh, B. G. Howlett, F. Jauker, S. Jha, E. Knop, K.M. Krewenka, V. Le Féon, Y. Mandelik, E.A. May, M.G. Park, G. Pisanty, M. Reemer, V. Riedinger, O. Rollin, M. Rundlöf, H.S. Sardiñas, J. Scheper, A.R. Sciligo, H.G. Smith, I. Steffan-Dewenter, R. Thorp, T. Tscharntke, J. Verhulst, B.F. Viana, B.E. Vaissière, R. Veldtm, C. Westphal & S.G.Potts. 2015.** Delivery of crop pollination services is an insufficient argument for wild pollinator conservation. *Nat. Commun.* 6: 7414.
- Koch, H., D.P. Abrol, J. Li & P. Schmid-Hempel. 2013.** Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Mol. Ecol.* 22: 2028–2044.
- Koch, H., G. Cisarovsky & P. Schmid-Hempel. 2012.** Ecological effects on gut bacterial communities in wild bumblebee colonies. *J. of Animal Ecol.* 81: 1202–1210.
- Koch, H. & P. Schmid-Hempel. 2011a.** Bacterial Communities in Central European Bumblebees: Low Diversity and High Specificity. *Microb Ecol.* 62:121–133.
- Koch, H. & P. Schmid-Hempel. 2011b.** Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *PNAS* 108: 19288–19292.
- Koedam, D. 2017.** Ninhos e Biologia geral: comparando as abelhas africanizadas e as abelhas sem ferrão, p. 29-40. In Imperatriz Fonseca, V.L, D. Koedam & M. Hrncir (eds.), *A abelhas jandaíra: no passado, presente e no futuro.* Mossoró, EdUFERSA, 254p.

- Kwong, W.K., L.A. Medina, H. Koch, K-W. Sing, E.J.Y. Soh, J.S. Ascher, R. Jaffé & N.A. Moran. 2017.** Dynamic microbiome evolution in social bees. *Sci. Adv.* 3: e1600513
- Kwong, W.K. & N.A. Moran. 2016.** Gut Microbial Communities of Social Bees. *Nat Rev Microbiol.* 14: 374–384.
- Lavinas, F.C., E.H.B.C. Macedo, G.B.L. Sá, A.C.F. Amaral, J.R.A. Silva, M.M.B. Azevedo, B.A. Vieira, T.F.S. Domingos, A.B. Vermelho, C.S. Carneiro & I.A. Rodrigues. 2019.** Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 29: 389–399.
- Lebonah, D.E., A. Dileep, K. Chandrasekhar, S. Sreevani, B. Sreedevi & J. Pramoda Kumar. 2014.** DNA barcoding on bacteria: A review. *Adv. Biol.* 2014: 1-9.
- Leonhardt, S.D. & M. Kaltenpoth. 2014.** Microbial Communities of Three Sympatric Australian Stingless Bee Species. *PLoS ONE* 9: e105718.
- Lima, F.V.O. & R. Silvestre. 2017.** Abelhas (Hymenoptera, Apidae sensu lato) do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, 107(Suppl.), e2017123.
- Lourenço, C.T., S.M. Carvalho, O. Malaspina & R.C.F. Nocelli. 2012.** Determination of fipronil LD₅₀ for the brazilian bee *Melipona scutellaris*. 11th International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group, Wageningen (The Netherlands), Julius-Kuhn-Archiv, 437
- Ludvigsen, J., Å. Andersen, L. Hjeljord & K. Rudi. 2021.** The Honeybee Gut Mycobiota Cluster by Season versus the Microbiota which Cluster by Gut Segment. *Vet. Sci.* 8: 1-4.
- Luna-Lucena D., F. Rabico & Z.L.P. Simoes. 2019.** Reproductive capacity and castes in eusocial stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Curr Opin Insect Sci*, 31:20–28.
- Maia, U.M., R. Jaffe, A. Torres Carvalho & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2015.** Meliponicultura no Rio Grande do Norte. *Rev. Bras. Med. Vet.* 37: 327-333.
- Maia-Silva, C., M. Hrnčir, C.I. Silva & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2015.** Survival strategies of stingless bees (*Melipona subnitida*) in an unpredictable environment, the Brazilian tropical dry forest. *Apidologie.* 46: 631-643.
- Malacrinò, A., L. Schena, O. Campolo, F. Laudani, S. Mosca, G. Giunti, C.P. Strano & V. Palmeri. 2017.** A Metabarcoding Survey on the Fungal Microbiota Associated to the Olive Fruit Fly. *Microb Ecol.* 73:677–684.
- Martinson, V.G., B.N. Danforth, R.L. Minckley, O. Rueppell, S. Tingek & N.A. Moran. 2011.** A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol Ecol.*, 20: 619–628.
- Matos, V.R. & F.A.R. Santos. 2017.** Pollen in honey of *Melipona scutellaris* L. (Hymenoptera: Apidae) in an Atlantic rainforest area in Bahia, Brazil. *Palynology.* 41: 144-156.

- Matos, I.T.S.R., M.T. Nunes, D.A. Mota, M.M.M. Laureano & M.A. Hoshiba. 2011.** Qualidade microbiológica do mel de *Melipona* sp. produzido na amazônia central (Parintins – AM – Brasil). Revista Verde. 6: 91–95.
- McMurdie, P.J. & S. Holmes. 2013.** Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PLoS ONE 8: e61217
- Menegatti, C., W.G.P. Melo, D.B. Carrão, A.R. Moraes De Oliveira, F. Santos Do Nascimento, N.P. Lopes & M.T. Pupo. 2018.** *Paenibacillus polymyxa* associated with the stingless bee *Melipona scutellaris* produces antimicrobial compounds against entomopathogens. J Chem Ecol. 44:1158–1169.
- Menezes, C., A. Vollet-Neto, A.J. Marsaioli, D. Zampieri, I.C. Fontoura, A.D. Luchessi & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2015.** A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. Curr. Biol. 25: 2851–2855.
- Meyer, C.P. & G. Paulay. 2005.** DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. PLoS Biol. 3: e422
- Michener, C.D. 1969.** Comparative social behavior of bees. Annu. Rev. Entomol. 14: 299–342.
- Michener, C.D. 1974.** The Social Behavior of the Bees. Cambridge, Havard University Press, 404p.
- Michener, C.D. 2000.** “The Bees of the World.” Baltimore, The John Hopkins University Press, 913p.
- Mohammad, S.M., N.K. Mahmud-Ab-Rashid & N. Zawawi. 2021.** Stingless bee-collected pollen (Bee Bread): chemical and microbiology properties and health benefits. Molecules. 26: 957.
- Morales, C.L., M.P. Arbetman, S.A. Cameron & M.A. Aizen. 2013.** Rapid ecological replacement of a native bumble bee by invasive species. Front Ecol Environ. 11: 529–534.
- Moran, N.A. 2015.** Genomics of the honey bee microbiome. Curr Opin Insect Sci. 10: 22–28.
- Moran, N.A., A.K. Hansen, J.E. Powell & Z.L. Sabree. 2012.** Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS ONE 7: e36393.
- Morais, C.R., B.A.N. Travençolo, S.M. Carvalho, M.E. Beletti, V.S.V. Santos, C.F. Campos, E.O. Campos Júnior, B.B. Pereira, M.P. Carvalho Naves, A.A.A. Rezende, M.A. Spanó, C. Ueira-Vieira & A.M. Bonetti. 2018.** Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). Chemosphere. 206: 632-642.

- Morandin, L.A., Mark L Winston, Michelle T Franklin and Virginia A Abbott. 2005.** Lethal and sub-lethal effects of spinosad on bumble bees (*Bombus impatiens* Cresson). *Pest Manag Sci* 61:619–626.
- Muli, E., H. Patch, M. Frazier, J. Frazier, B. Torto, T. Baumgarten, J. Kilonzo, J. Ng'ang'a Kimani, F. Mumoki, D. Masiga, J. Tumlinson & C. Grozinger. 2014** Evaluation of the distribution and impacts of parasites, pathogens, and pesticides on honey bee (*Apis mellifera*) populations in East Africa. *PLoS ONE*. 9: e94459.
- Nascimento, D.L. & F.S. Nascimento. 2012.** Extreme effects of season on the foraging activities and colony productivity of a stingless bee (*Melipona asilvai* Moure, 1971) in Northeast Brazil. *Psyche: A J. Entomol.* 2012: 1-6.
- Nicolson, S.W. 2011.** Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *Afri. Zoo.* 46: 197-204.
- Nieh, J.C. 2004.** Recruitment communication in stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Apidologie*. 35: 159–182.
- Nogueira-Neto, P. 1997.** Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 445 p.
- Nunes-Silva P., M. Hrncir & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2010.** A polinização por vibração. *Oecologia Australis*. 14: 140-151.
- Nunes-Silva P., M. Hrncir, C.I. da Silva, Y.S. Roldão & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2013.** Stingless bees, *Melipona fasciculata*, as eficiente pollinators of eggplant (*Solanum melongena*) in greenhouses. *Apidologie*. 44: 537–546.
- Nunes-Silva P., N. Piot, I. Meeus, B. Blochtein & G. Smagghe. 2016.** Absence of Leishmaniinae and Nosematidae in stingless bees. *Sci Rep*. 6:3254
- Oliveira, F.F., B.T.T. Richers, J.R. Silva, R.C. Farias, T.A.L. Matos. 2013.** Guia ilustrado das abelhas “Sem-Ferrão” das Reservas Amanã e Mamirauá, Amazonas, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 267p.
- Paludo, C.R., C. Menezes, E.A. Silva-Junior, A. Vollet-Neto, A. Andrade-Dominguez, G. Pishchany, L. Khadempour, F.S. do Nascimento, C.R. Currie, R. Kolter, J. Clardy & M.T. Pupo. 2018.** Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. *Sci Rep*. 8: 1122.
- Pavan-Kumar, A., P. Gireesh-Babu & W.S. Lakra. 2015.** DNA Metabarcoding: A new approach for rapid biodiversity assessment. *J Cell Sci & Mol Biol*. 2: 111.
- Pedro, S.R.M. 2014.** The Stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera:Apidae). *Sociobiology*. 61: 348–354.

- Pereira, R.A., M.M. Morais, F.S. Nascimento & L.R. Bego. 2009.** Intrinsic colony conditions affect the provisioning and oviposition process in the stingless bee *Melipona scutellaris*. Genet. Mol. Res. 8: 725-729.
- Piccoli, M.C.A., V.B. Bardella & D.C. Cabral-De-Mello. 2018.** Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. Apidologie. 49: 497–504.
- Pioker-Hara, F.C., M.S Drummond & A.M.P. Kleinert. 2014.** The influence of the loss of brazilian savanna vegetation on the occurrence of stingless bees nests (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Sociobiology. 61: 393-400.
- Piper, A.M., J. Batovska, N.O.I. Cogan, J. Weiss, J.P. Cunningham, B.C. Rodoni & M.J. Blacket. 2019.** Prospects and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-throughput insect surveillance. GigaScience. 8:
- Plischuk, S., R. Martín-Hernández, L. Prieto, M. Lucía, C. Botías, A. Meana, A.H. Abrahamovich, C. Lange1 & M. Higes. 2009.** South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). Environ. Microbiol. Rep. 1: 131–135.
- Porrini, M.P., L.P. Porrini, P.M. Garrido, C.M. Silva Neto, D.P. Porrini, F. Muller, L.A. Nuñez, L. Alvarez, P.F. Iriarte & M.J Eguaras. 2017.** *Nosema ceranae* in south american native stingless bees and social wasp. Microbiol. Ecol. 74: 761–764.
- Potts, S.G., V.L Imperatriz-Fonseca, H.T. Ngo, M.A. Aizen, J.C. Biesmeijer, T.D. Breeze, L.V. Dicks, L.A. Garibaldi, R. Hill, J. Settele & A.J. Vanbergen. 2016.** Safeguarding pollinators and their values to human well-being. Nature. 540: 220–229.
- Powell, J.E., V.G. Martinson, K. Urban-Mead, N.A. Moran. 2014.** Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. Appl. Environ. Microbiol. 80: 7378 –7387.
- Prado, F.S.R., D.M. dos Santos, T.M. de Almeida Oliveira, J.A.M. Burgarelli, J.B. Castele & E.M. Vieira. 2020.** Determination and uptake of abamectin and difenoconazole in the stingless bee *Melipona scutellaris* Latreille (1811) via oral and topic acute exposure. Environ. Pollut. 265.
- Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies & F.O. Glöckner. 2013.** The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucl. Acids Res. 41: 590-596.
- Quezada-Euán, J.J.G., G. Nates-Parra, M.M. Maués, V.L. Imperatriz-Fonseca, D.W. Roubik. 2018.** Economic and cultural values of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) among ethnic groups of Tropical America. Sociobiology. 65: 534-557.
- Quezada-Euán, J.J.G., W. May-Itza & J. González-Acereto. 2001.** Meliponiculture in México: problems and perspective for development. Bee World. 82:160–167.

- Quiroga-Murcia, D.E., M.J. Zotti, I.Z. Polanía & E.E. Pech-Pech. 2017.** Toxicity evaluation of two insecticides on *Tetragonisca angustula* and *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera: Apidae). *Agronomía Colombiana*. 35: 340-349.
- Ramalho, M., M.D.E Silva & C.A.L. Carvalho. 2007.** Dinâmica de uso de fontes de pólen por *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae): Uma análise comparativa com *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), no Domínio Tropical Atlântico. *Neotrop Entomol.* 36: 38-45.
- Ramírez, S.R., J.C. Nieh, T.B. Quental, D.W. Roubik, V.L. Imperatriz-Fonseca & N.E. Pierce. 2010.** A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Mol Phylogenet Evol.* 56: 519–525.
- Rasmussen, C. & S.A. Cameron. 2010.** Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol J Linn Soc Lond.* 99: 206–232.
- Ravoet, J., L. De Smet, I. Meeus, G. Smagghe, T. Wenseleers, D.C. de Graaf. 2014.** Widespread occurrence of honey bee pathogens in solitary bees. *J Invertebr Pathol.* 122: 55–58.
- Rêgo, M.M.C., P.M.C. Albuquerque, R.S. Pinto, M.M. Barbosa & A.G. Silva. 2017.** A abelha jandaíra no estado do Maranhão, p. 79-85. In: V. L. Imperatriz-Fonseca, D. Koedam & M. Hrcnir (Eds.), *A abelha jandaíra: no passado, no presente e no futuro*. Mossoró: EdUFERSA, 254p.
- Ribeiro, M.F., T. Wensellers, P.S. Santos Filho, D.A. Alves. 2006.** Miniature queens in stingless bees: basic facts and evolutionary hypotheses. *Apidologie.* 37: 191–206.
- Romero, S., A. Nastasa, A. Chapman, W.K. Kwong & L.J. Foster. 2019.** The honey bee gut microbiota: strategies for study and characterization. *Insect Mol. Biol.* 28: 455-472.
- Rosa, C.A., M-A Lachance, J.O.C. Silva, A.C.P. Teixeira, M.M. Marini, Y. Antonini & R.P. Martins. 2003.** Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Res.* 4: 271-275.
- Roselino, A.C. & M. Hrcnir. 2012.** Repeated unrewarded scent exposure influences the food choice of stingless bee foragers, *Melipona scutellaris*. *Anim Behav.* 83: 755-762.
- Rosi-Denadai, C.A., P.C.S. Araújo, L.A. Oliveira Campos, L. Cosme Jr. & R.N.C Guedes. 2018.** Buzz-pollination in Neotropical bees: genus-dependent frequencies and lack of optimal frequency for pollen release. *Insect Sci.* 00: 1–10.
- Roubik, D.W. 2006.** Stingless bee nesting biology. *Apidologie.* 37: 124-143.
- Sabree, Z.L., A.K. Hansen, N.A. Moran. 2012.** Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees. *PLoS ONE.* 7: e41250.

- Santos, T.C.A & C. Cruz-Landim. 2002.** Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário. *Revta bras. Zool.* 19: 703–714.
- Sakagami, S.F., M.J. Montenegro & W.E. Kerr. 1965.** Behavior studies of the stingless bees, with special reference to the oviposition process. V. *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier. *Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser.* 15.
- Saraihong, P., Y. Li, K. Saenphet, Z. Chen & P. Chantawannakul. 2015.** Bacterial community structure in *Apis florea* larvae analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rRNA gene sequencing. *Insect Sci.* 22: 606–618.
- Schloss, P.D., S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. Van Horn & C.F. Weber. 2009.** Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environ. Microbiol.* 75: 7537–7541.
- Schoch, C.L., K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J.L. Spouge, C.A. Levesque, W. Chen & Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List 2012.** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *PANAS.* 109: 6241–6246.
- Schorkopf, D.L.P., G.F. de Sá Filho, C. Maia-Silva, M. Schorkopf, M. Hrnecir & F.G. Barth. 2016.** Nectar profitability, not empty honey stores, stimulate recruitment and foraging in *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *J Comp Physiol A.* 202:709–722.
- Schumann, N.A.B., C.A.M. Cardoso-Junior, E.H. Silva, C. Ueira-Vieira, M.E. Beletti, M.B. Franco, M. Bezerra-Laure, G.R. Araujo, B.A.N. Travençolo & A.M. Bonetti. 2019.** Three-dimensional reconstruction of corpora allata nucleus reveals insights into epigenetic mechanisms of caste differentiation in *Melipona scutellaris* stingless bees. *Apidologie.* 50:330–339.
- Shanks, J.L., A.M. Haigh, M. Riegler & R.N. Spooner-Hart. 2017.** First confirmed report of a bacterial brood disease in stingless bees. *J Invertebr Pathol.* 144: 7–10.
- Shendure, J. & H. Ji. 2008.** Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 26: 1135–45.
- Siqueira, E.L., R.B. Martines & F.H. Nogueira-Ferreira. 2007.** Ninhos de abelhas sem ferrão (hymenoptera, meliponina) em uma região do Rio Araguari, Araguari-MG. *Biosci. J.* 23: 38-44.
- Silva de Souza, J.R., M.O. Costa, M.I.L. da Silva & C.G. Nunes da Silva. 2020.** Ocorrência de fungos associados ao trato digestivo de abelhas sem ferrão *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919. p 114-121. In: *Micologia: Fungos e/ou seus Metabólitos como Objeto de Estudo.* Ed. Atena. 253p.

- Silva, M.D.E., M. Ramalho & D. Monteiro. 2013.** Diversity and habitat use by stingless bees (Apidae) in the Brazilian Atlantic Forest. *Apidologie*. 44:699–707.
- Silva, W.P. & J.R.L. Paz. 2012.** Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. *Natureza on line* 10: 146-152.
- Silveira, F.A., G.A.R. Melo & E.A.B. Almeida. 2002.** Abelhas brasileiras: sistemática e identificação: Belo Horizonte, 253p.
- Six, D.L. 2012.** Ecological and Evolutionary Determinants of Bark Beetle — Fungus Symbioses. *Insects*. 3: 339-366.
- Slaa, J.E., L.A. Sanchez, M. Sandi & W. Salazar. 2000.** A scientific note on the use of stingless bees for commercial pollination in enclosures. *Apidologie*. 31: 141-142.
- Souza, E.A., J.R. Trigo, D.E. Santos, C. Ueira-Vieira, J.E. Serrão. 2017.** The relationship between queen execution and cuticular hydrocarbons in stingless bee *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Meliponini). *Chemoecology*. 27:25–32.
- Taberlet, P., E. Coissac, F. Pompanon, C. Brochmann & E. Willerslev. 2012.** Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 21: 2045-2050.
- Teixeira, E.W., L.G. Santos, A. Sattler, D. Message, M.L.T.M.F. Alves, M.F. Martins, M.L. Grassi-Sella & T.M. Franco. 2013.** *Ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *J Invertebr Pathol.* 114: 250–254.
- Thomson, D.M. 2006.** Detecting the effects of introduced species: a case study of competition between *Apis* and *Bombus*. *OIKOS*. 114: 407-418.
- Ursell, L.K., J.L. Metcalf, L.W. Parfrey & R. Knight. 2012.** Defining the Human Microbiome. *Nutr Rev.* 70: S38–S44.
- Vallejo-Marín, M. 2019.** Buzz pollination: studying bee vibrations on Flowers. *New Phytologist*. 224: 1068–1074.
- van Veen, J.W. & M.J. Sommeijer. 2000.** Colony reproduction in *Tetragonisca angustula* (Apidae, Meliponini). *Insectes Soc.* 47: 70–75.
- Vásquez, A., E. Forsgren, I. Fries, R.J. Paxton, E. Flaberg, L. Szekely & T.C. Olofsson. 2012.** Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE*. 7: e33188.
- Villas-Bôas, J. 2012.** Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão. Brasília – DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). Brasil, 96p.

- Voulgari-Kokota, A., Q.S. McFrederick, I. Steffan-Dewenter & A. Keller. 2019.** Drivers, diversity, and functions of the solitary-bee microbiota. *Trends Microbiol.* 27: 1034-1044.
- Wenseleers, T., D.A. Alves, T.M. Franco, J. Billen & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2011.** Intraspecific queen parasitism in a highly eusocial bee. *Biol. Lett.* 7: 173–176.
- Wille, A. & C.D. Michener. 1973.** The nest architecture of stingless bees with special reference to those of Costa Rica (Hymenoptera: Apidae). *Rev. Biol. Trop.*, 21: 1-278.
- Wille, A. 1979.** Phylogeny and relationships among the genera and subgenera of stingless bees (Meliponinae) of the world. *Rev. Biol. Trop.* 27: 241–277.
- Wille, A. 1983.** Biology of the stingless bees. *Ann. Rev. Entomol.* 28: 41-64.
- Wilson, E.O. & B. Hölldobler. 2005.** Eusociality: Origin and consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 13367–13371.
- Winfree, R. 2010.** The Conservation And Restoration Of Wild Bees. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1195: 169–197.
- Winfree, R., R. Aguilar, D.P. Vázquez, G. Lebuhn, & M.A. Aizen. 2009.** A meta-analysis of bees responses to anthropogenic disturbance. *Ecology.* 90: 2068–2076.
- Witter, S & P. Nunes-Silva. 2014.** Manual de boas práticas para o manejo e conservação de abelhas nativas (meliponíneos) 1. ed. - Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 141p.
- Wittwer, B., A. Hefetz, T. Simon, L.E.K. Murphy, M.A. Elgar, N.E. Pierce & S.D. Kocher. 2017.** Solitary bees divest in communication. *PNAS.* 114: 6569-6574.
- Wu M., Y. Sugimura, K. Iwata, N. Takaya, D. Takamatsu, M. Kobayashi, D. Taylor, K. Kimura & M. Yoshiyama. 2014.** Inhibitory effect of gut bacteria from the Japanese honey bee, *Apis cerana japonica*, against *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood disease. *J. of Insect Sci.* 14:
- Yu, D.W., Y. Ji, B.C. Emerson, X. Wang, C. Ye, C. Yang & Z. Ding. 2012.** Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods Ecol Evol.* 3: 613-623.
- Yun, J.-H., M.-J. Jung, P.S. Kim, J.-W. Bae. 2018.** Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee. *Sci. Rep.* 8:
- Zanella, F.C.V. & C.F. Martins. 2003.** Abelhas da Caatinga: biogeografia, ecologia e conservação. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). *Ecologia e conservação da Caatinga.* Recife, UFPE. cap. 2, p. 75-134.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA INTESTINAL DE *MELIPONA*
SCUTELLARIS PARA TRÊS ECORREGIÕES DISTINTAS NO BRASIL COM BASE EM
DADOS METABARCODE DO GENE 16S

Dayana Rosalina de Sousa¹, Marcos da Silveira Regueira Neto², Caio Andrey Bezerra
Januário², Wilson José da Silva Júnior¹, Lílían Caesar³, Karen Luísa Haag², Airton Torres de
Carvalho⁴, Valdir de Queiroz Balbino²

Universidade Federal Rural de Pernambuco, ²Universidade Federal de Pernambuco, ³Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, ⁴Universidade Federal Rural do Semi-Árido

Sousa, D.R., M.S. Regueira Neto, C.A. Bezerra Januário, W.J. da Silva Júnior, L. Caesar, K.L.
Haag, A.T. de Carvalho, V.Q. Balbino. Identificação da comunidade bacteriana intestinal de
Melipona scutellaris para três ecorregiões distintas no brasil com base em dados metabarcode do
gene 16S.

RESUMO - As abelhas meliponinis apresentam diversas espécies encontradas no Brasil. *Melipona scutellaris* pertencente a esse grupo tem grande importância social, econômica e ambiental principalmente na região Nordeste do país, que é considerada a região original de sua distribuição. Porém, devido a características relacionadas a seu mel, essa espécie vem ganhando uma outra realidade de distribuição sendo translocada até o Sul do país. Poucos estudos foram realizados com *M. scutellaris*, menos ainda quando se trata da microbiota associada. As bactérias exercem diversos papéis de extrema importância para as abelhas. A identificação dessa microbiota e quais os papéis de cada bactéria, ajudam a elucidar diversas questões, como o porquê da variação de microbiota para a mesma espécie em diferentes ecorregiões. É com objetivo de identificar as bactérias presentes no trato intestinal de *M. scutellaris* e comparar a riqueza e abundância desses microrganismos em abelhas coletadas de três ecorregiões que esse trabalho foi realizado. Para isso sequenciamos a região V2-V3 do gene 16S, usando o DNA extraído do sistema digestivo de 30 abelhas para cada região. No total 13 filos foram identificados, os dominantes foram Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Bacterioides e os gêneros mais abundantes foram *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Floricoccus*, *Bombella*, *Pectinatus*, *Fruticobacillus* e *Snodgrassella*. Os índices de diversidade alfa e beta indicaram uma diferença de riqueza e abundância quando comparamos as bactérias encontradas no trato digestivo para as três regiões, sendo as abelhas coletadas em Mossoró-RN as que tiveram o maior índice de riqueza, seguido por Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS.

