

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

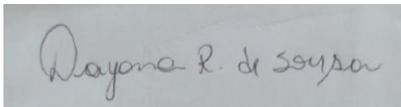
Banca Examinadora:

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).

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

28 As abelhas eussociais provisionam alimento para suas crias, apresentam castas reprodutivas,
29 divisão de tarefas conforme a idade das operárias, sobreposição de gerações e cuidado cooperativo
30 da prole (Michener 1969, Wilson & Hölldobler 2005, Hartfelder *et al.* 2006). Somente duas tribos
31 apresentam esses aspectos: Apini (abelhas melíferas) e Meliponini (abelhas sem ferrão) (Michener
32 1974, Imperatriz-Fonseca *et al.* 2017). De modo contrário às abelhas eussociais, as abelhas
33 solitárias não apresentam esta divisão etária, já que vivem sozinhas no ninho e cada abelha fêmea
34 é responsável pela sua própria prole, obtenção de alimento e normalmente sem contato entre
35 gerações (Michener 2000, Wittwer *et al.* 2017).

36 Nas abelhas eussociais a divisão de trabalho se dá de acordo com a idade, caracterizando a
37 divisão etária do trabalho. Desta forma, abelhas recém-emergidas e mais jovens permanecem no
38 interior da colônia realizando tarefas geralmente relacionadas ao ninho, como limpeza da colônia,
39 alimentação da prole e produção de cera (Kerr 1948, Michener 1974, Kerr