PALAVRAS-CHAVE: Abelha sem ferrão, Bactéria, Microbiota, Sequenciamento de Nova Geração.

IDENTIFICATION OF THE *MELIPONA SCUTELLARIS* GUT BACTERIAL COMMUNITY
FOR THREE DISTINCT LOCALITIES IN BRAZIL BASED ON METABARCODE DATA
FROM THE 16S GENE

ABSTRACT – The meliponinis bees have several species found in Brazil. *Melipona scutellaris* belonging to this group and has great social, economic, and environmental importance, especially in the Northeast region of Brazil, which is considered the original region of its distribution. However, because of the characteristics related to its honey this species has been getting another distribution reality being translocated to the South of the country. Few studies have been conducted with *M. scutellaris*, even less when it comes to the associated microbiota. Bacteria play several extremely important roles for bees. The identification of this microbiota and the roles of each bacterium help to elucidate many questions, such as why the microbiota variation for the same species in different locations. It is with the objective of identifying the bacteria present in the intestinal tract of *M. scutellaris* and comparing the richness and abundance of these microorganisms in bees collected from three locations that this work was carried out. For this we sequenced the V2-V3 region of the 16S gene, using DNA extracted from the digestive system of 30 bees for each region. In total 13 phyla were identified, the dominant ones were Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria and Bacterioides and the most abundant genera were *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Floricoccus*, *Bombella*, *Pectinatus*, *Fruticobacillus* and *Snodgrassella*. The alpha and beta diversity indices indicated a difference in richness and abundance when comparing the bacteria found in the digestive tract for the three regions, with bees collected in Mossoró-RN having the highest richness index, followed by Aldeia-PE and Novo Hamburgo-RS.

KEY WORDS: Bacteria, Microbiota, Next Generation Sequencing, Stingless Bees.

Introdução

De forma geral, organismos multicelulares apresentam uma relação de sinergismo com micro-organismos procarióticos e eucarióticos (Esser *et al.* 2018). Essas interações entre os micro-organismos e os hospedeiros são reconhecidas como uma única unidade funcional denominada como metaorganismo ou holobionte (Bosch & Miller 2016). A comunidade microbiana interage de uma forma a contribuir em diversos aspectos na fisiologia do hospedeiro, por exemplo, comportamento, desenvolvimento, metabolismo, imunidade, entre outros (Esser *et al.* 2018). Uma das maiores densidades microbianas pode ser encontrada no trato gastrointestinal de hospedeiros animais, a qual é responsável por uma série de atividades que implicam na sua participação desde o metabolismo e até na imunidade do hospedeiro (Esser *et al.* 2018; Hall *et al.* 2020).

Nos insetos, as associações com esses microrganismos não se diferem muito da relação existente entre microbiota e hospedeiros mamíferos, por exemplo. A microbiota intestinal de insetos pode exercer papéis que tanto beneficiam o hospedeiro, quanto podem causar problemas em situações de desequilíbrio da microbiota e aparecimento de patógenos (Engel & Moran 2013). Dentre as abelhas corbiculadas, principalmente *Apis mellifera*, a caracterização de bactérias e fungos que compõem a microbiota é bem documentada em recursos produzidos pela colônia como o pólen, mel, própolis, interior de colmeias e nos compartimentos que compõe o sistema digestivo das abelhas (Gilliam 1997, Hamdi *et al.* 2011, Engel *et al.* 2012, Jensen *et al.* 2013, Powell *et al.* 2014, Erban *et al.* 2017, Bovo *et al.* 2018, Martín-Hernández *et al.* 2018, Ellegaard & Engel 2019, McFrederick & Rehan 2019, Balzan *et al.* 2020, Wirta *et al.* 2021). As abelhas corbiculadas apresentam uma microbiota bacteriana intestinal central que é simples e consistente em diferentes colônias e regiões, e que é obtida a partir do forrageamento em flores (Kwong *et al.* 2017,

McFrederick *et al.* 2012). Além da participação de bactérias simbiontes na proteção contra patógenos, a microbiota também auxilia na fermentação do pólen (Vásquez e Olofsson, 2009).

Das mais de 500 espécies de abelhas sem ferrão identificadas ao redor do mundo (Michener, 2013), pouco mais de 20 espécies de abelhas sem ferrão tiveram a microbiota caracterizada (Leonhardt & Kaltenpoth 2014, Diaz *et al.* 2017, Kwong *et al.* 2017, Cerqueira *et al.* 2021, Tang *et al.* 2021, de Sousa 2021). Entretanto, ainda existe uma escassez de informações referente à dinâmica populacional bacteriana dentro do gênero *Melipona* (Diaz *et al.* 2017, Cerqueira *et al.* 2021). Uma doença recorrente conhecida como mal de março levou Diaz *et al.* (2017) a investigar uma possível causa analisando a microbiota de *M. quadrifasciata*, porém os autores não encontraram um padrão que se associasse às amostras doentes. Um levantamento da microbiota em espécies do gênero *Melipona* spp. de diferentes biomas brasileiros, Cerqueira *et al.* (2021) observou a perda de importantes simbiontes de abelhas sociais corbiculadas dentro do gênero *Melipona*.

Melipona scutellaris (Meliponini), tinha originalmente sua distribuição restrita às florestas úmidas do litoral brasileiro, do Rio Grande do Norte até a Bahia, com uma população geneticamente diferenciada na Chapada Diamantina (Alves *et al.* 2012). Translocadas para as regiões Sul, Sudeste e na região de Caatinga incluindo Mossoró-RN em virtude do seu potencial como produtora de um mel de excelente qualidade, de fácil aclimação às diferentes regiões e fácil manejo (Nogueira-Neto 1997, Imperatriz-Fonseca *et al.* 2007, Alves *et al.* 2012). Popularmente conhecida como urucu nordestina, *M. scutellaris* até então não teve seu microbioma intestinal caracterizado. Alguns estudos com espécies de abelhas sem ferrão mostraram que a relação geográfica pode modular a comunidade bacteriana (Liu *et al.* 2021), fenômeno também observado em *A. mellifera*, onde colônias de diferentes regiões geográficas, expostas às condições ambientais diferentes, divergiam em diversidade e abundância de táxons bacterianos (Hroncova *et al.* 2015, Ge *et al.* 2021).

O Brasil abrange em seu território seis biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. A presença desses biomas em território brasileiro faz com que possamos encontrar as mais diversas condições de vegetação, fauna e clima (Ministério do Meio Ambiente 2021). Na região Nordeste, há a predominância dos biomas Caatinga e Mata Atlântica. O primeiro deles, Caatinga, é uma das ecorregiões com maior biodiversidade de clima semiárido, caracterizado por vegetação de árvores baixas, troncos tortos com poucas folhas e adaptadas aos períodos de seca (Araújo *et al.* 2005). Por outro lado, o bioma Mata Atlântica, compreende os tipos de florestas: florestas ombrófilas densas e abertas e floresta sazonal semidecídua (Joly *et al.* 1999). Na região Sul do Brasil, no estado do Rio Grande do Sul, encontra-se o bioma Pampa localizado na Zona Temperada do Sul que é caracterizado por prados contendo arbustos e árvores (Roesch *et al.* 2009).

Levando-se em consideração a distribuição atual da espécie *M. scutellaris* e as diferentes características geográficas onde as colônias destas espécies estão inseridas, o objetivo deste estudo é descrever a comunidade bacteriana, com base no gene do rRNA 16S, encontrada no trato intestinal de *M. scutellaris* de três diferentes ecorregiões do Brasil: Mossoró-RN, Novo Hamburgo-RS e Recife-PE.

Material e Métodos

Amostras

Indivíduos adultos da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* foram coletados em três ecorregiões diferentes, Aldeia-PE, Mossoró-RN e Porto Alegre-RS (Figura 1). Para cada local foram coletadas 10 abelhas de três colmeias diferentes, sendo cinco capturadas com auxílio de pinça dentro da colmeia, na área de cria e cinco capturadas na entrada da colmeia com auxílio de um sugador, resultando em 30 amostras por localidade e 90 no total (Tabela 1). As abelhas foram

armazenadas individualmente em eppendorf de 2ml, contendo álcool 70% e logo após alocados em freezer a -4°C.

As amostras de Aldeia-PE foram coletadas no Meliponário Aldeia que se localiza no município de Camaragibe, região metropolitana do Recife, Capital do Estado de Pernambuco. Apresenta 34 colônias manejadas em caixas do tipo nordestina, em uma área seminatural de Floresta Atlântica com pomar de fruteiras nativas e cultivadas, de aproximadamente 3 hectares. A área apresenta clima muito úmido, com floresta perenifólia e chuvas ao longo de todo o ano, exceto pelo curto período de setembro à dezembro, quando a precipitação diminui. É uma área de ocorrência natural de *M. scutellaris* e ninhos nativos já foram localizados nas proximidades.

Em Mossoró-RN as abelhas foram coletadas em um meliponário urbano, com cerca de 15 colônias manejadas em caixas tipo nordestina translocadas para a região em 2014, provenientes de Natal – RN e Igarassu – PE. O clima da região é semiárido muito quente com chuvas irregulares concentradas nos meses de março a abril (Carmo Filho & Oliveira 1989). Na caatinga o manejo da espécie é intensivo, com alimentação artificial energética de água e açúcar ministrado quinzenalmente às colônias. Já em Novo Hamburgo-RS, as coletas foram realizadas em ninhos provenientes de um Meliponário em uma área semiurbana com elementos de floresta mista (Floresta Atlântica com elementos de Floresta de Araucárias) (IBGE 2012). Caixas do tipo INPA manejadas intensivamente com alimentação energética e com aquecimento artificial durante o inverno foram selecionadas. O clima da região é subtropical com chuvas de inverno. A área do Meliponário apresenta vegetação nativa com elementos cultivados, especialmente *Eucaliptus* e árvores ornamentais.

Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído do sistema digestivo completo de cada uma das abelhas separadamente. Para isso as abelhas foram dissecadas em placas de petri contendo solução salina

tampão de fosfato estéril (PBS). Logo após a dissecação o sistema digestivo foi colocado em Eppendorf de 2ml para seguir com a extração de DNA. O DNA gnômico total foi extraído utilizando o PureLink® Genomic DNA Mini Kit K182002 conforme instruções do fabricante. E após a extração o DNA foi armazenado em freezer -4°C.

Metabarcoding de bactérias

Os segmentos correspondentes à região V3-V4 do gene RNAr 16S (464 pares de bases) de bactérias foram amplificados com os *primers* 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Klindworth et., 2013). Os primers foram sintetizados com etiquetas (*tags*) de 8 nucleotídeos na extremidade 5' dos primers *forward* e *reverse* (HONG et al., 2016). A escolha da marcação dos *primers* com *tags* tem por objetivo a multiplexação das amostras anteriormente à etapa de preparação da biblioteca para o sequenciamento, desta forma foi possível reduzir os custos nesta etapa do estudo. A amplificação dos fragmentos de DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, através de luz UV. Um controle negativo foi usado para certificação da ausência de contaminação nas reações de PCR.

Pooling e sequenciamento

Para o sequenciamento, todas as amostras foram normalizadas a uma concentração de 4 ng/μl. Adicionamos 5μl de cada amostra normalizada a um tubo de 1,5 mL como etapa anterior à preparação das bibliotecas de 16S. A partir dessa mistura (“pool”) foi realizada uma segunda diluição para uma concentração final de 2 ng/μl, que foram utilizadas na preparação das bibliotecas usando o kit Truseq Nano DNA LT Library Prep (Illumina, San Diego, Califórnia). O Protocolo de preparação das duas bibliotecas foi iniciado a partir da etapa de Limpeza de DNA Fragmentado e todos os passos posteriores realizados segundo o fabricante. O sequenciamento foi realizado na Plataforma Multiusuários de Genômica e Transcriptômica do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. O sequenciamento *paired end* das bibliotecas foi realizado

em um instrumento MiSeq, usando kit MiSeq Reagent kit V3 600 ciclos (Illumina, San Diego, Califórnia).

Processamento dos dados

As sequências brutas passaram primeiro por um processo de análise no FastQC para verificar a qualidade, e a presença de adaptadores, que foram removidos usando o Cutadapt para posterior análise que foram realizadas utilizando o Mothur (Schloss *et al.* 2009). Na etapa de corte, eliminamos sequências fora de tamanhos mínimos=150 pb e máximos= 500pb. Para o alinhamento das sequências e classificação das OTUs foi utilizado o banco de dados silva.nr_v138.pcr.align fornecido pelo próprio programa em seu site. Após a etapa de pré-cluster foi aplicado um comando adicional que separa as OTUs abundantes das OTUs raras e somente as OTUs abundantes foram utilizadas para análises posteriores. Sequências quiméricas também foram removidas através do software UCHIME (Edgar *et al.* 2011). A classificação das OTUs foi com base na similaridade de 97%, usando o método AGC de agrupamento baseado na abundância.

Rarefação, Índices de Diversidade e Visualização dos dados

Para criar um gráfico de rarefação, calcular as diversidades alfa e beta, microbioma central, Lefse (*Linear discriminant analysis Effect Size*) e visualização dos dados utilizamos a plataforma online MicrobiomeAnalyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>) (Dhariwal *et al.* 2017, Chong *et al.* 2020). Os dados analisados no MicrobiomeAnalyst não foram normalizados e transformados, porém passaram por um filtro de prevalência de 10% para contagens mínimas de quatro sequências.

A curva rarefação foi calculada a partir do número de sequências geradas no sequenciamento para cada uma das 89 amostras de abelhas. Para uma melhor visualização dos dados de abundância e dos principais filos, famílias e gêneros identificados, plotamos gráficos de barras com a abundância real dos três níveis taxonômicos para cada uma das amostras. As bactérias que fazem parte do microbioma central para cada região também foram identificadas para cada uma das

regiões estudadas, o microbioma central indica quais são as bactérias mais prevalentes na maioria das amostras analisadas.

Além de classificar as bactérias presente no sistema digestivo de *M. scutellaris*, buscamos identificar as diferenças na composição da comunidade bacteriana das abelhas em cada uma das três ecorregiões (Mossoró-RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS), através da riqueza e abundância das OTUs. Com essa finalidade calculamos a nível de gênero a diversidade alfa (OTUs observados, Chao1, Simpson, Shannon) que levam em consideração a riqueza e abundância de espécies, e teste estatístico de significância ANOVA para cada um dos índices de diversidade. Calculamos, também, a diversidade beta utilizando o Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) (Kruskal, 1964a,b) para computar a distância entre as amostras, com base na dissimilaridade de Bray-Curtis onde o fator localidade foi testado como fonte de variação. Além disso, para observar melhor o agrupamento entre as ecorregiões, baseado na composição de bactérias e melhor visualização dos dados, geramos um dendrograma utilizando o índice de Jaccard que aponta a proporção de espécies compartilhadas entre as amostras em relação ao número total de espécies.

Ainda usando o MicrobiomeAnalyst, calculamos o Lefse que emprega o teste de soma de classificação de Kruskal-Wallis para detectar características com abundância diferencial significativa para cada região, ou seja, quais são as OTUs mais significativas para a comunidade. Já o Diagrama de Venn foi elaborado a partir de uma planilha de presença e ausência das 220 OTUs nas três regiões usando a plataforma InteractiVenn (Heberle *et al.* 2015).

Resultados

Sequenciamento

Das 90 amostras iniciais, uma foi descartada (Novo Hamburgo - RS) devido a qualidade do DNA, antes do sequenciamento. O sequenciamento das 89 amostras das três ecorregiões estudadas resultou em 12.284.581 sequências. Após a filtragem por número de bases, só sequências que tinham entre 150 pb e 500 pb foram mantidas, permanecendo um total de 7.108.736, sendo 1.894.252 o número de sequências únicas. Após a filtragem por qualidade, que gerou um total de 7.021.000 sequências, os filtrados foram separados em dois grupos: um grupo de sequências raras e um outro grupo de sequências abundantes contendo 5.327.077 sequências usadas nas análises posteriores, e dessas o número de sequências únicas foi de 3.956, ou seja, sem contar o número de cópias da mesma sequência.

A análise de rarefação indica que nem todas as amostras atingiram o platô, porém para amostras das três cidades, houve uma boa representatividade de riqueza, com algumas amostras atingindo a saturação ou próximo a saturação, o que significa que a amostragem de dados foi suficiente para acessar a microbiota total das abelhas (Figura 2).

Análise da composição bacteriana

As sequências foram agrupadas em OTUs segundo o método de agrupamento ambicioso baseado em abundância (AGC, do inglês *Abundance-Based Greedy Clustering*), com o corte de 97% de similaridade (*label* = 0.03). Um total de 220 OTUs foram criadas compreendendo as amostras de Mossoró-RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS, que tiveram 189, 127 e 77 OTUs respectivamente e com uma média 40 ($\pm 13,68$), 33 ($\pm 7,84$) e 26 ($\pm 3,56$) OTUs por amostra. A amostra com maior riqueza de OTUs foi a M4F5 (Mossoró) com 78 OTUs e a menor foi para as amostras 16 (Novo Hamburgo) e M2C5 (Mossoró) com 19 OTUs. A terminologia NC (Não Identificada) foi utilizada para os táxons que não foram classificados em níveis superiores.

No total 13 filos foram identificados, os dominantes são *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Bacterioides*. As proporções de cada filo para as três cidades variaram (Figura 3).

O microbioma central para as classes de bactérias com prevalência de 20% e abundância relativa de 0.01% (Figura 4), apresenta *Bacilli* e *Actinobacteria* como as classes detectadas altamente abundantes para as três cidades amostradas e Alphaproteobacteria também representado como classe central para as regiões.

A nível de família, a comunidade bacteriana para Aldeia-PE e Mossoró-RN apresenta uma maior abundância de *Lactobacillaceae* e *Bifidobacteriaceae*. Em Mossoró-RN algumas amostras foram proporcionalmente mais abundantes para *Lactobacillaceae* e para as amostras M2C3, M3F5 e M4F3 que tiveram uma alta abundância de *Acetobacteriaceae*. Novo Hamburgo-RS foi mais abundante para *Bifidobacteriaceae* e *Lactobacillaceae* (Figura 5). Outras famílias como *Neisseriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Bdellovibrionaceae*, *Erythrobacteraceae*, *Nevskiaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Streptococcaceae*, *Actinobacteria*, *Atopobiaceae*, *Selenomonadaceae* e *Prevotellaceae* também foram identificadas.

Alguns gêneros de bactéria como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Floricoccus*, *Bombella*, *Pectinatus* e *Fruticobacillus*, *Snodgrassella* foram identificados dentre os mais abundantes no intestino das abelhas, porém em proporções diferentes para as três regiões (Figura 6). Diversas OTUs, até mesmo com alta abundância, não foram classificadas (NC) a nível de gênero e permaneceram só com a classificação de família ou classe.

Diversas OTUs tiveram sua abundância com proporções bem diferentes para as três regiões. Algumas OTUs como OTU15 (*Prevotellaceae_NC*) (90,00; 9,95; 0,05%), OTU 22 (*Acetobacteraceae_NC*) (56,34; 40,78; 2,88%), OTU21 (*Rosenbergiella*) (99,02; 0,88; 0,11%) e OTU25 (*Acinetobacter*) (99,49; 0,43; 0,07%), tiveram maiores proporções para Novo Hamburgo-RS, Aldeia-PE e Mossoró-RN respectivamente (Tabela 2).

Já OTUs como OTU12 (*Selenomonadaceae_NC*) (44,48; 55,30; 0,22%), OTU16 (*Pectinatus*) (31,76; 68,05; 0,19%), OTU20 (*Atopobiaceae_NC*) (33,58; 64,64; 1,78%) e OTU27

(*Fructobacillus*) (10,55; 89,30; 0,15%), foram melhor representadas para Aldeia-PE, sendo que as proporções para cada OTU são referentes a Novo Hamburgo-RS, Aldeia-PE e Mossoró-RN respectivamente (Tabela 2).

Em Mossoró-RN OTU19 (*Apilactobacillus*) (0,24; 0,23; 99,54%), OTU26 (*Aquabacterium*) (0,09; 0,04; 99,87%), OTU29 (*Bdellovibrio*) (0,07; 0,13; 99,80%) e OTU32 (*Novosphingobium*) (0,18; 45,99; 53,83%) tiveram as maiores proporções (Tabela 2). A OTU17 (*Snodgrassella*) teve 99,87% das suas sequências identificadas em Mossoró-RN, com elevada quantidade na amostra M4C1.

Algumas OTUs identificadas como *Azonexus*, *Lactobacillaceae*-NC, *Burkholderiales*-NC, *Comamonadaceae*-NC, *Acidovorax*, *Bacteria*-NC, *Bombilactobacillus*, *Aquabacterium*, *Hydrocarboniphaga*, *Pseudomonas* estavam presente nas amostras de Aldeia-PE e Mossoró -RN ou em ambas e totalmente ausente em Novo Hamburgo-RS. No Diagrama de Venn (Figura 7) podemos observar as OTUs compartilhadas e exclusivas de cada uma das cidades amostradas, todas as ecorregiões compartilham 51 OTUs, Mossoró-RN compartilha mais OTUs com Aldeia-PE (54) do que com Novo Hamburgo-RS (9) e tem também o maior número de OTUs exclusivas (75) (Figura 7).

Índices de diversidade e análise de agrupamento da comunidade bacteriana

A diversidade alfa e o valor de significância do p da Anova foram estimados para as colônias amostradas em cada uma das três ecorregiões, Aldeia-PE, Mossoró-RN e Novo Hamburgo-RS. Os índices de diversidade observada ($p=0,00004$) (Figura 8) e Chao1 ($p=0,000005$) (Figura 9) apontaram uma diferença significativa da diversidade nas colônias das três ecorregiões, com as colônias de Mossoró-RN com os maiores índices. Esses índices levam em consideração principalmente o número de espécies (riqueza) e não a abundância. Entretanto, a diversidade alfa

(Shannon e Simpson) não apresentou diferença significativa entre as colônias de Aldeia-PE, Mossoró-RN e Novo Hamburgo (Figuras 10 e 11).

A diversidade beta foi avaliada através da análise multivariada NMDS baseada no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis (Figura 12) com um valor de estresse de 0,20891. As amostras foram analisadas por localidade e observamos que há uma sobreposição entre as amostras de Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS, indicando uma forte similaridade entre as bactérias que compõem sua comunidade microbiana. No entanto, as amostras provenientes de Mossoró-RN apresentaram alguma dissimilaridade em relação às outras duas regiões. Resultado similar foi obtido através do índice de Jaccard, onde o padrão de agrupamentos se repetiu no dendrograma gerado (Figura 13).

O LefSe (análise discriminante linear do tamanho do efeito) determina as OTUs com maior probabilidade de explicar as diferenças entre as comunidades. 13 OTUs foram responsáveis por explicar as diferenças entre as três comunidades bacterianas (Figura 14), para Novo Hamburgo-RS o gênero *Bifidobacterium* foi o que mais teve efeito sobre a comunidade, entre as amostras de Mossoró-RN o maior efeito foi gerado pela *Lactobacillales*-NC e Aldeia-PE por *Acetobacteriaceae*-NC.

Discussão

No presente estudo realizamos uma caracterização da microbiota bacteriana presente no sistema digestivo da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* coletada nas cidades brasileiras de Aldeia-PE, Mossoró-RN e Novo Hamburgo-RS, onde características de Remanescente de Mata Atlântica, Semiárido e Floresta Ombrófila Mista estão presentes. Estudos que identificam as bactérias do sistema digestivo de abelhas sem ferrão são escassos, as abelhas melíferas têm sua microbiota melhor caracterizadas e por sua vez uma microbiota central bem estabelecida (Cox-Foster *et al.* 2007, Kwong & Moran 2016, Kwong *et al.* 2017). Encontramos um conjunto de

1737 bactérias no intestino de *M. scutellaris* comum a outras abelhas sem ferrão (Koch *et al.*, 2013,
1738 Leonhardt e Kaltenpoth 2014, Díaz *et al.* 2017, Kwong *et al.* 2017, Botina *et al.* 2019, Cerqueira *et*
1739 *al.* 2021, Hall *et al.* 2021, Liu *et al.* 2021, Tang *et al.* 2021), dominado pelos filos Firmicutes,
1740 Actinobacteria, Proteobacteria e Bacterioides e por gêneros como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*,
1741 *Snodgrassella*, *Fructobacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Bombella*, *Pectinatus*, *Rosenbergiella*,
1742 *Acinetobacter* e *Floricoccus*.

1743 Bactérias do ácido láctico (LAB) como *Lactobacillus* e outros *Lactobacillales*-NC do filo
1744 Firmicutes e *Bifidobacterium* (membro não verdadeiro desse conjunto de bactérias, porém produz
1745 ácido láctico) do filo Actinobacteria, e *Acetobacteraceae*-NC (bactérias do ácido acético) são uns
1746 dos grupos de bactérias mais abundantes em todas as amostras analisadas de *M. scutellaris*. Os
1747 vários filotipos desses gêneros são encontrados também em *Apis sp.*, *Bombus* e outras espécies de
1748 abelhas sem ferrão (Olofsson & Vásquez 2008, Kock & Schmid-Hempel 2011a, Martinson *et al.*
1749 2011, McFrederick *et al.* 2012, Leonhardt e Kaltenpoth 2014, Botina *et al.* 2019, Cerqueira *et al.*
1750 2021).

1751 Há indícios de que em *Apis*, *Bombus* e outros insetos essas bactérias exercem funções,
1752 inibindo patógenos, fermentação do pólen, ajudando na conversão de néctar em mel e auxiliando
1753 na metabolização de alimentos ricos em açúcar (Olossof e Vásquez 2008, Vásquez & Olossof 2009,
1754 Forsgren *et al.* 2010, Killer *et al.* 2010, Engel & Moran 2013). Porém alguns filotipos de
1755 *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* parecem serem exclusivos para espécies de abelhas (McFrederick
1756 *et al.* 2012), portanto a verdadeira função dessas bactérias encontradas em *M. scutellaris* e outros
1757 Meliponini, ainda são incertas para esse grupo de abelhas e precisam ser melhor estudadas para
1758 confirmar essas funções e como funciona essa relação entre abelhas Meliponas e essas bactérias
1759 (Cerqueira *et al.* 2021).

Floricoccus foi identificada em todas as amostras analisadas. Essa bactéria foi descrita em um único trabalho com abelhas sem ferrão, colonizando o sistema digestivo de outras espécies de *Melipona* (Cerqueira *et al.* 2021). A associação dessa bactéria com abelhas pode ser recente, porém segundo os pesquisadores aparenta ser estável, funcional, e possivelmente é adquirida a partir do ambiente, sendo esse gênero identificado em flores de hibiscus (Chuan *et al.* 2017, Cerqueira *et al.* 2021).

Os gêneros *Bombella* e *Snodgrassella* foram encontrados colonizando o sistema digestivo de *M. scutellaris*, porém, quase 92% das sequências de *Bombella* foram identificadas nas amostras de Mossoró-RN, apesar de estar presente em praticamente todas as amostras analisadas das outras regiões. *Snodgrassella* teve 99,86% de suas sequências registradas para Mossoró-RN, presente em 14 das 30 amostras dessa região, e dessas 99,45% das sequências estava presente em uma única amostra (M4C1). Esses dois táxons são considerados bactérias centrais em *A. mellifera* e, também, colonizam *Bombus sp.* (Martinson *et al.* 2011, Moran *et al.* 2012). Ambos gêneros são descritos como bactérias que exercem função proteção e nutrição (Koch & Schmid-Hempel 2011b, Engel *et al.* 2012, Corby-Harris *et al.* 2016, Motta *et al.* 2018, Miller *et al.* 2021), e foram identificadas em abelhas sem ferrão (Botina *et al.* 2018, Yun *et al.* 2018, Hall *et al.* 2021, Liu *et al.* 2021, Tanget *et al.* 2021).

Em relação a *Snodgrassella*, Cerqueira *et al.* (2021) evidencia que as espécies de *Melipona* podem estar perdendo essa bactéria, por não dependerem mais de *Snodgrassella* para contribuir na nutrição e proteção. Nossos dados de certa forma contribuem para essa afirmativa, devido à baixa ocorrência dessa bactéria em nossas amostras. Já no caso de *Bombella* um fator que poderia explicar a presença mais acentuada nas amostras de Mossoró-RN seria a distância geográfica e consequentemente o tipo de vegetação, clima da região, além disso a comunidade bacteriana de

abelhas sem ferrão indicar ser mais variável (Kwong et al. 2017, Jones et al. 2018a, Hall et al. 2021, Liu et al. 2021).

Alguns gêneros de bactérias como *Pectinatus*, *Rosenbergiella* e *Fructobacillus* são encontrados com menor frequência no sistema digestivo de abelhas sem ferrão e, também, em outros grupos de abelhas (Kwong et al. 2017, Praet et al. 2017, Botina et al. 2019, Hall et al. 2021). Bactérias destes gêneros foram identificadas em nossas amostras com abundâncias bem variadas nas três ecorregiões estudadas, em Mossoró-RN as abundâncias dessas bactérias foram menores que 1%, estando ausente em grande parte das amostras, o gênero *Rosenbergiella* teve 99% das suas sequências identificadas em Novo Hamburgo-RS e *Fructobacillus* 89,3% em Aldeia-PE.

Duas OTUs foram identificadas como Prevotallaceae-NC e *Bdellovibrio*, a primeira família de bactérias está associada positivamente ao sistema imunológico em camundongos e foi observado um aumento significativo dessa família no sistema digestivo de larvas de *A. mellifera* criadas *in vitro* após tratamento com glifosato podendo ser um indicador de resposta da microbiota ao inseticida, e apesar de dificilmente ser encontrada em abelhas, foi identificada no intestino de *Apis florea* como família dominante (Dai et al. 2018, Ding et al. 2019, Ganeshprasad et al. 2021).

Bdellovibrio são predadores obrigatórios de bactérias Gram-negativas (Stolp 1973) podendo afetar comunidades bacterianas e podendo ser um eficiente controlador de bactérias patogênicas (Oyedara et al. 2016, Bratanis et al. 2020, Sivakala et al. 2021), alguns trabalhos relataram a eficiência de *Bdellovibrio* como predador de bactérias patogênicas do gênero *Pseudomonas* e da ordem Burkholderiales (Saxon et al. 2014, McNeely et al. 2016). Porém, os dados para essas associações com abelhas são poucos, e mais raro ainda para abelhas sem ferrão. Os poucos trabalhos são limitados a identificar essas bactérias, sem discutir o seu papel (Tang et al. 2021).

Para os nossos resultados observamos que seis (todas de Mossoró-RN) amostras que apresentavam a OTU *Bdellovibrio* em quantidades bem expressivas, também apresentavam uma

relação positiva com bactérias do gênero *Pseudomonas*, família *Moraxellaceae* (Pseudomonadales), alguns representantes da ordem Burkholderiales (*Aquabacterium/ Acidovorax/ Burkholderiales*-NC/ *Comamonadaceae*-NC), *Methyloversatilis* e *Azonexus*. No entanto, a relação de todas essas bactérias com abelhas não é conhecida, principalmente se existe uma relação patogênica entre gêneros de *Pseudomonas*, ou membro da ordem Burkholderiales, e se *Bdellovibrio* seria predador desses patógenos. Novos estudos e mais levantamentos de microbiotas são necessários, para saber se essas bactérias são comumente encontradas em abelhas sem ferrão ou se realmente é um caso isolado.

Outra OTU identificada neste trabalho foi classificada como *Prevotellaceae* e 90% das sequências dessa bactéria foram provenientes de amostras de Novo Hamburgo-RS, em trabalhos realizados com exposição de organismos ao glifosato, bactérias da família *Prevotellaceae* tem sido relacionada positivamente com essa exposição, possivelmente relacionada a uma resposta imune (Larsen *et al.* 2017, Dechartres *et al.* 2019, Hu *et al.* 2021). Em *A. mellifera* a abundância de *Prevotellaceae* ao ser exposta ao glifosato foi significativamente maior do que o grupo de abelha não exposta (Dai *et al.* 2018). Para a região de Novo Hamburgo-RS não temos dados que comprovem a interação dessas abelhas com glifosato ou algum outro produto químico que pudesse justificar a presença de *Prevotellaceae*, porém não podemos descartar a possibilidade, já que pesticidas são amplamente utilizados no Brasil (Braga *et al.* 2020, Nunes *et al.* 2021).

Como podemos observar, assim como nesse e em outros trabalhos aqui expostos a diferença em relação a composição e abundância de bactérias encontradas nas abelhas são comuns e diferentes fatores podem estar relacionados a essas diferenças. Alguns trabalhos com abelhas que analisam diferentes fatores, sejam eles infecção, clima, opções de recursos, tamanho corporal ou asa, tamanho das colônias, status social, idade dos indivíduos ou distância geográfica; usam diferentes índices de diversidade para entender mais como a comunidade bacteriana se comporta diante desses fatores,

ou utilizam deles para explicar as diferenças entre as comunidades (Koch *et al.* 2012, Cariveau *et al.* 2014, Jones *et al.* 2018b, Yun *et al.* 2018, Kešnerová *et al.* 2020).

Nossas amostras foram coletadas em três ecorregiões distantes geograficamente, com clima e formação faunística bem distintas e em duas dessas ecorregiões (Mossoró-RN e Novo Hamburgo-RS) essas abelhas são introduzidas. Diversas OTUs foram compartilhadas entre amostras de Mossoró-RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS, e tiveram abundâncias variadas, além disso encontramos OTUs exclusivas para amostras de cada ecorregião coletada, o que gerou diferenças nos índices diversidade alfa.

Para a diversidade de OTUs Observadas e índice de Chao1 teve diferença significativas entre as ecorregiões levantadas, esses índices refletem a riqueza de bactérias encontrada nas abelhas desses locais, é possível observar que existe uma tendência de maior riqueza de bactérias para as amostras de Mossoró-RN com amostras destoando com mais de 60 OTUs identificadas, o que reflete no índice de Chao1 que usa a riqueza de espécies como base para seu cálculo, indicando que em diversos intestinos de abelhas dessa região tiveram índices maiores. Quando comparadas as outras duas ecorregiões, principalmente Novo Hamburgo-RS.

Já para os índices de Shannon e de Simpson não houve diferença significativa entre as ecorregiões, esses índices estão relacionados com a riqueza e abundância das OTUs. As amostras de Mossoró-RN e Aldeia-PE apresentam amostras com valores de índices baixos o que significa uma baixa abundância e amostras com elevada abundância, enquanto as amostras de Novo Hamburgo-RS apresentam índices com faixas de valores menos variados entre suas amostras. Tang *et al.* 2021 observou o mesmo padrão de diversidade alfa encontrados aqui com diferenças significativas na riqueza da comunidade (Sobs e Chao) e não significativa para índices de diversidade Shannon e Simpson.

No agrupamento de similaridade como NMDS (diversidade beta) o dendrograma baseado no índice de Jaccard, tivemos amostras das três ecorregiões que se agrupavam apresentando uma composição de bactérias relacionadas e amostras principalmente de Mossoró-RN que destoam em sua composição das demais regiões e uma tendência maior de agrupamento das amostras de Aldeia-PE com Novo Hamburgo-RS.

Diferenças na composição bacteriana podem ser explicadas por diversos fatores como a localidade geográfica e história de vida das abelhas. As diferentes regiões geográficas onde essas abelhas são encontradas são compostas por vegetação e climas diferentes, esses fatores podem influenciar na estrutura da microbiota intestinal das abelhas, já que muitas bactérias são adquiridas do meio ambiente durante o forrageamento (McFrederick *et al.* 2012, Jones *et al.* 2017, McFrederick & Rehan 2019), especialmente os meliponíneos em que os indícios de que a maioria das bactérias são adquiridas nesse momento (Hall *et al.* 2021, Keller *et al.* 2021). Além disso estudos mostram que as diferentes plantas podem ser colonizadas por diferentes bactérias (Vannette 2020), e certos componentes do néctar podem alterar as bactérias intestinais das abelhas (Ma *et al.* 2020).

A influência da distância e regiões geográficas na diversidade microbiana de duas espécies de abelhas sem ferrão foi mostrada por Liu *et al.* (2021), o que corrobora as mesmas teorias por outros trabalhos (Soininen *et al.* 2007). Além disso, trabalhos não tendo esse viés como objetivo principal, também relacionaram o local como um fator que diferenciava a comunidade bacteriana de abelhas (Leonhardt & Kaltenpoth, 2014, Kwong *et al.* 2017, Jones *et al.* 2018a, Hall *et al.* 2021) tendo como uma das justificativas a paisagem onde as abelhas foram coletadas. Usando megaquilídeos como base de estudo, McFrederick *et al.* (2017) mostrou que essas abelhas e flores compartilham as mesmas bactérias e que a exposição a essas plantas além de atuarem como fontes de transmissão bacteriana, influenciam também na abundância de certas bactérias.

1878 Nos nossos estudos a ecorregião onde as abelhas foram coletadas provavelmente seria um
1879 fator muito importante já que nossas amostras foram coletadas em regiões bem distintas com biomas
1880 e climas bem diferentes, podemos dizer que até com características extremas. Vale ressaltar
1881 novamente que *M. scutellaris* em Mossoró-RN e Novo Hamburgo-RS são introduzidas, essas
1882 regiões não fazem parte da distribuição natural dessa espécie. Essas duas ecorregiões apresentam
1883 climas e vegetações distintas dos locais de ocorrência natural.

1884 Em Aldeia-PE a ocorrência de *M. scutellaris* é natural é situada em uma área que é um dos
1885 poucos remanescentes de Mata Atlântica do Nordeste de clima tropical do tipo As' (Köppen 1948).
1886 Com verões quentes e secos e invernos amenos e úmidos. As abelhas de Aldeia-PE apresentam uma
1887 microbiota, composta por bactérias compartilhadas entre as abelhas das duas regiões analisadas.

1888 Mossoró-RN apresenta um clima semiárido, que tem características de clima seco, com
1889 precipitações baixas e concentradas em poucos meses e altas temperaturas (Carmo Filho & Oliveira
1890 1989) e segundo Rodal & Sampaio (2002) uma das características da vegetação da caatinga são
1891 plantas com adaptações à deficiência hídrica (caducifólia, herbáceas anuais, suculência, acúleos e
1892 espinhos, predominância de arbustos e árvores de pequeno porte, cobertura descontínua de copas.

1893 Já em Novo Hamburgo-RS que faz parte da região metropolitana de Porto Alegre - RS, com
1894 clima subtropical, marcado por períodos de baixas temperaturas (Climate-data.org). De acordo com
1895 o Mapa de Cobertura Vegetal do Brasil (IBGE) o município de Novo Hamburgo encontra-se em
1896 uma área de dois biomas distintos, sendo parte do território em área do Bioma Pampa e parte em
1897 área de Mata Atlântica. A vegetação é a típica de áreas de inundação com campos úmidos e presença
1898 de matas ciliares, no entanto, o município ainda apresenta vegetação de Floresta Ombrófila Mista,
1899 de árvores baixas ou arbustos arborescentes (Plano Municipal de Saneamento Básico – 2014,
1900 Serviço Florestal Brasileiro 2018).

Tendo que *M. scutellaris* ocorre naturalmente em florestas de clima úmido e ameno e que nossas amostras foram translocadas para ecorregiões de clima semiárido seco com altas temperaturas e para um clima subtropical marcado com períodos de baixas temperaturas, essa condição pode ser um diferencial na composição bacteriana de nossas amostras. A abelha sem ferrão *Partamona orizabaensis* teve sua atividade de voo afetada e consequentemente seu comportamento competitivo por recursos devido a influência de fatores climáticos, podendo levar a um menor nível de recursos, ou seja, menos visitas a diferentes plantas (Keppner & Jarau 2016) podendo assim afetar na diversidade microbiana das abelhas.

Essas diferenças marcantes de cada localidade, pode ser um dos fatores que diferenciam a microbiota de *M. scutellaris*, porém não podemos afirmar ao certo se é o único ou o quanto ele influencia, já que os estudos para espécies de abelhas sem ferrão e mais especificamente *M. scutellaris* em relação a microbiota intestinal quase não existem. Os estudos que podemos nos basear ainda são relacionados principalmente *A. mellifera*.

Para entender um pouco melhor a dinâmica da colonização bacteriana, suas diferenças, influências e importância desses microrganismos para nutrição, saúde e sobrevivência de *M. scutellaris* assim como outras abelhas sem ferrão, são necessários amplos estudos. Recentemente, o cenário tem sido favorável para nossas abelhas nativas, trabalhos de grande importância como o de Cerqueira *et al.* (2021) com diversas populações de *Melipona* brasileira que mostrou um possível ganho e perda de linhagens bacterianas e como isso pode afetar essas abelhas, e Díaz *et al.* 2016 com *M. quadrifasciata*, com a investigação da microbiota para identificar possíveis doenças; têm demonstrado mais ainda a importância de novos estudos.

Outros trabalhos fora do Brasil com abelhas sem ferrão como o de Hall *et al.* (2021) e Liu *et al.* (2021) que usam ferramentas para identificar a microbiota intestinal das abelhas e explicar a

variação na abundância e riqueza de bactérias em diferentes regiões geográficas e a influência da translocação de colmeias, acrescentam na discussão e entendimento de trabalhos como o nosso.

Portanto, obtivemos resultados importantes sobre a microbiota bacteriana de *M. scutellaris*. Observamos que existem famílias de bactérias que são centrais e estão presentes em todas as amostras, assim como alguns gêneros, mas também observamos diferenças de riqueza e abundância de famílias e gêneros de bactérias colonizando o sistema digestivo dessas abelhas. Talvez, um elemento chave para essas diferenças seja a localidade (diferença geográfica) onde as abelhas foram coletadas. Analisamos amostras de colônias dentro da distribuição original da espécie e que foram translocadas para outras regiões. Apesar dos interessantes resultados obtidos aqui, ainda são necessários mais levantamentos como esse para elucidar melhor a dinâmica da microbiota de *M. scutellaris*.

Agradecimentos

Agradeço a CAPES pela concessão da Bolsa, ao programa de Pós-graduação em Entomologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva. Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, à Associação A.B.E.L.H.A e ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA pelo financiamento do projeto, Edital CNPq/ABELHA/IBAMA – 400597/2018-7; Licença de coleta SISBIO - 67393-1; SISGEN Cadastro nº A1B8F1F.

Literatura Citada

Ambika M.B., S. Ratering, V. Rusch, A. Schwiertz, R. Geissler-Plaum, M. Cardinale, & S. Schnell. 2016. Bacterial microbiota associated with flower pollen is influenced by pollination type, and shows a high degree of diversity and species-specificity. *Environ Microbiol*, 18: 5161-5174.

- Anjum, S.I., A.H. Shah, M. Aurongzeb, J. Kori, M.K. Azim, M.J. Ansari & L. Bin. 2018.** Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan. Saudi J. Biolog Sci. 25: 388–392
- Araújo, F.S., M.J.N. Rodal & M.R.V. Barbosa. 2005.** Análise das variações da biodiversidade do bioma caatinga: suporte a estratégias regionais de conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. P.446
- Bäckhed, F., R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson & J.I. Gordon. 2005.** Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science. 25: 1915-1920.
- Bajaj, J.S., D.M. Heuman, P.B. Hylemon, A.J. Sanyal, M.B. White, P. Monteith, N.A. Noble, A.B. Unser, K. Daita, A.R. Fisher, M. Sikaroodi & P.M. Gillevet. 2014.** Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. J Hepatol. 60: 940-947.
- Balzan, S., L. Carraro, R. Merlanti, L. Lucatello, F. Capolongo, F. Fontana, E. Novelli, I. Larini, N. Vitulo & B. Cardazzo. 2020.** Microbial metabarcoding highlights different bacterial and fungal populations in honey samples from local beekeepers and market in northeastern Italy. Int J Food Microbio. 334: 108806
- Beng, K.C & R.T. Corlett. 2019.** Amplicon sequencing dataset of soil fungi and associated environmental variables collected in karst and non-karst sites across Yunnan province, southwest China. Data in brief. 27: 104575,
- Bosch, T.C & D.J. Miller. 2016.** The holobiont imperative: Perspectives from early emerging animals. Springer-Verlag Wien. 155p.
- Bovo, S., A. Ribani, V.J. Utzeri, G. Schiavo, F. Bertolini & L. Fontanesi. 2018.** Shotgun metagenomics of honey DNA: Evaluation of a methodological approach to describe a multikingdom honey bee derived environmental DNA signature. PloS ONE. 13: e0205575.
- Bratanis, E., T. Andersson, R. Lood & E. Bukowska-Faniband. 2020.** Biotechnological potential of *Bdellovibrio* and like organisms and their secreted enzymes. Front. Microbiol. 11:662.
- Cani, P.D. & N.M. Delzenne. 2009.** The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. Curr Pharm Des. 15: 1546–1558.
- Cariveau, D., J.E. Powell, H. Koch, W. Rachael & N.A. Moran. 2014.** Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*). ISME J. 8: 2369–2379.
- Carmo Filho, F. & O.F. Oliveira. 1989.** Mossoró: um município do semiárido: caracterização climática e aspecto florístico. Mossoró: UFERSA, 1989. 62 p. (Coleção Mossoroense, 672, série B).

- Cerqueira, A.E.S., T.J. Hammer, N.A. Moran, W.C. Santana, M.C.M. Kasuya & C.C. da Silva. 2021.** Extinction of anciently associated gut bacterial symbionts in a clade of stingless bees. *ISME J.* 15:2813-2816.
- Chong, J., P. Liu, G. Zhou, & J. Xia. 2020** "Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data" *Nat Protoc.* 15: 799–821.
- Chuah, L.O., K.P. Yap, A.K. Shamila-Syuhada, K.L. Thong, R. Ahmad, M.T. Liong, G. Rusul. 2017.** *Floricoccus tropicus* gen. nov., sp. Nov. and *Floricoccus penangensis* sp. Nov. isolated from fresh flowers of durian tree and hibiscus. *Int J Syst Evol Microbiol.* 67: 4979-4985.
- Climate-Data.org** - climate-data.org/america-do-sul/brasil/rio-grande-do-sul/novo-hamburgo-4791/ acessado dia 20 de outubro de 2021.
- Corby-Harris, V., L. Snyder, C.A.D. Meador, R. Naldo, B. Mott, K.E. Anderson. 2016.** *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. Nov., improves honey bee (Hymenoptera: Apidae) resistance to *Nosema*. *J Econ Entomol.* 109: 537–543.
- Dai, P., Y. Zhenxiong, S. Ma, Y. Yang, Q. Wang, C. Hou, Y. Wu, Y. Liu & Q. Diao. 2018.** The herbicide Glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of Honey Bee during larvae reared in Vitro. *J Agric Food Chem.* 66: 7786-7793.
- De Sousa, L.P. 2021.** Bacterial communities of indoor surface of stingless bee nests. *PloS ONE*, 16: e0252933.
- De Vega, C., S. Álvarez-Pérez, R.G. Albaladejo, S-L. Steenhuisen, M-A. Lachance, S.D. Johnson & C.M. Herrera. 2021.** The role of plant–pollinator interactions in structuring nectar microbial communities. *J Ecol.* 109: 3379– 3395.
- Dechartres, J., J.L. Pawluski, M-M. Gueguen, A. Jablaoui, E. Maguin, R. Moez & T.D. Charlier. 2019.** Glyphosate and glyphosate-based herbicide exposure during the peripartum period affects maternal brain plasticity, maternal behaviour and microbiome. *J. Neuroendocrinol.* 31: e12731.
- Dhariwal, A., J. Chong, S. Habib, I. King, L.B. Agellon, & J. Xia. 2017.** MicrobiomeAnalyst - a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data". *Nucleic Acids Res.* 45: 180-188.
- Ding, Y., Y. Yan, D. Chen, L. Ran, J. Mi, L. Lu, B. Jing, X. Li, X. Zeng & Y. Cao 2019.** Modulating effects of polysaccharides from the fruits of *Lycium barbarum* on the immune response and gut microbiota in cyclophosphamide-treated mice. *Food & Function*, 10: 3671-3683
- Edgar, R.C. 2010.** Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* 26:2460–2461.

- Edgar, R.C., B.J. Haas, J.C. Clemente, C. Quince & R. Knight. 2011.** UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinform.* 27: 2194–2200.
- Ellegaard, K.M. & P. Engel. 2019.** Genomic diversity landscape of the honey bee gut microbiota. *Nat Commun.* 10:446.
- Endo, A., Y. Futagawa-Endo & L.M.T. Dicks. 2009.** Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Syst Appl Microbiol.* 32: 593–600.
- Engel, P., V.G. Martinson & N.A. Moran. 2012.** Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *PNAS.* 109: 11002–11007.
- Engel, P. & N.A. Moran. 2013.** The gut microbiota of insects – diversity in structure and Function. *FEMS Microbiol Rev* 37: 699–735.
- Erban, T., O. Ledvinka, M. Kamler, M. Nesvorna, B. Hortova, J. Tyl, D. Titera, M. Markovic & J. Hubert. 2017.** Honeybee (*Apis mellifera*)- associated bacterial community affected by American foulbrood: detection of *Paenibacillus larvae* via microbiome analysis. *Sci Rep.* 7:5084.
- Esser, D., J. Lange, G. Marinos, M. Sieber, L. Best, D. Prasse, J. Bathia, M.C. Rühlemann, K. Boersch, C. Jaspers & F. Sommer. 2019.** Functions of the microbiota for the physiology of animal metaorganisms. *J Innate Immun.* 11: 393–404.
- Evans, J.D. & R.S. Schwarz. 2011.** Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends Microbiol.* 19: 614-620.
- Forsgren, E., T.C. Olofsson, A. Vásquez & I. Fries. 2010.** Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie* 41: 99–108.
- Ganeshprasad, D.N., K. Jani, Y.S. Shouche & A.H. Sneharani. 2021.** Gut bacterial inhabitants of open nested honey bee, *Apis florea*, PREPRINT (Version 1) available at Research Square
- Ge, Y., Z. Jing, Q. Diao, J-Z. He & Y-J. Liu. 2021.** Host species and geography differentiate honeybee gut bacterial communities by changing the relative contribution of community assembly processes. *mBio* 12:e00751-21.
- Gilliam, M. 1997.** Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol Lett.* 155: 1–10.
- Hamdi, C., A. Balloi, J. Essanaa, E. Crotti, E. Gonella, N. Raddadi, I. Ricci, A. Boudabous, S. Borin, A. Manino, C. Bandi, A. Alma, D. Daffonchio & A. Cherif. 2011.** Gut microbiome dysbiosis and honey bee health. *J. Appl. Entomol.* 135: 524–533.
- Heberle, H., G.V. Meirelles, F.R. da Silva, G.P. Telles & R. Minghim, R. 2015.** InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinform.* 16:169.

- Hildebrand, F., R.Y. Tadeo, A.Y. Voigt, P. Bork & J. Raes. 2014.** LotuS2: an efficient and user-friendly OTU processing pipeline. *Microbiome*. 2: 30.
- Hroncova, Z., J. Havlik, J. Killer, I. Daskocil, J. Tyl, M. Kamler, T. Dalibor, H. Josef, M. Jakub, B. Vera & R. Vojtech. 2015.** Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location. *PLoS ONE* 10: e0118707.
- Hu, J., C. Lesseur, Y. Miao, F. Manservigi, S. Panzacchi, D. Mandrioli, F. Belpoggi, J. Chen & L. Petrick 2021.** Low-dose exposure of glyphosate-based herbicides disrupt the urine metabolome and its interaction with gut microbiota. *Sci Rep* 11, 3265.
- Jensen, A.B., K. Aronstein, J.M. Flores, S. Vojvodic, M.A. Palacio & M. Spivak. 2013.** Standard methods for fungal brood disease research. *J Apicul Res*. 52: 1-20.
- Jessy, P., P. Anneleen, S-H. Regula, M. Ivan, S. Guy & V. Peter. 2017.** Large-scale cultivation of the bumblebee gut microbiota reveals an underestimated bacterial species diversity capable of pathogen inhibition. *Environ. Microbiol*. 20: 214-227.
- Joly, C.A., M.P.M. Aidar & C.A. Klink. 1999.** Evolution of the Brazilian phytogeography classification systems: implications for biodiversity conservation. *Ciência e Cultura*. 51: 331-348.
- Jones, J.C, C. Fruciano, F. Hildebrand, H. Al Toufalilia, N.J Balfour, P. Bork, P. Engel, F.L.W. Ratnieks & W.O.H. Hughes. 2018a.** Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecol Evol*. 8: 441– 451.
- Jones, J.C., C. Fruciano, J. Marchant, F. Hildebrand, S. Forslund, P. Bork, P. Engel & W.O.H. Hughes. 2018b.** The gut microbiome is associated with behavioural task in honey bees. *Insect. Soc*. 65: 419–429.
- Keller, A., Q.S. McFrederick, P. Dharampa, S. Steffan, B.N. Danforth, S.D. Leonhardt. 2021.** (More than) Hitchhikers through the network: the shared microbiome of bees and flowers. *Curr Opin Insect Sci*. 44: 8-15.
- Keppner, E.M. & S. Jarau. 2016.** Influence of climatic factors on the flight activity of the stingless bee *Partamona orizabaensis* and its competition behavior at food sources. *J Comp Physiol*. 202: 691–699.
- Kešnerová L, O. Emery, M. Troilo, J. Liberti, B. Erkosar & P. Engel. 2020.** Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *ISME J* 14: 801–814.
- Koch, H. & P. Schmid-Hempel. 2011a.** Bacterial communities in Central European Bumblebees: Low diversity and high specificity. *Microb Ecol*. 62: 121–133.
- Koch, H. & P. Schmid-Hempel. 2011b.** Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *PNAS*. 108: 19288–19292.

- Kruskal, J.B. (1964a).** Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika*. 29: 1–27
- .
- Kruskal, J.B. (1964b).** Nonmetric multidimensional scaling: A numerical method. *Psychometrika*. 29: 115–129.
- Kwong, W.K., L.A. Medina, H. Koch, K-W. Sing, E.J.Y. Soh, J.S. Ascher, R. Jaffé & N.A. Moran. 2017.** Dynamic microbiome evolution in social bees. *Sci. Adv.* 3: e1600513
- Larsen, J.M. 2017.** The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*. 151: 363–374.
- Lebonah, D.E., A. Dileep, K. Chandrasekhar, S. Sreevani, B. Sreedevi & J. Pramoda Kumar. 2014.** DNA barcoding on bacteria: A review. *Adv. Biol.* 2014: 1-9.
- Leonhardt, S.D. & M. Kaltenpoth. 2014.** Microbial communities of three sympatric Australian stingless bee species. *PLoS ONE* 9: e105718.
- Li, P-D., R. Jeewon, B. Aruna, H-Y. Li, F-C. Lin & H-K. Wang. 2019.** Metabarcoding reveals differences in fungal communities between unflooded versus tidal flat soil in coastal saline ecosystem. *Sci. Total Environ.* 690: 911-922.
- Ma, W.H., X.Y. Zheng, L.X. Li, J.S. Shen, W.H. Li & Y. Gao. 2020.** Changes in the gut microbiota of honey bees associated with jujube flower disease. *Ecotox Environ Safe* 198:11066.
- Martín-Hernández, R., C. Bartolomé, N. Chejanovsky, Y. Le Conte, A. Dalmon, C. Dussaubat, P. García-Palencia, A. Meana, M.A. Pinto, V. Soroker & M. Higes. 2018.** *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environ Microbiol.* 20:1302-1329.
- Martinson, V.G., B.N. Danforth, R.L. Minckley, O. Rueppell, S. Tingek & N.A. Moran. 2011.** A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol Ecol.* 20: 619–628.
- McFrederick, Q.S. & S.M. Rehan. 2019.** Wild Bee pollen usage and microbial communities co-vary across landscapes. *Microbiol Ecol.* 77: 513–522.
- McFrederick Q.S, J.M. Thomas, J.L. Neff, H.Q. Vuong, K.A. Russell, A.R. Hale & U.G. Mueller. 2017.** Flowers and wild *Megachilid* bees share microbes. *Microbiol Ecol* 73: 188–200.
- McFrederick, Q.S., W.T. Wcislo, D.R. Taylor, H.D. Ishak, S.E. Dowd & U.G. Mueller. 2012.** Environment or kin: whence do bees obtain acidophilic bacteria?. *Mol Ecol.* 21: 1754-1768.
- Michener, C.D. 2013.** The meliponini, p. 3–17 In: Vit, P., S.R.M. Pedro & D. Roubik (eds) *Pot-honey: a legacy of stingless bees*. New York, Springer, 697p.

- Miller, D.L., E.A. Smith & I.L.G. Newton. 2021.** A bacterial symbiont protects honey bees from fungal disease. *mBio* 12:e00503-21.
- Ministério do Meio Ambiente. 2021.** Disponível em: antigo.mma.gov.br/biomas.html . Acessado em 22 de outubro de 2021.
- Mohammad, S.M., N-K. Mahmud-Ab-Rashid & N. Zawawi. 2020.** Probiotic properties of bacteria isolated from bee bread of stingless bee *Heterotrigona itama*. *J Apicul Res*, 60: 1–16.
- Motta, E.V.S., K. Raymann & N.A. Moran. 2018.** Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci.* 115: 10305-10310
- Nunes, A., C. Schmitz, S. Moura & M. Maraschin. 2021.** The influence of recent Brazilian policy and legislation on increasing bee mortality. *Res., Soc. Dev.* 10: e36910414157.
- Olofsson, T.C. & A. Vásquez. 2008.** Detection and Identification of a Novel Lactic Acid Bacterial Flora Within the Honey Stomach of the Honeybee *Apis mellifera*. *Curr Microbiol.* 57: 356–363.
- Oyedara, O.O., E.J. De Luna-Santillana, O. Olguin-Rodriguez, X. Guo, M.A. Mendoza-Villa, J.L. Menchaca-Arredondo, T.O. Elufisan, J.A. Garza-Hernandez, I. Garcia Leon & M.A. Rodriguez-Perez. 2016.** Isolation of *Bdellovibrio* sp. from soil samples in Mexico and their potential applications in control of pathogens. *MicrobiologyOpen*. 5: 992–1002.
- Powell, J.E., V.G. Martinson, K. Urban-Mead, N.A. Moran. 2014.** Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 7378 –7387.
- Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies & F.O. Glöckner. 2013.** The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* 41: 590-596.
- Roesch, F.L., W. Costa, B. Vieira, A. Pereira, A.L. Schünemann, I.F. Teixeira, A. Julia, T. Senna, V.M Stefenon. 2009.** The Brazilian Pampa: A Fragile Biome. *Diversity* 1: 182–198.
- Rosal, M.J.N. & E.V.S.B. Sampaio. A vegetação do bioma caatinga, p. 11-24.** In: Sampaio, E.V.S.B., A.M. Giuliatti, J. Virgínio, C.F.L. Gamarra-Rojas (eds.), *Vegetação e flora da caatinga*. Recife, PNE/CNIP, 176p.
- Rouzé, R., A. Moné, F. Delbac, L. Belzunces & N. Blot. 2019.** The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*. *Microbes Environ.* 34:226-233.
- Saxon, E. B., R.W. Jackson, S. Bhumbra, T. Smith & R.E. Sockett. 2014.** *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 guards against *Pseudomonas tolaasii* brown-blotch lesions on the

- surface of post-harvest *Agaricus bisporus* supermarket mushrooms. BMC microbiol. 14: 1-11.
- Schloss, P.D., S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. Van Horn & C.F. Weber. 2009.** Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 75: 7537–7541.
- Serviço Florestal Brasileiro. 2018.** Inventário Florestal Nacional: principais resultados: Rio Grande do Sul. Brasília, DF: MMA, 83 p. (Série Relatórios Técnicos - IFN).
- Soininen, J., R. McDonald & H. Hillebrand. 2007.** The distance decay of similarity in ecological communities. Ecography. 30: 3-12.
- Stolp, H. 1973.** The *Bdellovibrios*: Bacterial Parasites of Bacteria. Annu Rev Phytopathol. 11: 53-76.
- Syed Yaacob, S. N., F. Huyop, R.K.R. Ibrahim, & R.A. Wahab. 2018.** Identification of *Lactobacillus* spp. and *Fructobacillus* spp. isolated from fresh *Heterotrigona itama* honey and their antagonistic activities against clinical pathogenic bacteria. J Apicul Res. 57: 395–405.
- Tang, Q.H., C.H. Miao, Y.F. Chen, Z-X. Dong, Z. Cao, S-Q. Liao, J-X. Wang, Z-W. Wang & J. Guo. 2021.** The composition of bacteria in gut and beebread of stingless bees (Apidae: Meliponini) from tropics Yunnan, China. Antonie van Leeuwenhoek 114: 1293–1305.
- Vannette, R.L. 2020.** The floral microbiome: Plant, pollinator, and microbial perspectives. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 51: 363–86
- Vásquez A & T.C. Olofsson. 2009.** The Lactic Acid Bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread, J. Apicult. Res 48: 189–195.
- Wirta, H., N. Abrego, K. Miller, T. Roslin & E. Vesterinen. 2021.** DNA traces the origin of honey by identifying plants, bacteria and fungi. Sci Rep. 11: 4798.
- Yu, D.W., Y. Ji, B.C. Emerson, X. Wang, C. Ye, C. Yang & Z. Ding. 2012.** Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. Methods Ecol Evol. 3: 613-623.
- Yun, J-H., M-J. Jung, P.S. Kim & J-W. Bae. 2018.** Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee. Sci Rep. 8: 1-11.
- Zeid, A.A.A., A.M. Khattaby, I.A.A El-Khair & H.I.A. Gouda. 2021.** Detection bioactive metabolites of *Fructobacillus fructosus* strain HI-1 isolated from honey bee's digestive tract against *Paenibacillus larvae*. Probiotics & Antimicro. Prot, 13: 1-10.

2280 Tabela 1. Relação das amostras coletadas nos estados de Pernambuco, Rio Grande do Norte e Rio
 2281 Grande do Sul, tipo de Bioma e situação para cada localidade de coleta.

Localidade	Local da caixa	Amostra	Bioma	Situação
Aldeia-PE	Dentro da colmeia	A2N1-A2N2-A2N3-A2N4- AN5	Remanescente de Mata atlântica	Nativa
Aldeia-PE	Entrada da colméia	A2F1-A2F2-A2F3-A2F4-A2F5	Remanescente de Mata atlântica	Nativa
Aldeia-PE	Dentro da colmeia	A10N1-10N2-10N3-10N4-10N5	Remanescente de Mata atlântica	Nativa
Aldeia-PE	Entrada da colméia	A10F1-A10F2-A10F3-A10F4-A10F5	Remanescente de Mata atlântica	Nativa
Aldeia-PE	Dentro da colmeia	A13N1-A13N2-A13N3-A13N4-A13N5	Remanescente de Mata atlântica	Nativa
Aldeia-PE	Entrada da colméia	A13F1-A13F2-A13F3-A13F4-A13F5	Remanescente de Mata atlântica	Nativa
Mossoró-RN	Dentro da colmeia	M2C1-M2C2-M2C3-M2C4-M2C5	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Entrada da colméia	M2F1-M2F2-M2F3-M2F4-M2F5	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Dentro da colmeia	M3C1-M3C2-M3C3-M3C4-M3C5	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Entrada da colméia	M3F1-M3F2-M3F3-M3F4-M3F5	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Dentro da colmeia	M4C1-M4C2-M4C3-M4C4-M4C5	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Entrada da colméia	M4F1-M4F2-M4F3-M4F4-M4F5	Semiárido	Introduzida
Novo Hamburgo-RS	Dentro da colmeia	1-2-3-4-5	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida
Novo Hamburgo-RS	Entrada da colméia	6-7-8-9-10	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida
Novo Hamburgo-RS	Dentro da colmeia	11-12-13-14-15	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida
Novo Hamburgo-RS	Entrada da colméia	16-17-18-19-20	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida
Novo Hamburgo-RS	Dentro da colmeia	21-22-23-24-25	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida

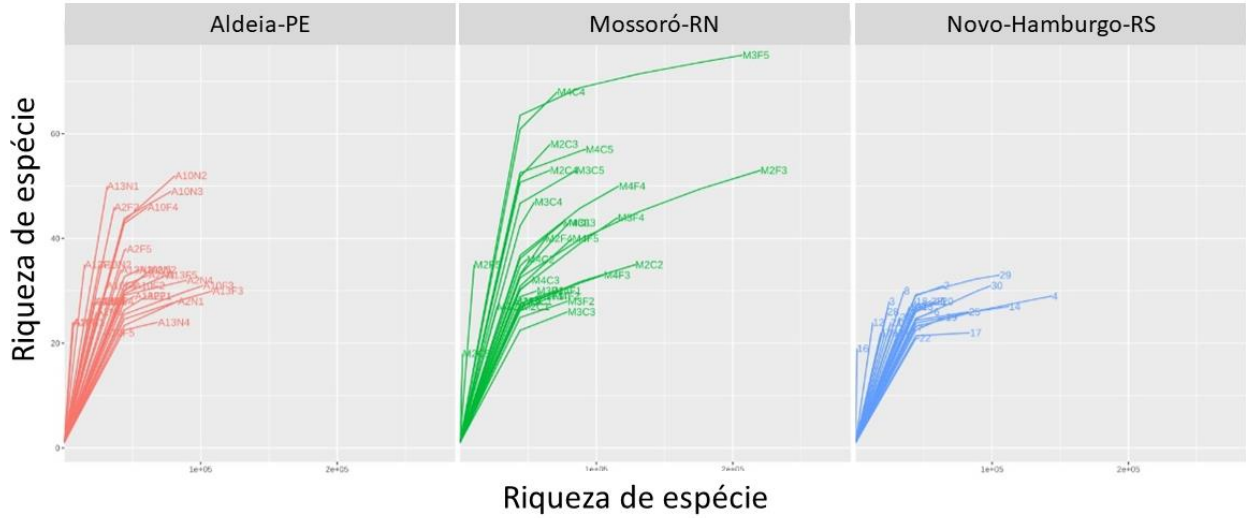
2282	Novo Hamburgo-RS	Entrada da colméia	26-27-28-29-30	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida
2283	Tabela 2. Proporções de OTUs (%) para as ecorregiões de Aldeia-PE, Mossoró-RN e Novo				
2284	Hamburgo-RS.				
	OTU	Aldeia-PE	Mossoró-RN	Novo Hamburgo-RS	
	OTU15 (<i>Prevotellaceae_NC</i>)	9,95	90	0,05	
	OTU22 (<i>Acetobacteraceae_NC</i>)	56,34	40,78	2,88	
	OTU21 (<i>Rosenbergiella</i>)	99,02	0,88	0,11	
	OTU25 (<i>Acinetobacter</i>)	99,49	0,43	0,07	
	OTU12 (<i>Selenomonadaceae</i>)	44,48	55,30	0,22	
	OTU16 (<i>Pectinatus</i>)	31,76	68,05	0,19	
	OTU20 (<i>Atopobiaceae_NC</i>)	33,58	64,64	1,78	
	OTU27 (<i>Fructobacillus</i>)	10,55	89,30	0,15	
	OTU19 (<i>Apilactobacillus</i>)	0,24	0,23	99,54	
	OTU26 (<i>Aquabacterium</i>)	0,09	0,04	99,87	
	OTU29 (<i>Bdellovibrio</i>)	0,07	0,13	99,80	
	OTU32 (<i>Novosphingobium</i>)	0,18	45,99	53,83	
2285					
2286					
2287					
2288					

2289



2290 Figura 1. Mapa do Brasil, com destaque para o local (ecorregiões) de coleta de *Melipona scutellaris*.
2291 Cidade de Mossoró no estado do Rio Grande do Norte, Camaragibe no estado de Pernambuco e a
2292 cidade de Novo Hamburgo localizado no estado do Rio Grande do Sul.

2293

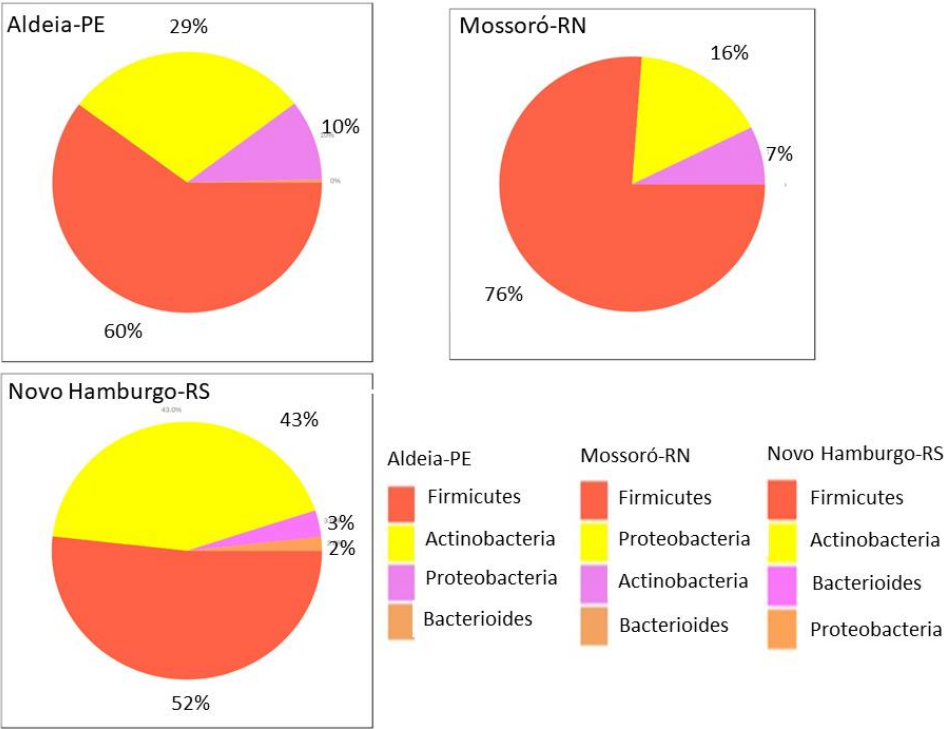


2294 Figura 2. Curva de rarefação, baseada na riqueza de espécies por amostra para as três regiões
2295 incluídas neste estudo.

2296

2297

2298



2299

2300 Figura 3. Proporção dos filos bacterianos dominantes encontrados no sistema digestivo das abelhas
2301 das colônias amostradas nas cidades de Aldeia-PE, Mossoró-RN e Novo Hamburgo-RS.

2302

2303

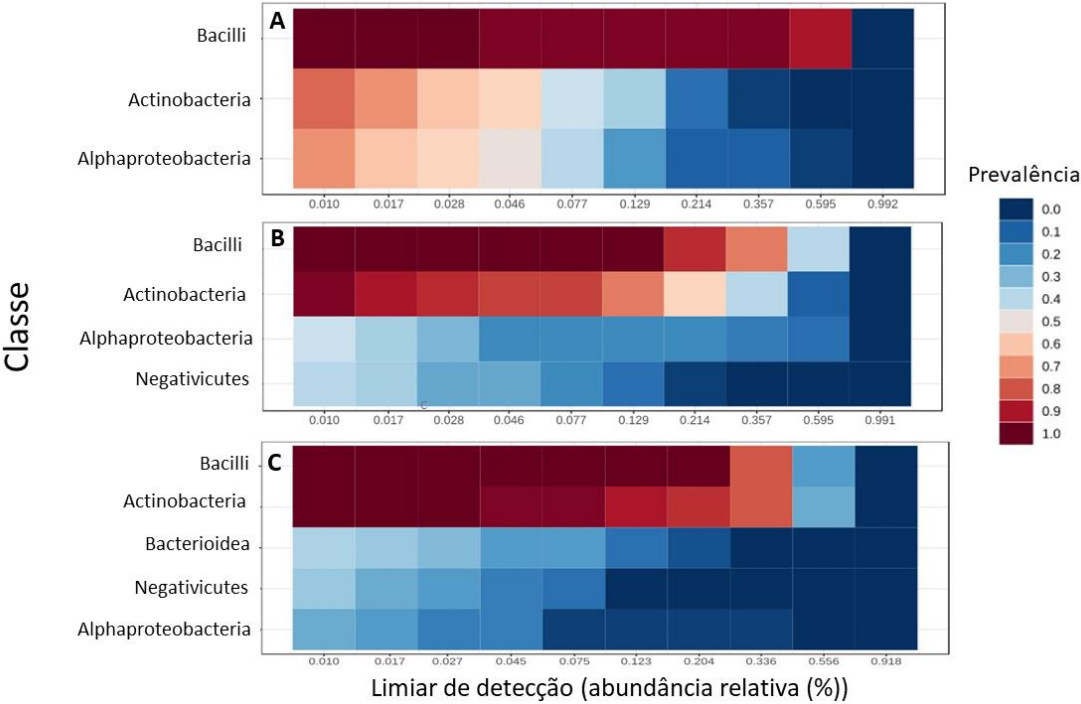


Figura 4. Análise do microbioma central com base na abundância relativa e prevalência de amostra de classe bacteriana em (A) Mossoró-RN, (B) Aldeia-PE e (C) Novo Hamburgo-RS.

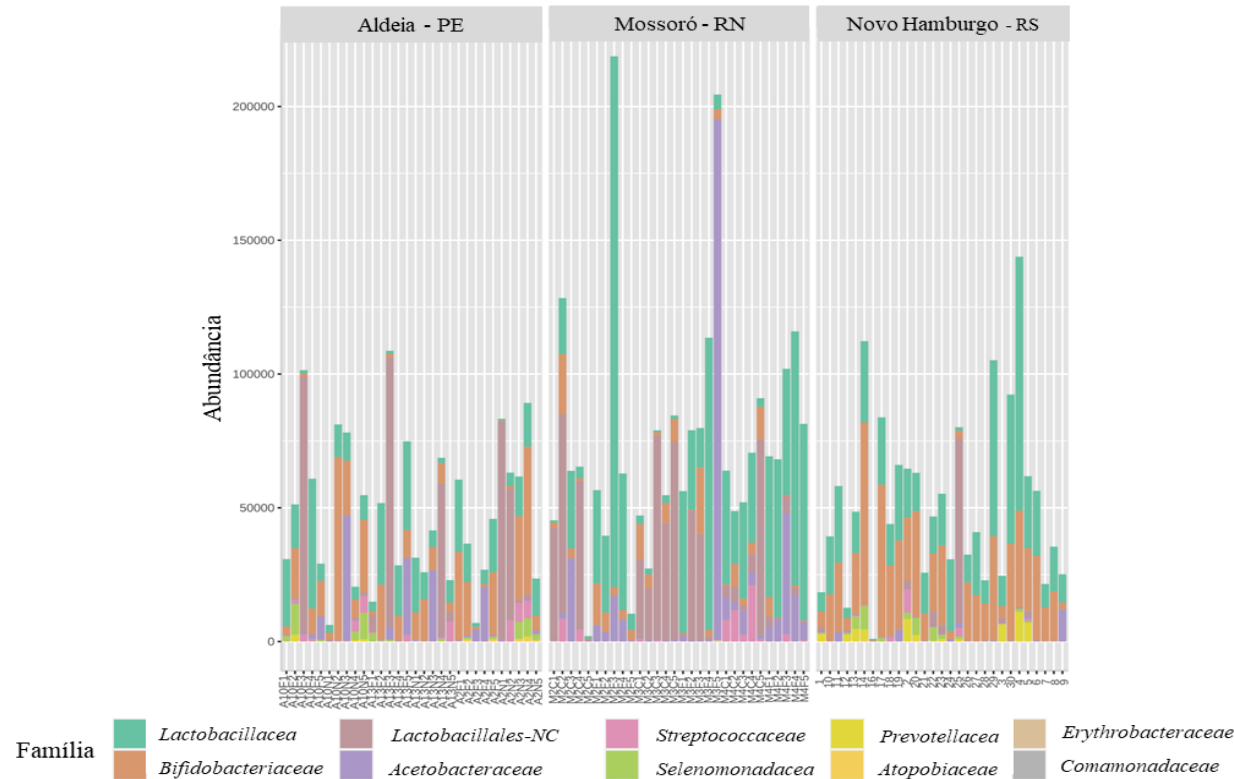
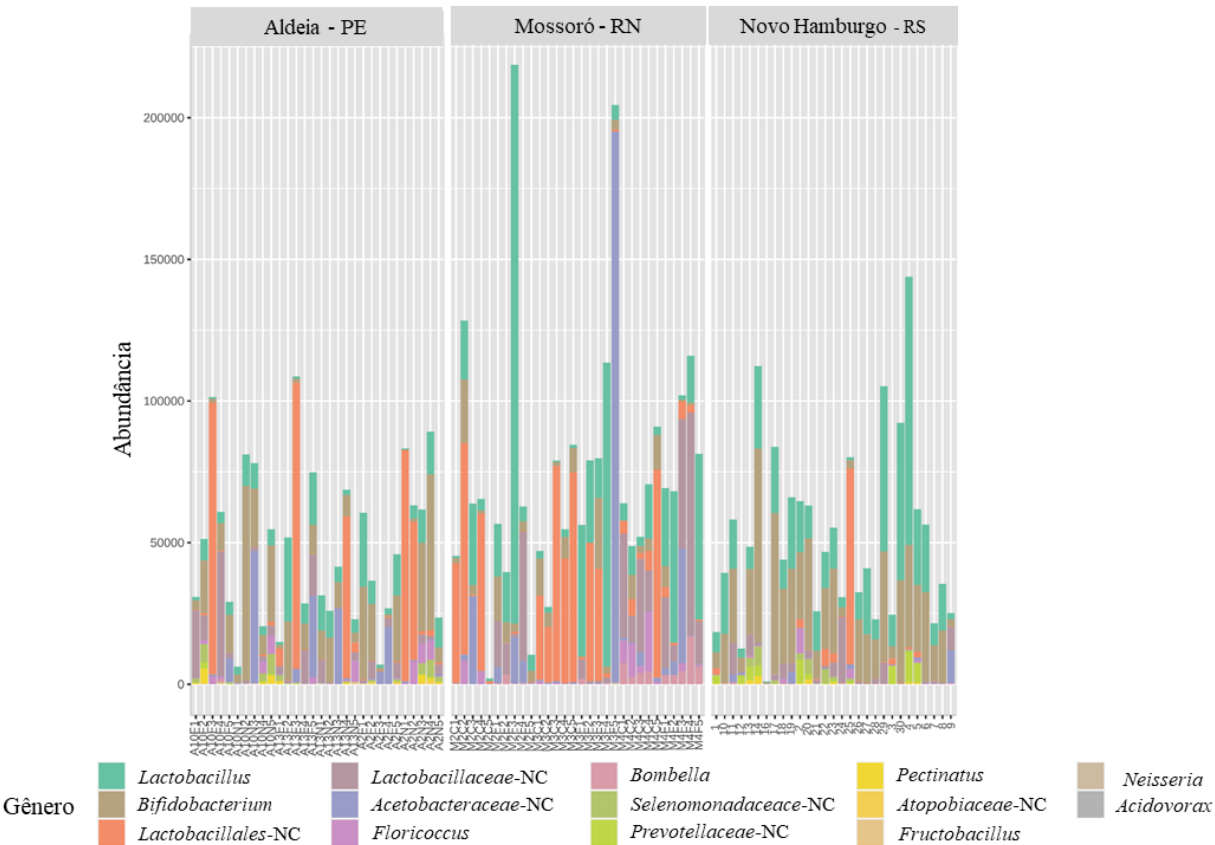


Figura 5. Abundância real das principais famílias bacterianas identificadas no sistema digestivo de cada amostra de *Melipona scutellaris* coletadas em três cidades com características fitogeográficas diferentes: Camaragibe Aldeia-PE (Floresta Atlântica), Mossoró-RN (Caatinga) e Novo Hamburgo (Floresta Atlântica/Pampa).

2312



2313

2314 Figura 6. Abundância real dos principais gêneros bacterianos identificados no sistema digestivo de
2315 cada uma das 89 abelhas amostradas de *Melipona scutellaris* nas cidades de Aldeia-PE, Mossoró-
2316 RN e Novo Hamburgo-RS.

2317

2318

2319

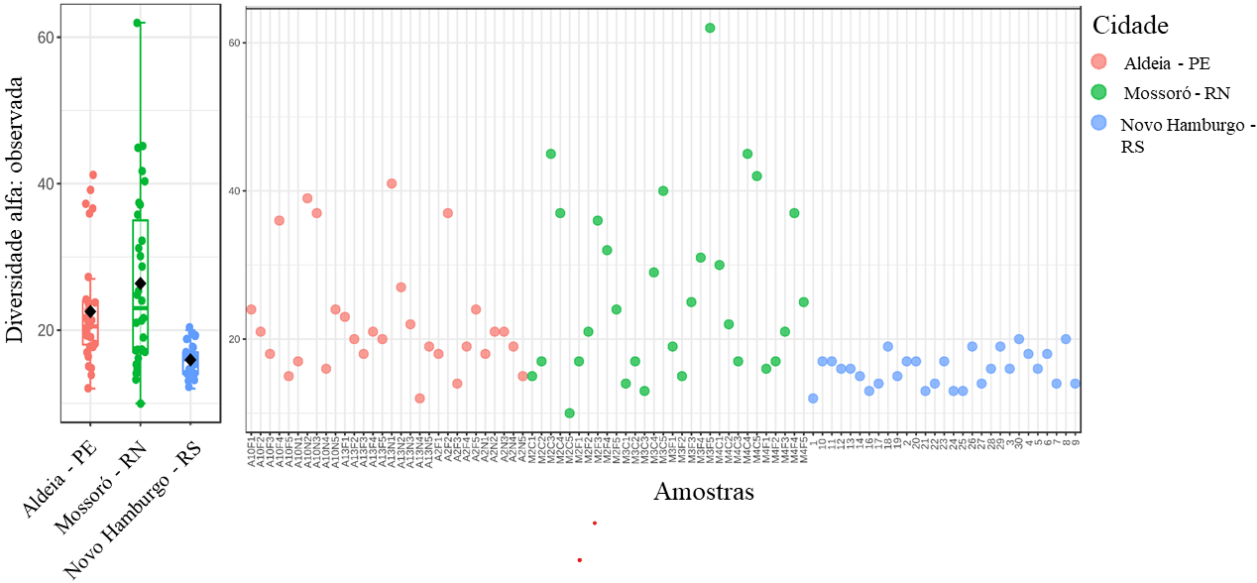
2320

2321



2322 Figura 7. Diagrama de Venn mostrando as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) bacterianas
2323 compartilhadas e únicas entre Mossoró-RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS (OTUs; 97% de
2324 identidade).

2325
2326



2327 Figura 8. Diversidade alfa avaliada por OTUs observadas (Sobs) de comunidades bacteriana em
2328 relação as ecorregiões.

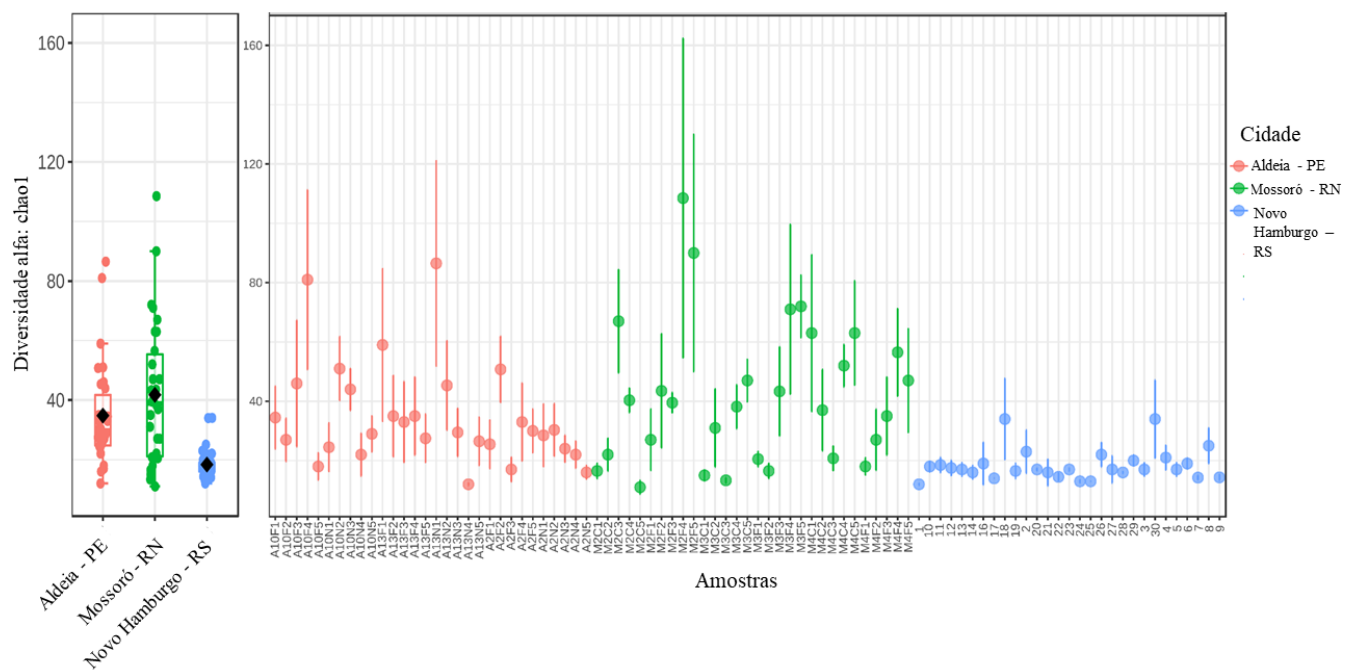


Figura 9. Diversidade alfa avaliada por riqueza (Chao1) de comunidades bacteriana em relação as ecorregiões.

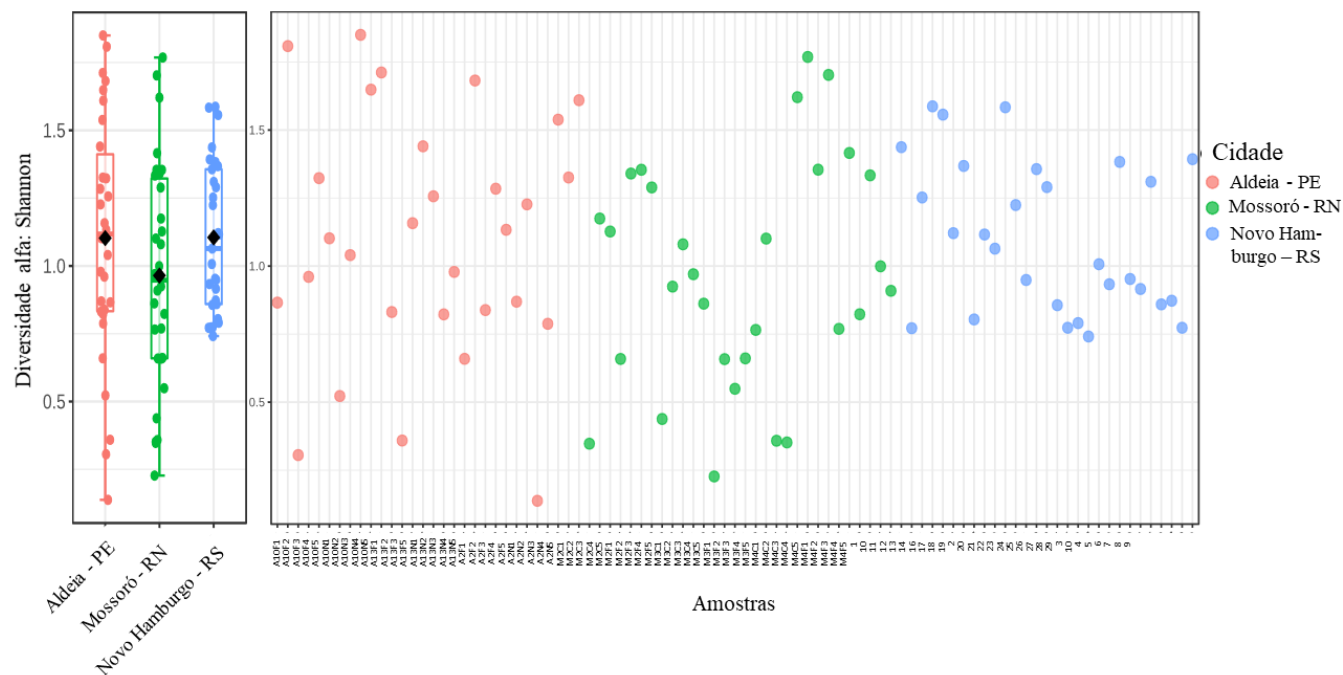
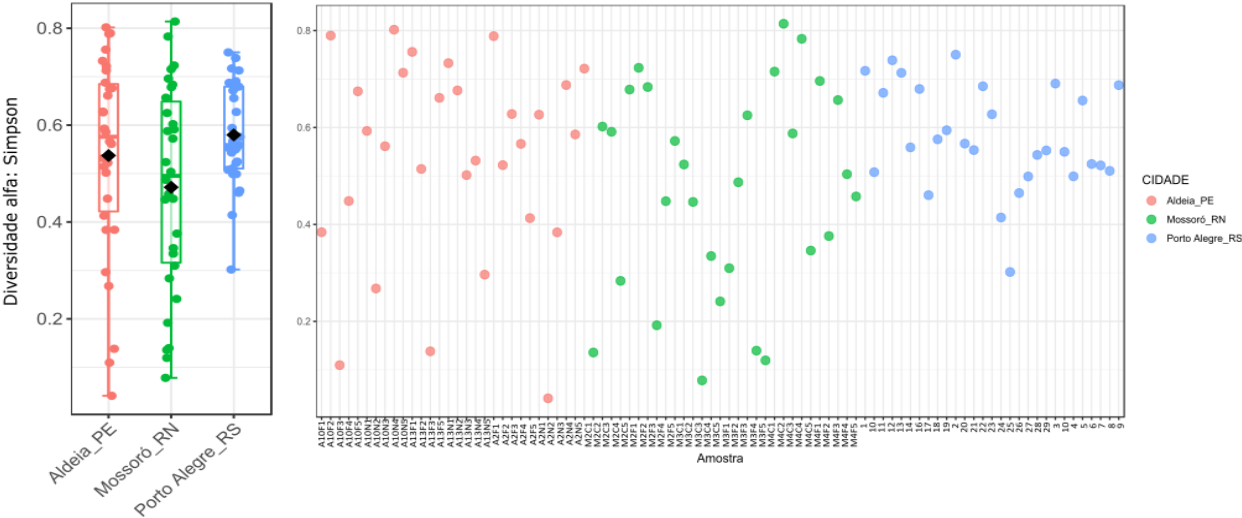


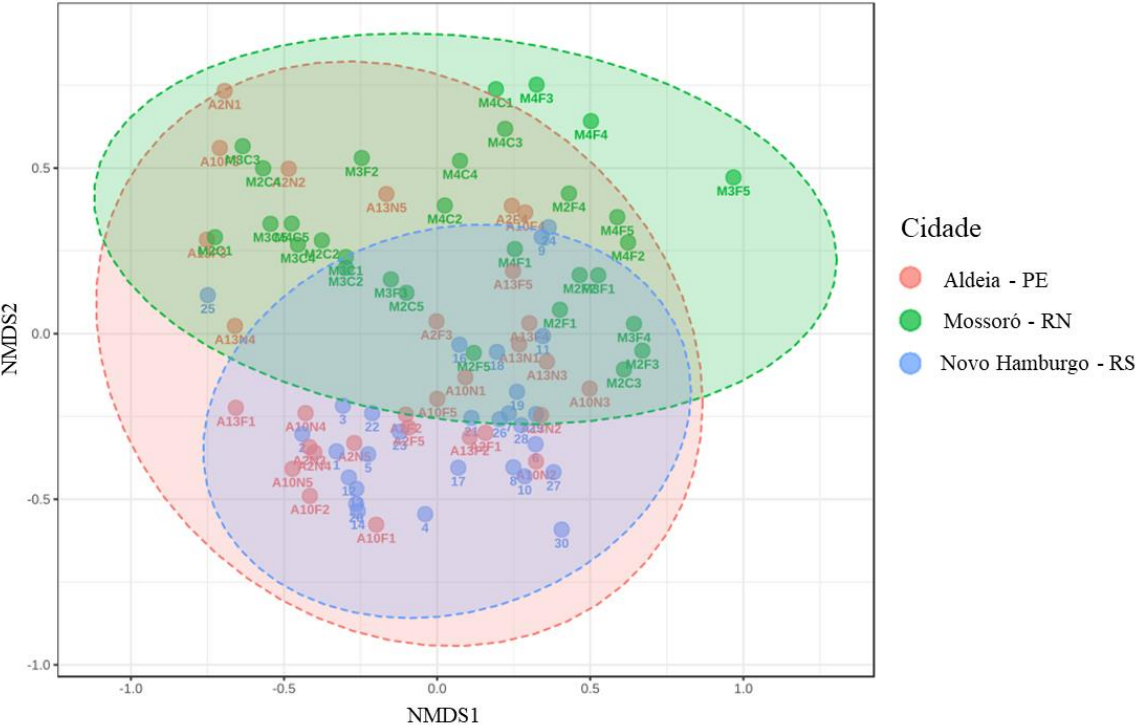
Figura 10. Diversidade alfa avaliada por diversidade (Shannon) de comunidades bacteriana em relação as ecorregiões.

2337
2338



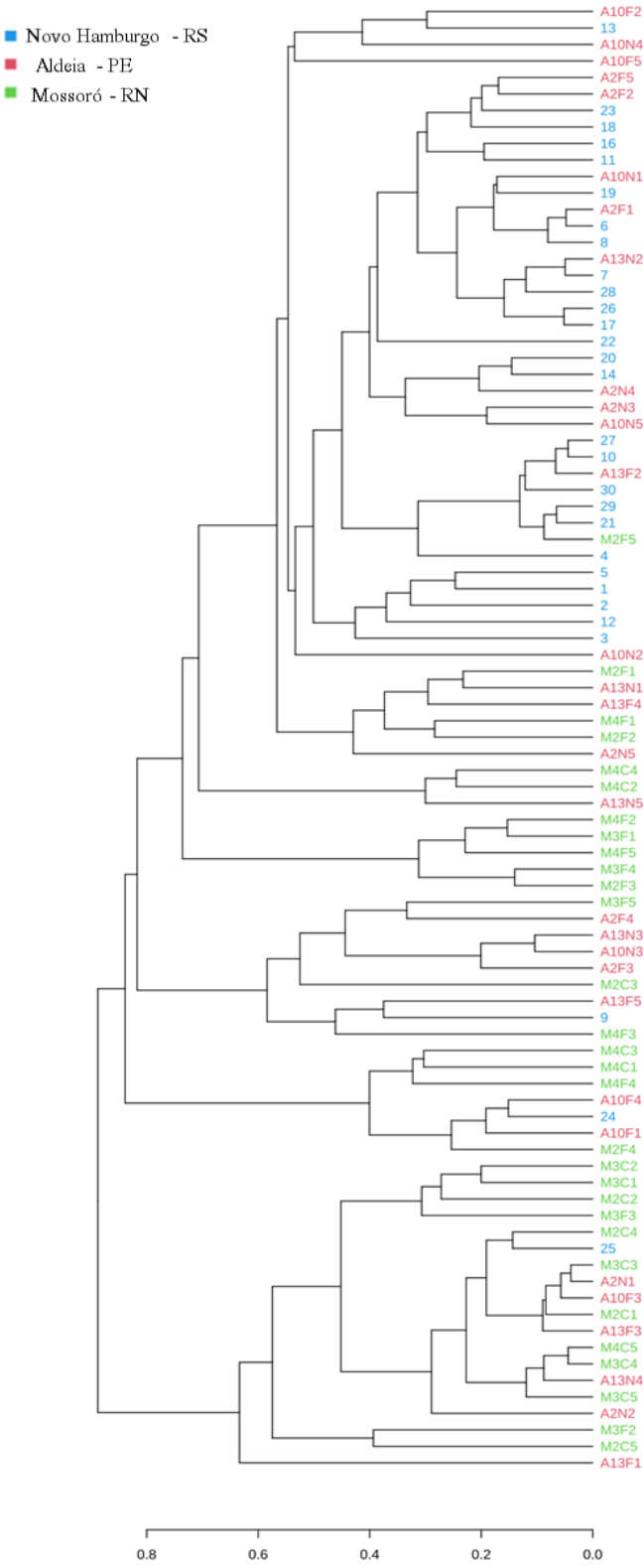
2339 Figura 11. Diversidade alfa avaliada por diversidade (Simpson) de comunidades bacteriana em
2340 relação as ecorregiões.

2341
2342



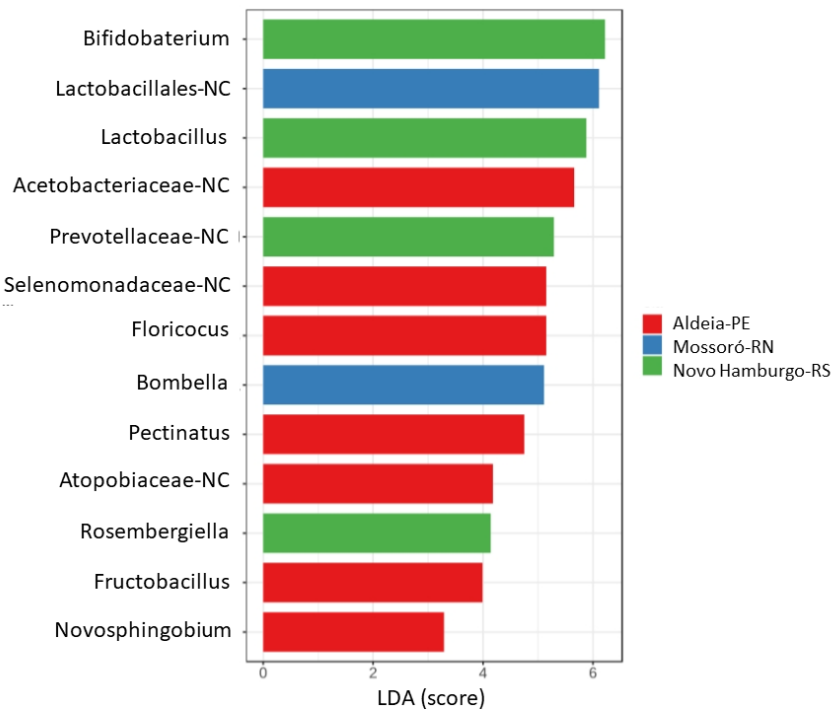
2343 Figura 12. Análise Multivariada (NMDS) utilizando como matriz a distância de dissimilaridade de
2344 Bray-Curtis para as amostras de Mossoró-RN (círculo verde), Novo Hamburgo-RS (círculo azul) e
2345 Aldeia-PE (círculo rosa), valor de Stress= 0.20891

2346



2347 Figura 13. Dendrograma elaborado com distância de Jaccard com as amostras das três ecorregiões
2348 Mossoró-RN (verde), Aldeia-PE (rosa) e Novo Hamburgo-RS (azul)

2349



2350

Figura 14. Lefse (*Linear discriminant analysis Effect Size*) descremina as OTUs quem tiveram

2351

maior efeito sobre a comunidade bacteriana.

2352

2353

2354

2355

2356

2357

2358

2359

2360

2361

2362

2363

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE FÚNGICA DO INTESTINO DE *MELIPONA*
SCUTELLARIS DE TRÊS ECORREGIÕES DO BRASIL COM BASE EM DADOS
METABARCODE DO GENE ITS ¹

Dayana Rosalina de Sousa¹, Marcos da Silveira Regueira Neto², Caio Andrey Bezerra

Januário², Wilson José da Silva Júnior¹, Lílían Caesar³, Karen Luísa Haag², Airton Torres de
Carvalho⁴, Valdir de Queiroz Balbino²

Universidade Federal Rural de Pernambuco, ²Universidade Federal de Pernambuco, ³Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, ⁴Universidade Federal Rural do Semi-Árido

Sousa, D.R., M.S. Regueira Neto, C.A. Bezerra Januário, W.J. da Silva Júnior, L. Caesar, K.L.
Haag, A.T. de Carvalho, V.Q. Balbino. Caracterização da comunidade fúngica do intestino de
melipona scutellaris de três ecorregiões distintas do brasil com base em dados metabarcode do gene
ITS. Revista ??

RESUMO - As relações simbióticas entre fungos e diversos insetos são bem conhecidas como é o caso por exemplo das formigas que cultivam fungos e se alimentam dele. Recentemente, esse mesmo tipo de relação foi descoberta para uma abelha sem ferrão e um fungo ascomiceto. Os poucos trabalhos com *Melipona scutellaris* relacionadas a comunidade fúngica são mais restritos ao mel, pólen e superfície do corpo. A identificação da micobiota do trato digestivo das abelhas é necessária pois fungos podem beneficiar as abelhas através de função protetora contribuindo com o estado de saúde combatendo patógenos, participando nos processos de digestão dos alimentos, assim como ocorre em outros insetos. *M. scutellaris* tem sido translocada para regiões que não são de ocorrência natural e apresentando uma boa aclimação a esses locais, o manejo de colmeias para outras ecorregiões pode implicar em diversos fatores da biologia e saúde desses meliponíneos, inclusive na mudança da micobiota intestinal, pois muitos fungos são adquiridos através do ambiente. O objetivo do atual trabalho foi caracterizar a micobiota fúngica do sistema digestivo de *M. scutellaris* através do metabarcoding do gene ITS e verificar se existe diferença de riqueza e abundância na microbiota das abelhas coletadas em diferentes ecorregiões, Aldeia-PE (ocorrência natural) Mossoró-RN e Novo Hamburgo-RS (translocada). Os principais gêneros identificados nas nossas amostras foram *Starmerella*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Malassezia*, *Lachancea*, *Aspergillus*, *Sterigmatomyces* e *Meyerozyma*. Os índices de diversidade não deram diferença significativa ao comparar comunidade fúngica das diferentes ecorregiões, porém o NMDS mostrou uma dissimilaridade das comunidades.

PALAVRAS-CHAVE: Micobiota, Abelha sem ferrão, Ascomycota, Basidiomycota, Sistema digestivo.

CHARACTERIZATION OF THE FUNGAL COMMUNITY IN THE GUT OF MELIPONA
SCUTELLARIS FROM THREE ECOREGIONS IN BRAZIL BASED ON METABARCODE
DATA FROM ITS GENE

ABSTRACT – The symbiotic relationships between fungi and various insects are well established, it is the case for example of ants that grow fungi and feed on it, recently this same type of relationship was discovered for a stingless bee and an ascomycete fungus. The few works with *Melipona scutellaris* related to fungal community are more restricted to honey, pollen and body surface. The identification of the mycobiota of the digestive tract of bees is necessary because fungi can benefit the bees through a protective function contributing to the health status by fighting pathogens, participating in the food digestion processes, as it occurs in other insects. *M. scutellaris* has been translocated to regions that are not naturally occurring and presenting a good acclimation to these locations, the management of hives to other locations may involve several factors of the biology and health of these meliponins, including the change of the intestinal mycobiota, because many fungi are acquired through the environment. The aim of this study was to characterize the mycobiota of the digestive system of *M. scutellaris* using the ITS gene metabarcode and to verify if there is a difference in richness and abundance in the microbiota of bees collected in different locations, Aldeia-PE (natural occurrence) Mossoró-RN and Novo Hamburgo-RS (translocated). The main genera identified in our samples were *Starmerella*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Malassezia*, *Lachancea*, *Aspergillus*, *Sterigmatomyces* and *Meyerozyma*. The diversity indices gave no significant difference when comparing the fungal community of the different sites, but the NMDS showed a dissimilarity of the communities.

KEY WORDS: Mycobiota, Stingless Bee, Ascomycota, Basidiomycota, Digestive system.

Introdução

As ferramentas de identificação molecular, como forma integrativa e complementar a taxonomia clássica, se popularizaram no meio científico e têm evoluído durante os anos. O uso do DNA como código de barras para classificar espécies, vem sendo cada vez mais explorado e tem ganhado novos recursos para a identificação em larga escala, é o caso da técnica de metabarcoding que associa o código de barras da vida (*DNA Barcoding*) ao sequenciamento de alto rendimento (HTS) (Taberlet *et al.* 2012, Hebert *et al.* 2013).

A técnica de metabarcoding tem sido de grande relevância para estudar comunidades microbianas, principalmente para microrganismos de difícil caracterização morfológica e de amostras com grande riqueza e diversidade de espécies. Fungos são um dos grupos que se beneficiam com a técnica, eles representam o terceiro maior grupo de organismos eucarióticos (Blackwell 2011, Schoch *et al.* 2012, Xu 2016, Hawksworth e Lücking 2018, Vu *et al.* 2019). O grande número de espécies também reflete em uma grande diversidade morfológica, de vida e espécies crípticas, que dificulta uma padronização de identificação através da morfologia, biologia e estruturas reprodutivas, além da falta de especialistas para cada grupo (Drew 2011, Lumbsch & Leavitt 2011, Xu 2016, Raja *et al.* 2017, Lücking *et al.* 2020).

A associação de fungos com insetos é documentada para diversas espécies, entre as relações mais conhecidas estão as com formigas, cupins e besouros (Zoberi & Grace 1990, Currie *et al.* 2001). As abelhas também apresentam uma estreita relação com a comunidade fúngica, muitas vezes sendo uma relação não benéfica, onde fungos são responsáveis por afetar o estado de saúde desses insetos, e por outras vezes sendo responsáveis por auxiliar na formação do alimento, transformação do pólen, fornecendo nutrientes (Gilliam 1972, Gilliam 1979, Cornman *et al.* 2012, McFrederick *et al.* 2014, Ptaszynska *et al.* 2016, Paludo *et al.* 2018, de Paula *et al.* 2021).

No entanto a comunidade fúngica das abelhas sem ferrão ainda não foi bem caracterizada. Para o Brasil as poucas informações de micodiversidade para abelhas sem ferrão estão principalmente relacionadas a presença de fungos em potes de alimento, tanto pólen quanto mel, ninho, corpo da abelha (Rosa *et al.* 2003, Teixeira *et al.* 2003, Ferraz *et al.* 2008, Gois *et al.* 2010, Daniel *et al.* 2013, Barbosa *et al.* 2016, Barbosa *et al.* 2017, Tiago 2017, Barbosa *et al.* 2018, Souza *et al.* 2018).

Estudos com *Scaptotrigona depilis* (Ordem: Família), uma espécie de abelha sem ferrão brasileira, revelou a importância que bactérias, fungos e outros microrganismos exercem sobre a biologia destas abelhas, onde estas dependem de interações com uma complexa comunidade de fungos para completar seu desenvolvimento (Menezes *et al.* 2015, Paludo *et al.* 2018). Dentre as espécies de fungo identificadas, o fungo *Zygosaccharomyces* sp. cresce dentro das células de cria de *S. depilis*, junto ao alimento larval, e seus micélios são consumidos pelas larvas, fornecendo às mesmas um tipo de esterol necessário para síntese de ecdisteróides utilizados na morfogênese durante o desenvolvimento larval (Paludo *et al.* 2018).

Esse tipo de simbiose, até então desconhecida em qualquer outra espécie de abelhas sem ferrão (Menezes *et al.* 2015, Paludo *et al.* 2018), expõe o vazio existente nesta área do conhecimento e confirma a influência que microrganismos exercem em interação com abelhas. Assim como o entendimento destas relações em *S. depilis*, demais descobertas para outras espécies podem implicar em informações cruciais para a sobrevivência de diferentes espécies de abelhas sem ferrão. E essas informações se tornam mais escassas ainda quando se fala da comunidade microbiana que colonizam o intestino de abelhas e que provavelmente cumpre papéis importantes nesse meio (Ngalimat *et al.* 2020, de Paula *et al.* 2021).

Nosso modelo de estudo para ampliar as informações relativas à representação de fungos que colonizam o sistema digestivo de abelhas sem ferrão, foi a espécie *Melipona scutellaris*. Apesar

de ser uma espécie endêmica no Nordeste, devido a atividade de meliponicultores, a translocação de ninhos para outras regiões do país, acabou aumentando a distribuição de *M. scutellaris* que se adaptou a regiões como sul e sudeste. Portanto, a micobiota intestinal de abelhas provenientes de três estados brasileiros serão identificadas e comparadas através do sequenciamento de um fragmento do gene ITS.

Material e Métodos

Amostras

Indivíduos adultos da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* foram coletados em três ecorregiões diferentes, Aldeia-PE, Mossoró-RN e Porto Alegre-RS (Figura 1). Para cada local foram coletadas 10 abelhas de três colmeias diferentes, sendo cinco capturadas com auxílio de pinça dentro da colmeia, na área de cria e cinco capturadas na entrada da colmeia com auxílio de um sugador, resultando em 30 amostras por localidade e 90 no total (Tabela 1). As abelhas foram armazenadas individualmente em eppendorf de 2ml, contendo álcool 70% e logo após alocados em freezer a -4°C.

As amostras de Aldeia-PE foram coletadas no Meliponário Aldeia que se localiza no município de Camaragibe, região metropolitana do Recife, Capital do Estado de Pernambuco. Apresenta 34 colônias manejadas em caixas do tipo nordestina, em uma área seminatural de Floresta Atlântica com pomar de fruteiras nativas e cultivadas, de aproximadamente 3 hectares. A área apresenta clima muito úmido, com floresta perenifólia e chuvas ao longo de todo o ano, exceto pelo curto período de setembro à dezembro, quando a precipitação diminui. É uma área de ocorrência natural de *M. scutellaris* e ninhos nativos já foram localizados nas proximidades.

Em Mossoró-RN as abelhas foram coletadas em um meliponário urbano, com cerca de 15 colônias manejadas em caixas tipo nordestina translocadas para a região em 2014, provenientes de

Natal – RN e Igarassu - PE. O clima da região é semiárido muito quente com chuvas irregulares concentradas nos meses de março a abril (Carmo Filho & Oliveira 1989). Na caatinga o manejo da espécie é intensivo, com alimentação artificial energética de água e açúcar ministrado quinzenalmente às colônias. Já em Novo Hamburgo-RS, as coletas foram realizadas em ninhos provenientes de um Meliponário em uma área semiurbana com elementos de floresta mista (Floresta Atlântica com elementos de Floresta de Araucárias) (IBGE 2012). Caixas do tipo INPA manejadas intensivamente com alimentação energética e com aquecimento artificial durante o inverno foram selecionadas. O clima da região é subtropical com chuvas de inverno. A área do Meliponário apresenta vegetação nativa com elementos cultivados, especialmente *Eucaliptus* e árvores ornamentais.

Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído do sistema digestivo completo de cada uma das abelhas separadamente. Para isso as abelhas foram dissecadas em placas de petri contendo solução salina tampão de fosfato estéril (PBS). Logo após a dissecação o sistema digestivo foi colocado em Eppendorf de 2ml para seguir com a extração de DNA. O DNA genômico total foi extraído utilizando o PureLink® Genomic DNA Mini Kit K182002 conforme instruções do fabricante. E após a extração o DNA foi armazenado em freezer -4°C.

Metabarcoding de bactérias e fungos

Para o segmento correspondente a região de ITS2 dos fungos foram amplificadas com iniciadores ITS3_KYO (5'-GATGAAGAACGYAGYRAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Toju *et al.* 2012). Os primers foram sintetizados com etiquetas (tags) de 8 nucleotídeos em ambas as extremidades para distinguir as amostras (HONG *et al.*, 2016) e serem agrupadas antes de construir as bibliotecas de sequenciamento para o metabarcoding.

Os ciclos de termociclagem foram realizados segundo Toju *et al.* (2012) para ITS. A amplificação dos fragmentos de DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, através de luz UV para confirmação da amplificação e verificar contaminantes nas amostras de controle negativo. Foi realizada também a quantificação de cada amostra utilizando o Nanodrop Lite.

Sequenciamento do metabarcoding

Para o sequenciamento, juntamos 5µl de cada amostra ajustada a uma concentração de 4ng/µl em um tubo para os amplicons de ITS. A partir dessa mistura (“pool”) foi realizada uma segunda diluição para uma concentração final de 2 ng/µl, que foram utilizadas na preparação das bibliotecas usando o kit Truseq Nano DNA LT Library Prep. O Protocolo de preparação da biblioteca foi iniciada na etapa de Limpeza de Fragmento (Clean Up Fragmented DNA) e todos os passos posteriores realizados segundo o fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas usando a tecnologia MiSeq da Illumina, usando Reagente kit V3 que produziu leituras de extremidades emparelhadas em ciclo de 2 X 300. O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE) da Universidade Federal de Pernambuco.

Análise, filtragem, agrupamento e taxonomia das sequências

A priori, as plataformas de tratamento de bioinformática dos dados metabarcoding eram direcionados quase sempre para o gene 16S rRNA, como RDP (Cole *et al.* 2009); MOTHUR (Schloss *et al.* 2009); QIIME (Caporaso *et al.* 2010); PANGEA (Giongo *et al.* 2010); WATERS (Hartman *et al.* 2010); CANGS (Pandey *et al.* 2010), com a finalidade de identificar bactérias, evidenciando assim a pouca visibilidade dada a comunidade de fungos. Apesar disso, alguns desses programas, como Mothur e QIIME que processam dados fúngicos de ITS, podem apresentar vieses nas análises devido à falta de especificidade do programa para analisar dados com as características desse gene (Bengtsson-Palme *et al.* 2013).

Tendo em vista esses fatores para analisar nossos dados, usamos a plataforma Lotus2 que foi projetada pensando em ambos os genes 16S e ITS (Hildebrand *et al.* 2014). As sequências brutas passaram primeiro por um processo de análise no FastQC para verificar a qualidade, e a presença de adaptadores, que foram removidos usando o Cutadapt para posterior análise utilizando o Lotus2.

Em uma única linha de comando os parâmetros trabalhados foram adicionados assim como o caminho para os arquivos de entrada necessários. Os parâmetros não especificados na linha de comando, foram predefinidos pelo próprio programa. Para nossa linha de comando foram fornecidos os arquivos com as sequências forward e reverse em formato fastaq; um arquivo de mapa contendo informações com o nome das amostras, sequências barcodes, iniciadores e o nome dos arquivos fastq. Para o processo de demultiplex e filtragem de qualidade a plataforma usa o SDM, um software autônomo integrado ao Lotus2. Os comandos que indicamos nesta etapa foram - `s|sdmopt <sdm_miSeq_ITS>` com a configuração de `minSeqLength 130 maxSeqLength 1000 minAvgQuality 27`.

As leituras também foram submetidas ao ITSx (Bengtsson-Palme *et al.* 2013) para extrair as sub-regiões ITS1 e ITS2 altamente variáveis das sequências. Durante o sequenciamento, as regiões dos genes ribossômicos variáveis (ITS1 e ITS2) e regiões conservadas (SSU, 5S e LSU) são sequenciadas, essas regiões conservadas podem levar a resultados enganosos no processo de identificação das sequências, para eliminar esse erro o ITSx identifica e extrai apenas as próprias regiões ITS para serem usadas nas etapas seguintes (Bengtsson-Palme *et al.* 2013).

As opções de agrupamento de sequências foram realizadas usando UPARSE (Edgar 2013), que agrupa as sequências em OTUs (Unidade Taxonômica Operacional). O banco de dados usando como referência para taxonomia foi UNITEv8_sh_dynamic_all (Kõljalg *et al.* 2013) e para o alinhamento das sequências com bancos RDP (Martin & Rybicki 2000).

Análises abundância, diversidades e multivariadas

O Lotus2 gerou arquivos de saída que foram usados para processamento dos dados no pacote Phyloseq no software R (versão 4.1.1). Com o pacote Phyloseq medimos a riqueza usando o número de espécies observadas (Sobs), Chao1 e a diversidade usando InvSimpson, para os três índices as diferenças de grupo nesses índices foram testadas usando uma análise de variância (ANOVA). Foi possível também fazer a análise multivariada NMDS (escalonamento multidimensional não métrico) usando a matriz de distância de Bray-Curtis leva em consideração a presença / ausência das espécies, bem como a abundância. Todas essas análises foram usadas para comparar as comunidades fúngicas de Mossoró-RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS, através do número de gêneros identificados, abundância desses, e escalonamento das amostras.

Resultados

De um total de 11.485.922; 11.485.922 (par 1; par 2) de leituras processadas, foram aceitas 3.926.367; 5.305.655 com alta qualidade e leituras com qualidade média 37.895; 900.309, sendo um total de 81.529 sequências únicas. O comprimento médio da sequência foi de 272 pb. ITSx descartou 853 OTUs e após a filtragem 423 OTUs foram mantidas e identificadas.

Das 423 OTUs geradas pelo Lotus2, 128 são compartilhadas entre as amostras de Mossoró-RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS. Aldeia-PE apresenta a maior quantidade de OTUs exclusivas (58) e é o local que mais compartilha OTUs com as outras duas ecorregiões, sendo 35 OTUs com Mossoró-RN e 38 OTUs com Novo Hamburgo-RS (Figura 2).

Das 90 amostras analisadas, três foram descartadas da análise após sequenciamento (ITS 102, ITS 104 e ITS 109) todas de Novo Hamburgo-RN, pois não tiveram sequências de boa qualidade para serem analisadas.

Os filos identificados foram restritos a Basidiomycota e Ascomycota. Dentre as famílias mais abundantes estão Saccharomycetaceae, Malasseziaceae, Aspergillaceae, Botryosphaeriaceae e

Debaryomycetaceae (Figuras 3). Em Mossoró-RN as amostras foram dominadas principalmente por Saccharomycetaceae, em Aldeia-PE a família dominante foi Malasseziaceae, já para Novo Hamburgo as famílias Saccharomycetaceae, Malasseziaceae e Aspergillaceae tiveram sua abundância bem equiparadas (Figuras 3).

Um total de 68 gêneros e 92 espécies foram identificadas (Tabela 2). Porém 123 OTUs não chegaram a serem classificados nem a nível de ordem. A abundância dos oito gêneros mais representativos (*Starmerella*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Malassezia*, *Lachancea*, *Aspergillus*, *Sterigmatomyces* e *Meyerozyma*) apresentaram uma variação entre as ecorregiões amostradas (Figura 3). O gênero *Candida* estava entre os mais abundantes nas três ecorregiões, sendo que para Novo Hamburgo-RS era o mais abundante. Mossoró-RN apresentou maior abundância para *Zygosaccharomyces* e em Aldeia-PE, *Malassezia* teve maior abundância (Figura 4).

Os índices Sobs ($p = 0.7633$), Chao1 ($p = 0.2484$), e InvSimpson ($p = 0.07569$) não apresentaram diferença significativa (Figura 5). A análise multivariada NMDS mostrou que a comunidade fúngica das amostras coletadas em Mossoró-RN foram as que mais destoaram na ordenação com base na distância de Bray-Curtis, indicando uma maior dissimilaridade na sua composição quando comparada com amostras de Novo Hamburgo-RS e Aldeia-PE e assim não se sobrepondo a essas (Figura 6). Porém é possível observar também que algumas amostras de Novo Hamburgo-RS estão bem distantes das outras ecorregiões indicando uma maior dissimilaridade entre elas e outras amostras estão ordenadas mais próximas indicando uma maior similaridade com Aldeira-PE, (Figura 6).

Discussão

Fungos e insetos apresentam diversas interações conhecidas, incluindo a associação com o sistema digestivo, esse mutualismo envolve a fermentação, produção de compostos essenciais para

a nutrição e desenvolvimento de insetos, proteção contra patógenos e por sua vez, as abelhas servem de vetores de fungos entre as plantas (Rosa *et al.* 2003, Paludo *et al.* 2018, Rothman *et al.* 2019, Costa Neto & Moraes 2020, Malassigné *et al.* 2021). Os dados sobre a interação entre abelhas sem ferrão e fungos ainda são limitados.

Os filos Basidiomycota e Ascomycota foram os únicos filos encontrados e parecem ser unânimes nas abelhas, seja no intestino, mel ou pão de abelhas (Bosmans *et al.* 2018, Ludvigsen *et al.* 2020, Silva de Souza *et al.* 2020), incluindo também abelhas sem ferrão (Rosa *et al.* 2003, Ferraz *et al.* 2008, Barbosa *et al.* 2016, Souza *et al.* 2018).

Dentre as famílias mais abundantes encontradas nesse estudo Saccharomycetaceae, Malasseziaceae, Aspergillaceae, Botryosphaeriaceae e Debaryomycetaceae temos diversos gêneros e espécies associados a abelhas melíferas, abelhas solitárias e outras abelhas sem ferrão, Villegas-Plaza *et al.* (2018) catalogou mais de 29 espécies de 13 gêneros de fungos que tem sido frequentemente associada a abelhas sem ferrão, dentre esses fungos identificados no atual trabalho alguns como os gêneros *Pichia*, *Papiliotrema*, *Starmerella*, *Candida*, *Zygosaccharomyces* e *Aureobasidium*.

O gênero *Zygosaccharomyces* foi o mais abundante nas amostras de Mossoró-RN e menos abundante em Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS. Yun *et al.* (2018) e Ludvigsen *et al.* (2020) encontraram *Zygosaccharomyces* dominando o trato digestivo de rainhas de *Apis mellifera*, mas não das trabalhadoras. Liu *et al.* (2021) e Brysch-Herzberg (2004) também identificaram no intestino de *Austroplebeia australis* e *Bombus* respectivamente. Esse mesmo gênero foi identificado em outros trabalhos em detritos intestinais de *Tetragonisca angustula* (Rosa & Lachance 2005), em mel de *A. mellifera* (Saksinchai *et al.* 2021) e associado ao processo de fermentação do mel em *Apis ceranae* (Chikano & Takanhashi 2020).

No Brasil, identificou-se uma simbiose entre a abelha meliponini *Scaptotrigona depilis* e um fungos do gênero *Zygosaccharomyces*, as abelhas aparentemente cultivam o fungo que cresce internamente à célula de cria e as larvas se alimentam desse fungo que fornece precursores de esteróides que são essenciais durante o seu desenvolvimento e metamorfose. Por sua vez, as abelhas perpetuam o fungo, transmitindo-o para outras gerações por meio de materiais de construção contaminados com esporos (Menzes *et al.* 2015, Paludo *et al.* 2018, Paludo *et al.* 2019). O fato de encontrarmos *Zygosaccharomyces* no intestino de nossas abelhas e de ter sido encontrado também em detritos intestinais de outra abelha sem ferrão (Rosa & Lachance 2005), podem ser indícios que essa simbiose seja estendida a outras abelhas e não só a *S. depilis*, sendo as abelhas beneficiadas no seu desenvolvimento e atuando como propagadora desse fungo.

O gênero mais abundante identificado no nosso estudo e que teve abundância bem próxima entre as amostras de Mossoró-RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS, apresenta uma relação com o processo de simbiose entre *S. depilis* e *Zygosaccharomyces sp.*, o gênero *Candida*, que também foi isolado em células de cria de *S. depilis* e em estudos *in vitro* produziu compostos orgânicos voláteis que estimulam o desenvolvimento de *Zygosaccharomyces sp.* (Paludo *et al.* 2019). Apesar de *Candida* ter sido isolado por Paludo *et al.* (2019) em provisões de cria, outros estudos encontraram, assim como no nosso esse gênero no sistema digestivo de abelhas, em *A. melífera* foi um dos gêneros mais abundantes em abelhas forrageiras (Yun *et al.* 2018), Brysch-Herzberg (2004) e Silva de Souza *et al.* (2020) identificaram também no trato digestivo de *Bombus* e *Melipona seminigra* respectivamente. *Candida* também parece estar envolvida na digestão de substratos, secreção de enzimas na desintoxicação de metabólitos vegetais tóxicos e foram isoladas em abelhas alimentadas com herbicida e antibióticos (Gilliam *et al.* 1974, Vega & Dowd 2005).

O gênero *Candida* parece estar intimamente relacionado com o gênero *Starmerella*, levantando até dúvidas se seriam a mesma espécie e sendo usadas como sinônimos (Rosa &

Lachance 1998, Pimentel *et al.* 2005, Santos *et al.* 2018). Diferente dos nossos resultados Cerqueira *et al.* 2020 identificou o gênero *Starmerella* em todas as amostras de *Melipona*. Identificamos cinco OTUs para o gênero, sendo que três não foram classificadas a nível de espécie e as outras duas correspondiam às espécies *Starmerella bombicola* e *Starmerella meliponinorum*.

A interação entre abelhas sem ferrão e o gênero parece ser bem estabelecida, já que é frequentemente isolada nessas abelhas, incluindo no trato digestivo (Rosa *et al.* 2003, Teixeira *et al.* 2003; Daniel *et al.* 2013, Villegas-Plaza *et al.* 2018, Costa Neto & Moraes 2020, Cerqueira *et al.* 2021, Echeverrigaray *et al.* 2021) e isolada em flores (Rosa & Lachance 1998, Santos *et al.* 2018).

O gênero é considerado um fungo frutofilico, ou seja, tem preferência por frutose em vez de glicose participando do processo de fermentação e essa é uma condição considerada rara para fungos. Várias espécies de *Starmerella* são conhecidas por produzirem soforolipídios indicando que esses fungos podem estar relacionados com a nutrição das abelhas, já que os grãos de pólen são revestidos por uma membrana rica em lipídios e hidrocarbonetos, e os soforolipídios das leveduras podem interagir com esse pólen por serem glicolipídios surfactantes, reduzindo assim a tensão superficial com o pólen e participando do processo de fermentação (Kurtzman *et al.* 2010, Pacini *et al.* 2005, Detry *et al.* 2020, Gonçalves *et al.* 2020).

Malassezia foi o gênero com maior abundância dentre as amostras de Aldeia-PE, seguido por Novo Hamburgo-RN e com baixa abundância em Mossoró-RN. Identificamos nas nossas amostras duas espécies *Malassezia globosa* e *Malassezia restricta*. Essas duas espécies foram identificadas no intestino de *T. carbonaria* e *A. australis* entre as seis OTUs mais abundantes e no de *A. mellifera* (Ludvigsen *et al.* 2020, Liu *et al.* 2021), esse mesmo gênero também foi identificado colonizando o intestino de *Aedes albopictus* e utiliza ativamente a frutose adquirida pelo mosquito ao se alimentar de plantas como fonte de energia (Guégan *et al.* 2020a,b). *Malassezia* e as duas espécies identificadas no nosso trabalho foram identificadas em outros trabalhos estando associadas

a borboletas, mosca das frutas e plantas (Harrison *et al.* 2016, Malacrinò *et al.* 2017, Qian *et al.* 2021).

Curiosamente esse gênero está intimamente associado ao homem causando doenças de pele como caspa e eczema (Ashbee *et al.* 2007, Cabañes 2014), sendo assim não é possível descartar contaminação de amostras. Apesar dessa possibilidade não podemos descartar os achados dos trabalhos citados acima, o que nos faz pensar que existe sim uma relação das abelhas com *Malassezia* e que merece atenção, já que em nossos estudos é um dos gêneros mais abundantes e identificado em amostras das três ecorregiões em que as abelhas foram coletadas.

Aspergillus também apresentou abundância diferenciada para as três ecorregiões amostradas, em Mossoró-RN foi o menos abundante dentre os oito gêneros mais abundantes. Esse gênero é identificado recorrentemente em amostras de mel, ninho, trato digestivo e principalmente em pólen processado das abelhas melíferas (Gilliam & Prest 1972, Gilliam *et al.* 1977, Gilliam *et al.* 1989, Disayathanoowat *et al.* 2020), já em abelhas sem ferrão *Aspergillus* foi isolado em *Melipona subnitida* (corpo), *M. scutellaris* (mel), *Trigona* (corpo), *M. seminigra* (trato digestivo) (Stuart *et al.* 2004, Ferraz *et al.* 2008, Gois *et al.* 2010, Souza *et al.* 2018, Silva de Souza *et al.* 2020). No nosso estudo, três OTUs corresponderam às seguintes espécies: *Aspergillus niger*, *Aspergillus penicillioides* e *Aspergillus ruber*; e outras oito não foram classificadas em espécie.

Apesar do gênero *Aspergillus* estar associada a diferentes espécies de abelhas, vale ressaltar que o gênero é composto por algumas espécies comprovadamente patogênicas, inclusive para *A. mellifera* causando uma doença chamada “Stonebrood” (cria pedra), sendo algumas espécies mais virulentas que outras (Foley *et al.* 2014). O acometimento das colônias por *Aspergillus* não é frequente, sendo considerado um patógeno oportunista, facultativo e de alta virulência ao se manifestar (Vojvodic *et al.* 2011). A principal espécie associada a doença é *Aspergillus flavus*, essa

espécie não foi identificada nos nossos estudos, porém, *Aspergillus niger* estava presente nas
nossas amostras, que ocasionalmente é agente etiológico de “Stonebrood” (Foley *et al.* 2014).

Entre os oito gêneros mais abundantes para todas nossas amostras, *Sterigmatomyces* e *Lachancea* não estavam entre as mais abundantes em Mossoró-RN e Aldeia-PE respectivamente. Diversas OTUs foram compartilhadas entre as amostras das três ecorregiões e outras eram compartilhadas entre duas ou encontrada exclusivamente em uma única localidade, mesmo assim ao comparar a comunidade fúngica das ecorregiões as análises de diversidade alfa (OTUs observadas, Chao1 e InvSimpson) não apresentaram diferença significativa.

No entanto, nosso NMDS mostrou que as amostras de Mossoró-RN formam um agrupamento que não se sobrepõem a Novo Hamburgo-RS, apresentando dissimilaridade na comunidade microbiana entre essas ecorregiões, e a maior similaridade está entre as amostras de Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RN tendo várias amostras agrupadas próximas umas das outras, mesmo assim as oriundas de Novo Hamburgo-RS apresentam-se bem distanciadas das amostras de Aldeia-PE. A análise de NMDS é uma forma de condensar informações de dados multidimensionais (múltiplas variáveis/espécies/OTUs) em uma representação ou ordenação. Quanto mais próximas as amostras (pontos) estiverem no espaço de ordenação, mais semelhantes serão suas comunidades microbianas.

Ainda não temos trabalhos comparando a diversidade de fungos para o sistema digestivo de uma mesma espécie de abelhas em diferentes ecorregiões especialmente com características de clima e vegetação tão distintos e com abelhas translocadas para regiões fora da sua distribuição natural como no nosso trabalho. Além de amostras de local nativo em um remanescente de Mata Atlântica e temperatura amena com curto período de seca, e dois locais que foram translocadas um no Sul do Brasil com temperaturas mais baixas e uma vegetação mista de dois tipos de Mata Atlântica e outro extremo na Caatinga com temperaturas elevadas durante quase o ano todo e pouca precipitação de chuva ao longo do ano.

2752 Como podemos notar nossas amostras foram coletadas em três ecorregiões com situações
2753 bem distintas, apesar de não haver trabalhos parecidos, estudos com mel de abelhas do gênero
2754 *Melipona* foram realiza No sul do Brasil e na Caatinga e a maior prevalência de fungos para o mel
2755 dessas ecorregiões foram *Starmerella* e *Candida*, respectivamente (Barbosa *et al.* 2016,
2756 Echeverrigaray *et al.* 2021). Apesar de serem estudos feitos com mel, muitas espécies encontradas
2757 no trato digestivo das abelhas também estão presentes no pólen e no mel. Porém, esses dois gêneros
2758 no nosso trabalho estavam presentes nas três ecorregiões e não diferiram muito em termos de
2759 abundância.

2760 Ludvigsen *et al.* (2020) comparou a microbiota intestinal de *A. mellifera* e descobriu que a
2761 comunidade fúngica mudava conforme as estações do ano. As estações apresentam temperaturas e
2762 umidades diferentes, sendo um indicativo que a comunidade fúngica pode ser influência conforme
2763 essas características locais. Os fungos podem ser modulados de diversas formas, um dos principais
2764 moduladores da comunidade fúngica de insetos é o ambiente (Rothman *et al.* 2019, Malassigné *et*
2765 *al.* 2021), fungos transmitidos por abelhas diferiram no Cerrado brasileiro do sudeste e norte (Costa
2766 Neto & Moraes 2020).

2767 Além do ambiente, outros fatores como pH do meio, interação com bactérias, status social
2768 (McFrederick *et al.* 2014, Yun *et al.* 2018, Disayathanoowat *et al.* 2020), e a aparente especificidade
2769 de certos fungos pelos seus hospedeiros, como foi demonstrado para o gênero *Starmerella* por Rosa
2770 *et al.* (2003). A transferência de fungos de uma comunidade de abelhas para outra também pode
2771 afetar a micobiota das abelhas. O manejo de colmeias pode carrear fungos para diferentes locais e
2772 assim ser transmitida a outras abelhas, através de recursos florais compartilhados (Hedtke *et al.*
2773 2015, Evison & Jensen 2018).

2774 A maioria das espécies de abelhas nativas sem ferrão carecem de informações sobre seu
2775 comportamento, reprodução e microbiota associada, e um dos aspectos importantes sobre a biologia

desses insetos é o conhecimento da microbiota fúngica, a qual pode causar enfermidade a esses organismos e apresentar novos fatos para entender aspectos biológicos. A partir desse estudo foi possível acrescentar informações importantes para a comunidade fúngica de *M. scutellaris*, pois observamos uma diferença na composição dessas abelhas coletadas em diferentes ecorregiões do Brasil, identificamos fungos que *Pichia*, *Starmerella*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Aspergillus* e *Aureobasidium* associadas a outras espécies de abelhas sem ferrão.

Entender a riqueza e diversidade de fungos encontrados nas diferentes ecorregiões de coleta é um desafio devido às poucas informações que temos. Estudos relacionados a geografia e o manejo de *M. scutellaris* merecem um destaque, por ser de relevante importância para a sociedade e apresentar manejo dessas colmeias para fora da sua área de ocorrência natural, já que fungos comuns a outras espécies de abelhas podem ser adquiridos através do contato com as flores contaminadas por esses fungos. É importante saber como esses processos afetam as abelhas e sua comunidade fúngica para o manejo adequado e conservação da espécie.

Agradecimentos

Agradeço a CAPES pela concessão da Bolsa, ao programa de Pós-graduação em Entomologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva. Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, à Associação A.B.E.L.H.A e ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA pelo financiamento do projeto, Edital CNPq/ABELHA/IBAMA – 400597/2018-7; Licença de coleta SISBIO - 67393-1; SISGEN Cadastro nº A1B8F1F.

Literatura Citada

Ashbee, H.R. 2007. Update on the genus *Malassezia*. Med Mycol 45: 287–303.

- Bäckhed, F., R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson & J.I. Gordon. 2005.** Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 25: 1915-1920.
- Bajaj, J.S., D.M. Heuman, P.B. Hylemon, A.J. Sanyal, M.B. White, P. Monteith, N.A. Noble, A.B. Unser, K. Daita, A.R. Fisher, M. Sikaroodi & P.M. Gillevet. 2014.** Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J Hepatol*. 60: 940-947.
- Barbosa, R.N., J. Bezerra, C.S. Motta, B.S. Gomes, C. Costa & H. Melo. 2016.** Prospection on yeasts from stingless bees honey in brazilian tropical dry forest (Caatinga). *Gaia Scientia* 10: 151-159.
- Bengtsson-Palme, J., M. Ryberg, M. Hartmann, S. Branco, Z. Wang, A. Godhe, P. De Wit, M. Sanchez-Garcia, I. Ebersberger, F. de Sousa, A.S. Amend, A. Jumpponen, M. Unterseher, E. Kristiansson, K. Abarenkov, Y.J.K. Bertrand, K. Sanli, K.M. Eriksson, U. Vik, V. Veldre & R.H. Nilsson. 2013.** Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods Ecol Evol*. 4: 914–919.
- Bovo, S., A. Ribani, V.J. Utzeri, G. Schiavo, F. Bertolini & L. Fontanesi. 2018.** Shotgun metagenomics of honey DNA: Evaluation of a methodological approach to describe a multikingdom honey bee derived environmental DNA signature. *PLoS ONE*. 13: e0205575.
- Brysch-Herzberg, M. & M.A. Lachance. 2004.** *Candida bombiphila* sp. nov., a new asexual yeast species in the *Wickerhamiella* clade. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54: 1857-1859.
- Cabañes, F.J. 2014.** *Malassezia* Yeasts: how many species infect humans and animals? *PLoS Pathog*. 10: e1003892
- Cani, P.D. & N.M. Delzenne. 2009.** The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des*. 15:1546–1558.
- Caporaso, J.G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F.D. Bushman, E.K. Costello, N. Fierer, Peña, A. G., J.K. Goodrich, J.I. Gordon, G.A. Huttley, S.T. Kelley, D. Knights, J.E. Koenig, R.E. Ley, C.A. Lozupone, D. McDonald, B.D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder & R. Knight. 2010.** QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 7: 335–336.
- Chikano, M. & J-I. Takahashi. 2020.** Complete mitochondrial DNA sequence of the yeast *Zygosaccharomyces siamensis* (Saccharomycetes: Saccharomycetales) from fermented honey of the *Apis cerana japonica* in Japan. *Mitochondrial DNA Part B Res*. 5:2645-2647.
- Cole, J.R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R.J. Farris, A.S. Kulam-Syed-Mohideen, D.M. McGarrell, T. Marsh, G.M. Garrity & J.M. Tiedje. 2009.** The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 37: 141–145.

- Currie, C.R. 2001.** A community of ants, fungi, and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. *Annu Rev Microbiol.* 55: 357-380.
- Currie, C.R., J.A. Scott, R.C. Summerbell & D. Malloch. 1999.** Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398: 701–704.
- Daniel, H.M., C.A. Rosa, P.S.S. Thiago-Calaça, Y. Antonini, E.M.A.F. Bastos, P. Evrard, S. Huret, A. Fidalgo-Jiménez & M.A. Lachance. 2013.** *Starmerella neotropicalis* f. a., sp. nov., a yeast species found in bees and pollen. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63: 3896-3903.
- De Lucca, P.A & M. Vallejo-Marín. 2013.** What’s the ‘buzz’ about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 429-435.
- Detry, R., N. Simon-Delso, E. Bruneau & H-M. Daniel. 2020.** Specialisation of yeast genera in different phases of bee bread maturation. *Microorganisms* 8: 1789.
- Díaz, S., S.S. Urbano, L. Caesar, B. Blochtein, A. Sattler, V. Zuge & K.L. Haag. 2017.** Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. *J Invertebr Pathol.* 143: 35–39.
- Disayathanoowat, T., H. Li, N. Supapimon, N. Suwannarach, S. Lumyong, P. Chantawannakul & J. Guo. 2020.** Different dynamics of bacterial and fungal communities in hive-stored bee bread and their possible roles: A case study from two commercial honey bees in China. *Microorganisms* 8: 264.
- Drew, L.W. 2011.** Are we losing the science of taxonomy? *BioScience* 61: 942–946.
- Edgar, R.C. 2013.** UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 10: 996–998.
- Engel, P., V.G. Martinson & N.A. Moran. 2012.** Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *PNAS.* 109: 11002–11007.
- Evison, S.E. & A.B. Jensen. 2018.** The biology and prevalence of fungal diseases in managed and wild bees. *Curr Opin Insect Sci.* 26: 105–113.
- Ferraz, R.E., P.M. Lima, D.S. Pereira, C.C.O. Freitas & F.M.C. Feijó. 2008.** Microbiota fúngica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). *Neotrop Entomol.* 37: 345–346
- Foley, K., G. Fazio, A.B. Jensen & W.O. Hughes. 2014.** Nutritional limitation and resistance to opportunistic *Aspergillus* parasites in honey bee larvae. *J Invertebr Pathol.* 111:68–73.
- Gilliam, M. 1979.** Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie* 10: 43–53.

- Gilliam, M., H.L. Morton, D.B. Prest, R.D. Martin & L.J. Wickerham. 1977.** The mycoflora of adult worker honeybees, *Apis mellifera*: effects of 2,4,5-T and caging of bee colonies. J Invertebr Pathol. 30:50-54.
- Gilliam, M. & D.B. Prest. 1972.** Fungi isolated from the intestinal contents of foraging worker honey bees *Apis mellifera*. J Invertebr Pathol. 20: 101–103.
- Gilliam, M., L.J. Wickerham, H.L. Morton & R.D. Martin. 1974.** Yeasts isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-D and antibiotics. J Invertebr Pathol. 24:349–356.
- Giongo, A., D.B. Crabb, A.G. Davis-Richardson, D. Chauliac, J.M. Mobberley, K.A. Gano, N. Mukherjee, G. Casella, L.F. Roesch, B. Walts, A. Riva, G. King & E.W. Triplett. 2010.** PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. The ISME J. 4: 852–861.
- Gois, G.C., G.G. Carneiro, A.E. Rodrigues, E.O. Silva & F.S. Campos. 2010.** Qualidade microbiológica do mel de abelhas *Melipona scutellaris*. PUBVET 4: 769.
- Gonçalves, P., C. Gonçalves, P.H. Brito & J.P. Sampaio, 2020.** The *Wickerhamiella/Starmerella* clade—A treasure trove for the study of the evolution of yeast metabolism. Yeast 37: 313–320.
- Guégan, M., E. Martin & C. Valiente Moro. 2020a.** Comparative analysis of the bacterial and fungal communities in the gut and the crop of *Aedes albopictus* mosquitoes: A preliminary study. Pathogens 9: 1-10.
- Guégan, M., V. Tran Van, E. Martin, G. Minard, F.H. Tran, B. Fel, A.E. Hay, L. Simon, M. Barakat, P. Potier, F.Z. Haichar & C.V. 2020b.** Moro. Who is eating fructose within the *Aedes albopictus* gut microbiota? Environ. Microbiol. 22: 1193–1206.
- Gweon, H.S., A. Oliver, J. Taylor, T. Booth, M. Gibbs, D.S. Read, R.I. Griffiths & K. Schonrogge. 2015.** PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. Methods Ecol Evol. 6: 973–980.
- Harrison, J.G., D.M. Urruty & M.L. Forister. 2016.** An exploration of the fungal assemblage in each life history stage of the butterfly, *Lycaeides melissa* (Lycaenidae), as well as its host plant *Astragalus canadensis* (Fabaceae) Fungal Ecol. 22: 10-16.
- Hartman, A.L., S. Riddle, T. McPhillips, B. Ludascher & J.A. Eisen. 2010.** Introducing W.A.T.E.R.S.: a workflow for the alignment, taxonomy, and ecology of ribosomal sequences. BMC Bioinform. 211:317.
- Hebert, P., A. Cywinska, S. Ball & J. Dewaard. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. 270: 313–321.

- Hedtke, S.M., E.J. Blitzer, G.A. Montgomery & B.N. Danforth. 2015.** Introduction of non-native pollinators can lead to trans-continental movement of bee-associated fungi. PLoS ONE 10:e0130560.
- Hroncova, Z., J. Havlik, J. Killer, I. Dostkocil, J. Tyl, M. Kamler, D. Titera, J. Hakl, J. Mrazek, V. Bunesova & V. Rada. 2015.** Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location. PloS ONE. 10: e0118707.
- IBGE. 2012.** Manual Técnico da Vegetação Brasileira. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 272p. (Manual Técnico)
- Kakumanu, M.L., A.M. Reeves, T.D. Anderson, R.R. Rodrigues & M.A. Williams. 2016.** Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. Front. Microbiol. 7: 1-11.
- Koch, H., D.P. Abrol, J. Li & P. Schmid-Hempel. 2013.** Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. Mol Ecol. 22: 2028–2044.
- Koch, H. & P. Schmid-Hempel. 2011.** Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. PNAS 108: 19288–19292.
- Köljal, U., R.H. Nilsson, K. Abarenkov, L. Tedersoo, A.F.S Taylor, M. Bahram, S.T. Bates, T.D. Bruns, J. Bengtsson-Palme, T.M. Callaghan, B. Douglas, T. Drenkhan, U. Eberhardt, M. Dueñas, T. Grebenc, G.W. Griffith, M. Hartmann, P.M. Kirk, P. Kohout, E. Larsson, B.D. Lindahl, R. Lücking, M.P. Martín, P.B. Matheny, N.H. Nguyen, T. Niskanen, J. Oja, K.G. Peay, U. Peintner, M. Peterson, K. Põldmaa, L. Saag, I. Saar, A. Schüßler, J.A. Scott, C. Senés, M.E. Smith, A. Suija, D.L. Taylor, M.T. Telleria, M. Weiss & K-H. Larsson. 2013.** Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. Mol Ecol. 22: 5271-5277.
- Kurtzman, C.P., N.P. Price, K.J. Ray & T-M. Kuo. 2010.** Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. FEMS Microbiol. Lett. 311: 140–146.
- Kwong, W.K., A.L. Mancenido & N.A. Moran. 2017.** Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. R. Soc. Open Sci. 4: 170003.
- Lee, F.J. K.I. Miller, J.B. McKinlay & I.L.G. Newton. 2018.** Differential carbohydrate utilization and organic acid production by honey bee symbionts. FEMS Microbiol Ecol. 94: 1-10.
- Leonhardt, S.D. & M. Kaltenpoth. 2014.** Microbial communities of three sympatric Australian stingless bee species. PLoS ONE 9: e105718.
- Li, J., H. Qin, J. Wu, B.M. Sadd, X. Wang, D.E. Jay, W. Peng¹ & Y. Chen. 2012.** The prevalence of parasites and pathogens in Asian honeybees *Apis cerana* in China. PLoS ONE 7: e47955.

- Lücking, R., M.C. Aime, B. Robbertse, A.N. Miller, H.A. Ariyawansa, T. Aoki, G. Cardinali, P.W. Crous, I.S. Druzhinina, D.M. Geiser, D.L. Hawksworth, K.D. Hyde, L. Irinyi, R. Jeewon, P.R. Johnston, P.M. Kirk, E. Malosso, T.W. May, W. Meyer, M. Öpik, V. Robert, M. Stadler, M. Thines, D. Vu, A.M. Yurkov, N. Zhang & C.L. Schoch. 2020.** Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?. *IMA Fungus* 11:14.
- Ludvigsen, J., Å. Andersen, L. Hjeljord & K. Rudi. 2020.** The honeybee gut mycobiota cluster by season versus the microbiota which cluster by gut segment. *Veterinary sciences* 8: 4.
- Lumbsch, H.T. & S.D. Leavitt. 2011.** Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Divers.* 50:59–72.
- Malacrinò, A., L. Schena, O.Campolo, F. Laudani, S. Mosca, G. Giunti, C.P. Strano & V. Palmeri. 2017.** A metabarcoding survey on the fungal microbiota associated to the Olive Fruit Fly. *Microb Ecol.* 73, 677–684.
- Malassigné, S., G. Minard, L. Vallon, E. Martin, C. Valiente Moro & P. Luis. 2021.** Diversity and functions of yeast communities associated with insects. *Microorganisms* 9: 1552.
- Martin, D. & E. Rybicki. 2000.** RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics.* 16: 562-563.
- McFrederick, Q.S., U.G. Mueller & R.R. James. 2014.** Interactions between fungi and bacteria influence microbial community structure in the *Megachile rotundata* larval gut. *P Roy Soc Lond B Bio.* 281: 20132653.
- McFrederick, Q.S. & S.M. Rehan. 2019.** Wild bee pollen usage and microbial communities co-vary across landscapes. *Microb Ecol.* 77, 513–522.
- McMurdie, P.J. & S. Holmes. 2013.** Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8: e61217
- Menezes, C., A. Vollet-Neto, A.J. Marsaioli, D. Zampieri, I.C. Fontoura, A.D. Luchessi & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2015.** A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Curr. Biol.* 25: 2851–2855.
- Nunes-Silva P., N. Piot, I. Meeus, B. Blochtein & G. Smagghe. 2016.** Absence of Leishmaniinae and Nosematidae in stingless bees. *Sci Rep.* 6:3254
- Pacini, E. & M. Hesse. 2005.** Pollenkitt—its composition, forms and functions. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 200: 399–415.
- Paludo, C.R., C. Menezes, E.A. Silva-Junior, A. Vollet-Neto, A. Andrade-Dominguez, G. Pishchany, L. Khadempour, F.S. do Nascimento, C.R. Currie, R. Kolter, J. Clardy & M.T. Pupo. 2018.** Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. *Sci Rep.* 8: 1122.

- Paludo, C.R., G. Pishchany, A. Andrade-Dominguez, E.A. Silva-Junior, C. Menezes, F.S. Nascimento, C.R. Currie, R. Kolter, J. Clardy & M.T. Pupo. 2019.** Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis. *PloS ONE*, 14: e0219696.
- Pimentel, M.R.C., Y. Antonini, R.P. Martins, M-A. Lachance & C.A. Rosa. 2005.** *Candida riodecensis* and *Candida cellae*, two new yeast species from the *Starmerella* clade associated with solitary bees in the Atlantic rain forest of Brazil. *FEMS Yeast Res.* 5: 875-879.
- Porrini, M.P., L.P. Porrini, P.M. Garrido, C.M. Silva Neto, D.P. Porrini, F. Muller, L.A. Nuñez, L. Alvarez, P.F. Iriarte & M.J. Eguaras. 2017.** *Nosema ceranae* in south american native stingless bees and social wasp. *Microb Ecol.* 74: 761–764.
- Ptaszynska, A.A., J. Paleolog & G. Borsuk. 2016.** *Nosema ceranae* infection promotes proliferation of yeasts in honey bee intestines. *PLoS ONE* 11: e0164477.
- Qian, X., X. Li, H. Li & D. Zhang. 2021.** Floral fungal-bacterial community structure and co-occurrence patterns in four sympatric island plant species *Fungal Biol.* 125: 49-61.
- Raymann, K. & N.A. Moran. 2018.** The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Curr Opin Insect Sci.* 26: 97–104.
- Rosa, C.A. & M-A. Lachance. 1998.** The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. *Int J Syst Bacteriol.* 4:1413-1417
- Rosa, C.A. & M-A. Lachance. 2005.** *Zygosaccharomyces machadoi* sp. n., a yeast species isolated from a nest of the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Lundiana* 6: 27–29.
- Rosa, C.A., M-A Lachance, J.O.C. Silva, A.C.P. Teixeira, M.M. Marini, Y. Antonini & R.P. Martins. 2003.** Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Res.* 4: 271-275.
- Rosa, C.A., R.P. Martins, Y. Antonini & M-A. Lachance. 1999.** *Candida batistae*, a new yeast species associated with solitary digger nesting bees in Brazil. *Mycologia*, 9: 428-433.
- Rothman, J.A., C. Andrikopoulos, D. Cox-Foster & Q.S. McFrederick. 2019.** floral and foliar source affect the bee nest microbial community. *Microb Ecol.* 78: 506–516.
- Rouzé, R., A. Moné, F. Delbac, L. Belzunces & N. Blot. 2019.** The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*. *Microbes and environments* 34: 226–233.
- Santos, A.R.O., M.P. Leon, K.O. Barros, L.F.D. Freitas, A.F.S. Hughes, P.B. Morais, M-A. Lachance & C. Rosa. 2018.** *Starmerella camargoi* f.a., sp. nov., *Starmerella ilheusensis*

f.a., sp. nov., *Starmerella litoralis* f.a., sp. nov., *Starmerella opuntiae* f.a., sp. nov., *Starmerella roubikii* f.a., sp. nov. and *Starmerella vitae* f.a., sp. nov., isolated from flowers and bees, and transfer of related *Candida* species to the genus *Starmerella* as new combinations. Int J Syst Evol Microbiol. 68: 1333-1343.

Saksinchai, S., Suzuki, M., Chantawannakul, P., Ohkuma, M., Lumyong, S., 2012. A novel ascosporogenous yeast species, *Zygosaccharomyces siamensis*, and the sugar tolerant yeasts associated with raw honey collected in Thailand. Fungal Divers. 52: 123-139.

Schoch, C.L., K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J.L. Spouge, C.A. Levesque, W. Chen & Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. PANAS. 109: 6241–6246.

Silva De Souza, J.R., M. Oliveira Costa, M.I. Lopes Da Silva & C.G. Nunes Da Silva. 2020. Ocorrência de fungos associados ao trato digestivo de abelhas sem ferrão *Melipona seminigra* Merrillae Cockerell, 1919, p. 114-121. In Silva Neto, B.R. (eds.), Micologia: Fungos e/ou seus Metabólitos como Objeto de Estudo. Ponta Grossa, Atena, 174p.

Souza, J.R.S., M.I.M. Sarquis, M.C. Pantoja, P.Q. Costa Neto, J.O. Pereira, R.M. Sousa Galvão, M.I. Lopes da Silva. 2018. Occurrence of filamentous fungi associated with stingless bees *Melipona* in *Meliponaries* at the metropolitan region of Manaus, Amazonas. Revista da Biologia 18: 1-5.

Stuart, R.M., C. Lamas & I.C. Pimentel. 2004. *Trigona* sp. como visitante floral e vetor de esporos fúngicos para goiabeira (*Psidium guajava* L.–Myrtaceae). Revista Estudos de Biologia 26: 19-23.

Taberlet, P., E. Coissac, F. Pompanon, C. Brochmann & E. Willerslev. 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. Mol Ecol. 21: 2045-2050.

Teixeira, A.C.P., M.M. Marini, J.R. Nicoli, Y. Antonini, R.P. Martins, M-A. Lachance & C.A. Rosa 2003. *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 339-343.

Vásquez, A., E. Forsgren, I. Fries, R.J. Paxton, E. Flaberg, L. Szekely & T.C. Olofsson. 2012. Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. PLoS ONE. 7: e33188.

Vega, F.E. & P.F. Dowd. 2005. The role of yeasts as insect endosymbionts, p. 211-243. In. Veja, F.E & B. Meredith (eds.), Insect fungal associations: ecology and evolution. Oxford, Oxford University Press, 333p.

Vetrovský, T., P. Baldrian, D. Morais & B. Berger. 2018. SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. Bioinform. 1: 3.

- Vojvodic, S., A.B. Jensen, R.R. James, J.J. Boomsma & J. Eilenberg. 2011.** Temperature dependent virulence of obligate and facultative fungal pathogens of honeybee brood. *Vet Mic.* 149: 200–205.
- Wirta, H., N. Abrego, K. Miller, T. Roslin & E. Vesterinen. 2021.** DNA traces the origin of honey by identifying plants, bacteria and fungi. *Sci Rep.* 11: 4798.
- Yun, J-H., M-J. Jung, P.S. Kim & J-W. Bae. 2018.** Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee. *Sci Rep.*, 8: 2019.
- Zheng, H., A. Nishida, W.K. Kwong, H. Koch, P. Engel, M.I. Steele & N.A. Moran. 2016.** Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. *mBio* 7: e01326-16.

3172 Tabela 1. Relação das amostras coletadas nos estados de Pernambuco, Rio Grande do Norte e Rio
 3173 Grande do Sul, tipo de Bioma e situação para cada localidade de coleta.

Localidade	Local da caixa	Amostra	Bioma	Situação
Aldeia-PE	Dentro da colmeia	ITS11, ITS12, ITS13, ITS14, ITS15	Remanescente de Mata atlântica	Nativa
Aldeia-PE	Entrada da colmeia	ITS16, ITS17, ITS18, ITS19, ITS20	Remanescente de Mata atlântica	Nativa
Aldeia-PE	Dentro da colmeia	ITS21, ITS22, ITS23, ITS24, ITS25	Remanescente de Mata atlântica	Nativa
Aldeia-PE	Entrada da colmeia	ITS26, ITS27, ITS28, ITS29, ITS30	Remanescente de Mata atlântica	Nativa
Aldeia-PE	Dentro da colmeia	ITS31, ITS32, ITS33, ITS34, ITS35	Remanescente de Mata atlântica	Nativa
Aldeia-PE	Entrada da colmeia	ITS36, ITS37, ITS38, ITS39, ITS40	Remanescente de Mata atlântica	Nativa
Mossoró-RN	Dentro da colmeia	ITS41, ITS42, ITS43, ITS44, ITS45	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Entrada da colmeia	ITS48, ITS49, ITS50, ITS51, ITS52	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Dentro da colmeia	ITS54, ITS55, ITS56, ITS57, ITS58	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Entrada da colmeia	ITS61, ITS61, ITS63, ITS64, ITS65	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Dentro da colmeia	ITS67, ITS68, ITS69, ITS70, ITS71	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Entrada da colmeia	ITS73, ITS74, ITS75, ITS76, ITS77	Semiárido	Introduzida
Novo Hamburgo-RS	Dentro da colmeia	ITS80, ITS81, ITS82, ITS83, ITS84	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida
Novo Hamburgo-RS	Entrada da colmeia	ITS85, ITS86, ITS87, ITS88, ITS89	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida
Novo Hamburgo-RS	Dentro da colmeia	ITS90, ITS91, ITS92, ITS93, ITS94	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida
Novo Hamburgo-RS	Entrada da colmeia	ITS95, ITS96, ITS97, ITS98, ITS99	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida

Novo Hamburgo-RS	Dentro da colmeia	ITS100, ITS101, ITS102, ITS103, ITS104	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida
Novo Hamburgo-RS	Entrada da colmeia	ITS105, ITS106, ITS107, ITS108, ITS109	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida

Tabela 2. Fungos identificados a nível de espécie pelo Blast, com correspondência de 97% de similaridade.

Filo	Família	Gênero	Espécie
Ascomycota	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria eichhorniae</i>
Ascomycota	Onygenaceae	<i>Aphanoascus</i>	<i>Aphanoascus terreus</i>
Basidiomycota	Pterulaceae	<i>Aphanobasidium</i>	<i>Aphanobasidium pseudotsugae</i>
Ascomycota	Apiosporaceae	<i>Arthrinium</i>	<i>Arthrinium pseudosinense</i>
Ascomycota	Orbiliaceae	<i>Arthrobotrys</i>	<i>Arthrobotrys entomopaga</i>
Ascomycota	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Ascomycota	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus penicillioides</i>
Ascomycota	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus ruber</i>
Ascomycota	Aureobasidiaceae	<i>Aureobasidium</i>	<i>Aureobasidium thailandense</i>
Ascomycota	Saccharomycetales fam Incertae sedis	<i>Candida</i>	<i>Candida apicola</i>
Ascomycota	Saccharomycetales fam Incertae sedis	<i>Candida</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>
Ascomycota	Saccharomycetales fam Incertae sedis	<i>Candida</i>	<i>Candida albicans</i>
Ascomycota	Saccharomycetales fam Incertae sedis	<i>Candida</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Ascomycota	Mycosphaerellaceae	<i>Cercospora</i>	<i>Cercospora canescens</i>
Basidiomycota	Meruliaceae	<i>Ceriporia</i>	<i>Ceriporia lacerata</i>
Basidiomycota	Meruliaceae	<i>Ceriporia</i>	<i>Ceriporia xylostomatoides</i>

Ascomycota	Saccharomycetaceae	<i>Citeromyces</i>	<i>Citeromyces siamensis</i>
Ascomycota	Parmeliaceae	<i>Crespoa</i>	<i>Crespoa carneopruinata</i>
Ascomycota	Pleosporaceae	<i>Curvularia</i>	<i>Curvularia sorghina</i>
Ascomycota	Pleosporaceae	<i>Curvularia</i>	<i>Curvularia affinis</i>
Basidiomycota	Trichosporonaceae	<i>Cutaneotrichosporon</i>	<i>Cutaneotrichosporon terricola</i>
Ascomycota	Phaffomycetaceae	<i>Cyberlindnera</i>	<i>Cyberlindnera jadinii</i>
Ascomycota	Cyphellophoraceae	<i>Cyphellophora</i>	<i>Cyphellophora oxyspora</i>
Ascomycota	Valsaceae	<i>Cytospora</i>	<i>Cytospora magnoliae</i>
Ascomycota	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>	<i>Diaporthe lusitanicae</i>
Ascomycota	Erysiphaceae	<i>Erysiphe</i>	<i>Erysiphe quercicola</i>
Ascomycota	Teratosphaeriaceae	<i>Eupenidiella</i>	<i>Eupenidiella venezuelensis</i>
Basidiomycota	Polyporaceae	<i>Fomitella</i>	<i>Fomitella supina</i>
Ascomycota	Nectriaceae	<i>Gibberella</i>	<i>Gibberella zeae</i>
Basidiomycota	Golubeviaceae	<i>Golubevia</i>	<i>Golubevia pallescens</i>
Ascomycota	Saccharomycodaceae	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora vineae</i>
Ascomycota	Xylariales fam Incertae sedis	<i>Hansfordia</i>	<i>Hansfordia pulvinata</i>
Ascomycota	Xylariales fam Incertae sedis	<i>Hansfordia</i>	<i>Hansfordia pulvinata</i>
Ascomycota	Dothideales fam Incertae sedis	<i>Hortaea</i>	<i>Hortaea werneckii</i>
Basidiomycota	Hyphodermataceae	<i>Hyphoderma</i>	<i>Hyphoderma setigerum</i>
Basidiomycota	Hyphodermataceae	<i>Hyphoderma</i>	<i>Hyphoderma setigerum</i>
Ascomycota	Saccharomycetaceae	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Ascomycota	Saccharomycetaceae	<i>Lachancea</i>	<i>Lachancea fermentati</i>
Ascomycota	Cordycipitaceae	<i>Lecanicillium</i>	<i>Lecanicillium muscarium</i>
Basidiomycota	Malasseziaceae	<i>Malassezia</i>	<i>Malassezia globosa</i>
Basidiomycota	Malasseziaceae	<i>Malassezia</i>	<i>Malassezia globosa</i>
Basidiomycota	Marasmiaceae	<i>Marasmius</i>	<i>Marasmius tenuissimus</i>
Basidiomycota	Polyporaceae	<i>Megasporoporia</i>	<i>Megasporoporia setulosa</i>

Basidiomycota	Brachybasidiaceae	<i>Meira</i>	<i>Meira argovae</i>
Ascomycota	Debaryomycetaceae	<i>Meyerozyma</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
Ascomycota	Botryosphaeriaceae	<i>Neofusicoccum</i>	<i>Neofusicoccum australe</i>
Ascomycota	Sporocadaceae	<i>Neopestalotiopsis</i>	<i>Neopestalotiopsis foedans</i>
Ascomycota	Sordariaceae	<i>Neurospora</i>	<i>Neurospora crassa</i>
Ascomycota	Pichiaceae	<i>Ogataea</i>	<i>Ogataea philodendri</i>
Basidiomycota	Rhynchogastremataceae	<i>Papiliotrema</i>	<i>Papiliotrema flavescens</i>
Basidiomycota	Rhynchogastremataceae	<i>Papiliotrema</i>	<i>Papiliotrema laurentii</i>
Ascomycota	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium steckii</i>
Ascomycota	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium bialowiezense</i>
Basidiomycota	Peniophoraceae	<i>Peniophora</i>	<i>Peniophora albobadia</i>
Basidiomycota	Meruliaceae	<i>Phaeophlebiopsis</i>	<i>Phaeophlebiopsis caribbeana</i>
Basidiomycota	Hymenochaetaceae	<i>Phellinus</i>	<i>Phellinus gilvus</i>
Ascomycota	Xylariales fam Incertae sedis	<i>Phialemoniopsis</i>	<i>Phialemoniopsis curvata</i>
Basidiomycota	Meruliaceae	<i>Phlebia</i>	<i>Phlebia floridensis</i>
Basidiomycota	Fomitopsidaceae	<i>Pilatoporus</i>	<i>Pilatoporus bondartsevae</i>
Ascomycota	Debaryomycetaceae	<i>Priceomyces</i>	<i>Priceomyces fermenticarens</i>
Ascomycota	Mycosphaerellaceae	<i>Pseudocercospora</i>	<i>Pseudocercospora norchiensis</i>
Ascomycota	Botryosphaeriaceae	<i>Pseudofusicoccum</i>	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>
Ascomycota	Aureobasidiaceae	<i>Pseudosydowia</i>	<i>Pseudosydowia eucalypti</i>
Basidiomycota	Hymenochaetales fam Incertae sedis	<i>Resinicium</i>	<i>Resinicium saccharicola</i>
Basidiomycota	Hymenochaetales fam Incertae sedis	<i>Resinicium</i>	<i>Resinicium confertum</i>
Basidiomycota	Sporidiobolaceae	<i>Rhodosporeidiobolus</i>	<i>Rhodosporeidiobolus nylandii</i>
Ascomycota	Xylariales fam Incertae sedis	<i>Robillarda</i>	<i>Robillarda roystoneae</i>
Basidiomycota	Schizoporaceae	<i>Schizopora</i>	<i>Schizopora flavipora</i>
Ascomycota	Schizosaccharomycetaceae	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>

Ascomycota	Cordycipitaceae	<i>Simplicillium</i>	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
Ascomycota	Cordycipitaceae	<i>Simplicillium</i>	<i>Simplicillium lamellicola</i>
Ascomycota	Saccharomycetales fam Incertae sedis	<i>Starmerella</i>	<i>Starmerella meliponinorum</i>
Ascomycota	Saccharomycetales fam Incertae sedis	<i>Starmerella</i>	<i>Starmerella bombicola</i>
Basidiomycota	Agaricostilbaceae	<i>Sterigmatomyces</i>	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>
Ascomycota	Trichocomaceae	<i>Talaromyces</i>	<i>Talaromyces rotundus</i>
Ascomycota	Saccharomycetaceae	<i>Torulaspora</i>	<i>Torulaspora indica</i>
Ascomycota	Cladosporiaceae	<i>Toxicocladosporium</i>	<i>Toxicocladosporium irritans</i>
Basidiomycota	Coriolaceae	<i>Trametes</i>	<i>Trametes trogii</i>
Basidiomycota	Coriolaceae	<i>Trametes</i>	<i>Trametes olivaceopora</i>
Basidiomycota	Coriolaceae	<i>Trametes</i>	<i>Trametes villosa</i>
Basidiomycota	Hymenochaetaceae	<i>Tropicoporus</i>	<i>Tropicoporus tropicalis</i>
Ascomycota	Dissoconiaceae	<i>Uwebraunia</i>	<i>Uwebraunia musae</i>
Ascomycota	Valsaceae	<i>Valsa</i>	<i>Valsa eugeniae</i>
Ascomycota	Phaffomycetaceae	<i>Wickerhamomyces</i>	<i>Wickerhamomyces sydowiorum</i>
Ascomycota	Mycosphaerellaceae	<i>Zasmidium</i>	<i>Zasmidium syzygii</i>
Ascomycota	Mycosphaerellaceae	<i>Zasmidium</i>	<i>Zasmidium musae</i>
Ascomycota	Saccharomycetaceae	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Ascomycota	Saccharomycetaceae	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
Ascomycota	Saccharomycetaceae	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
Ascomycota	Saccharomycetaceae	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces siamensis</i>
Ascomycota	Saccharomycetaceae	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>
Ascomycota	Saccharomycetaceae	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>

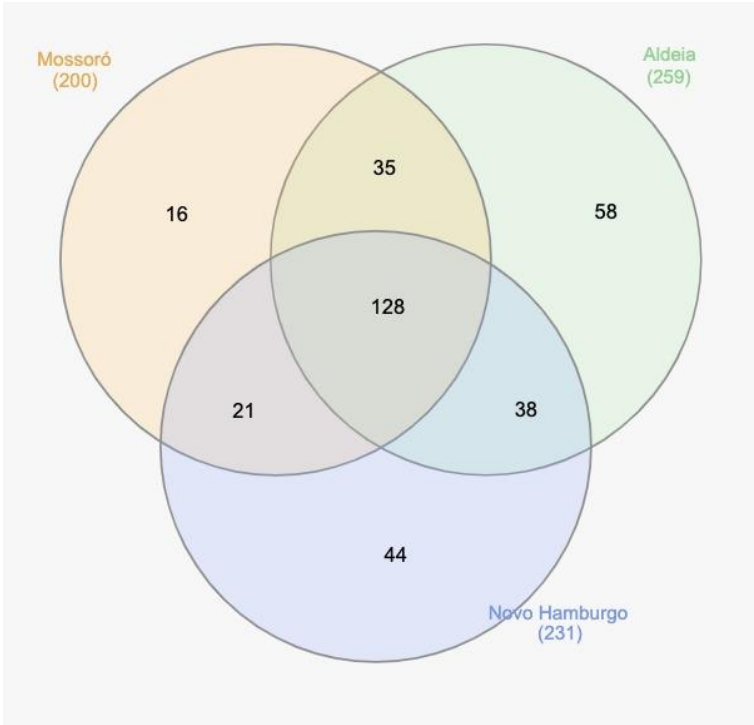
3179
3180
3181
3182
3183
3184
3185

3186



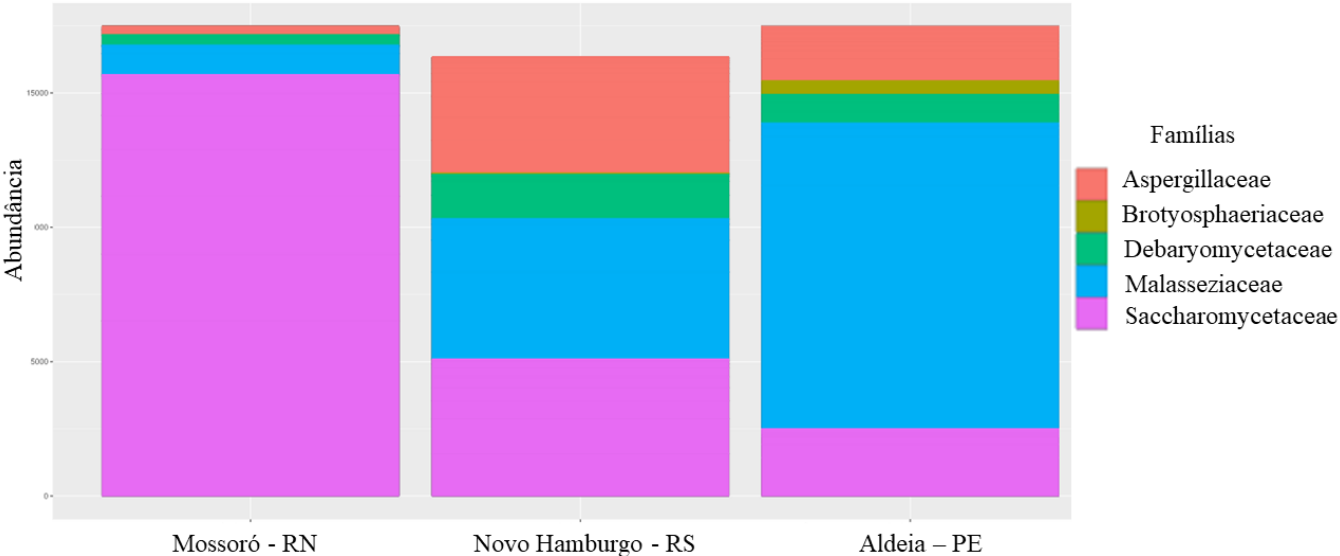
3187 Figura 1. Mapa do Brasil, com destaque para o local (ecorregiões) de coleta de *Melipona scutellaris*.
3188 Cidade de Mossoró no estado do Rio Grande do Norte, Camaragibe no estado de Pernambuco e a
3189 cidade de Novo Hamburgo localizado no estado do Rio Grande do Sul.

3190
3191
3192



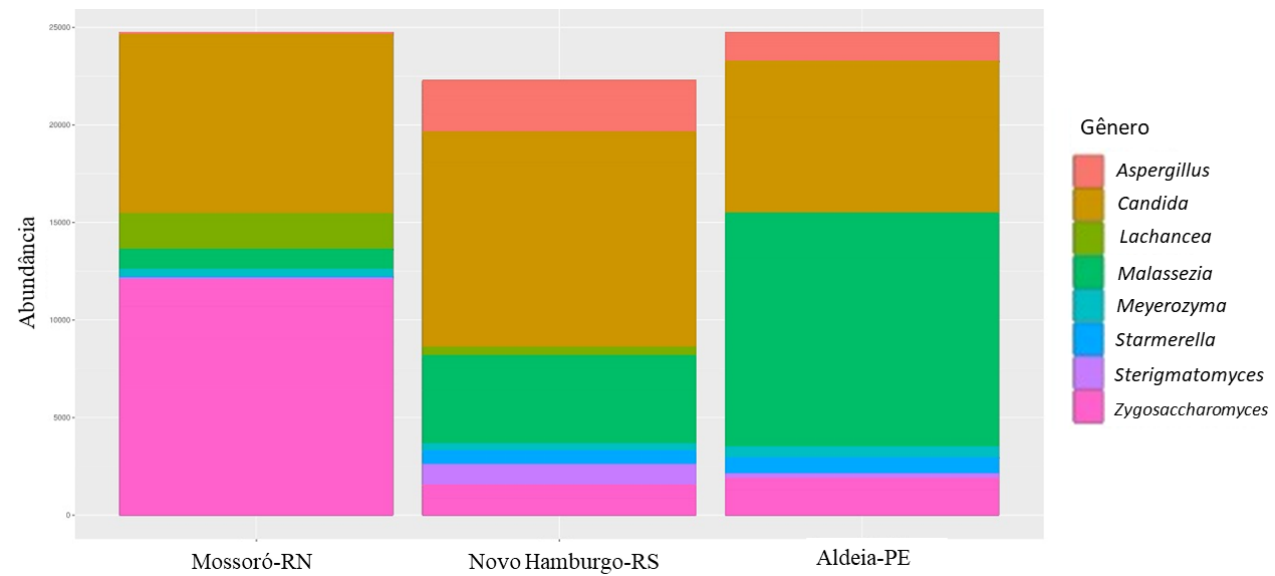
3193 Figura 2. Diagrama de Venn mostrando as quantidades de unidades taxonômicas operacionais
3194 (OTUs) (OTUs; 97% de identidade) fúngicas compartilhadas e únicas entre Mossoró-RN, Aldeia-
3195 PE e Novo Hamburgo-RS.

3196



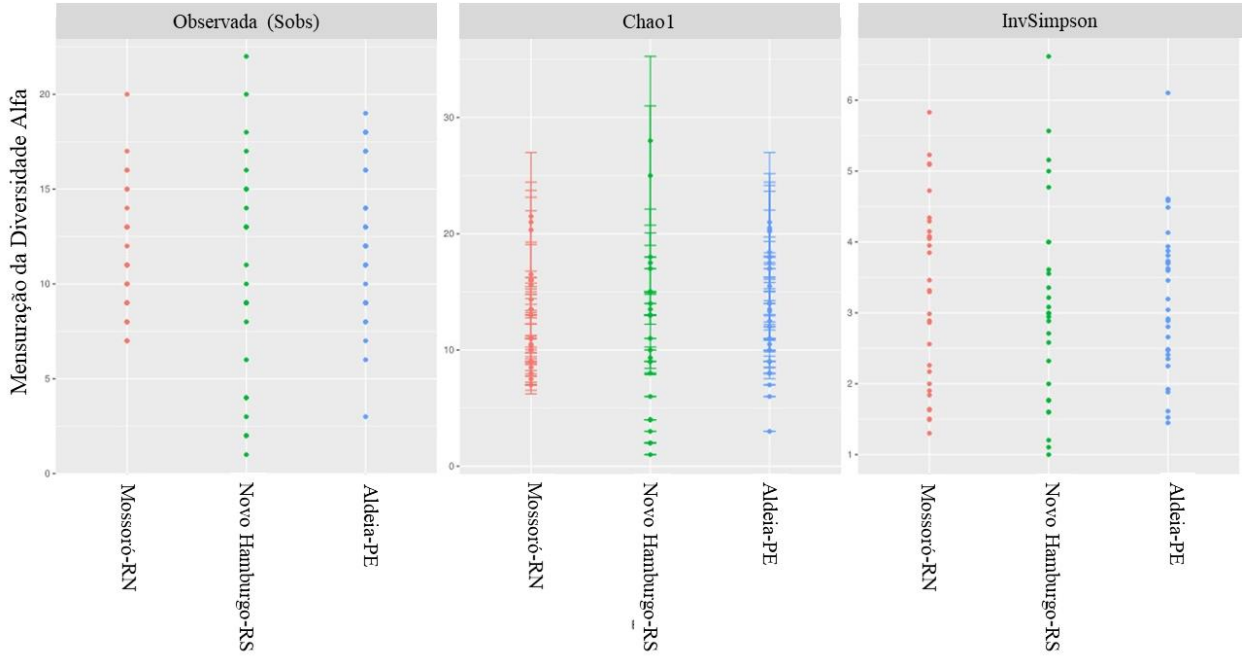
3197 Figura 3. Gráfico de barras com as oito OTUs mais abundantes a nível de nível de família para
3198 Mossoró-RN, Novo Hamburgo-RS e Aldeia-PE.

3199



3200 Figura 4. Gráfico de barras com as oito OTUs mais abundantes a nível de gênero e sua distribuição
3201 por abundância para Mossoró-RN, Novo Hamburgo-RS e Aldeia-PE;

3202



3203 Figura 5. Mensuração das Diversidades Alfa, Observada (Sobs), Chao1 e InvSimpson para
3204 Mossoró-RN, Novo Hamburgo-RS e Aldeia-PE.

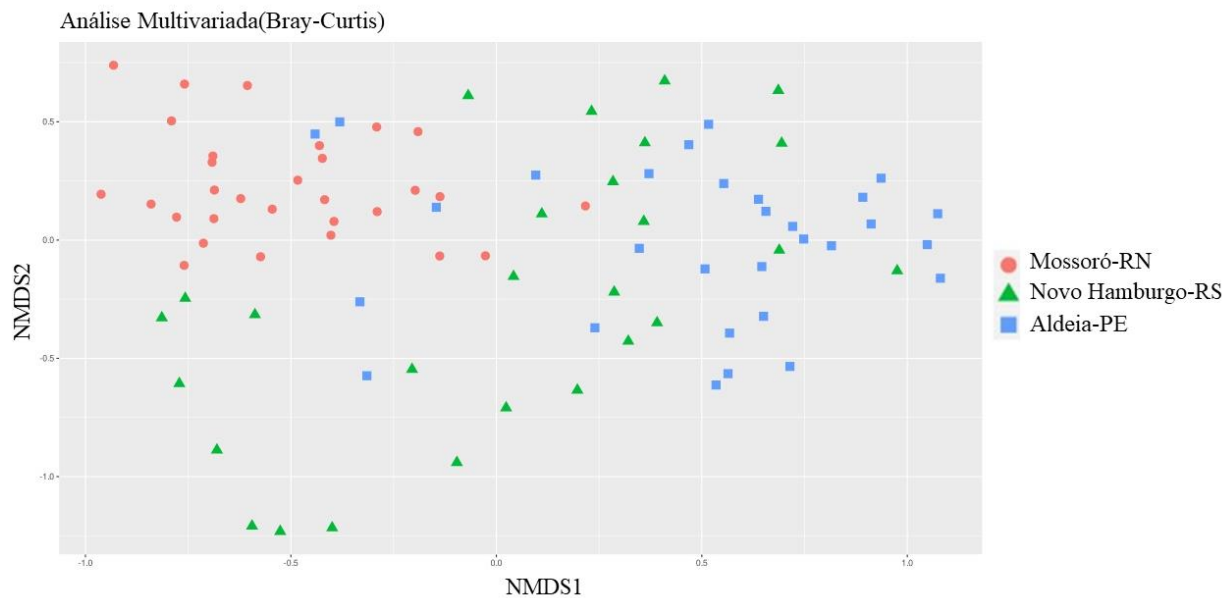


Figura 6. Análise Multivariada (NMDs) utilizando como matriz a distância de dissimilaridade de Bray-Curtis para as amostras de Mossoró-RN (círculo rosa), Novo Hamburgo-RS (triângulo verde) e Aldeia-PE (quadrado azul), valor de Stress= 0.1770066.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho trouxe novas informações sobre a microbiota fúngica e bacteriana de *Melipona scutellaris*. Porém, mais estudos são necessários para essa espécie e outras abelhas sem ferrão, para que fique claro quais fungos e bactérias fazem parte de um núcleo central e quais vão variar conforme a situação que a colmeia se encontra, como esses microrganismos se comportam diante de diferentes situações e suas funções. Informações como essas servem como base para novos estudos, e auxiliam na preservação e no cuidado do manejo de *M. scutellaris*, o que é de grande valia devido sua importância tanto no campo socioeconômico, quanto para a conservação da biodiversidade.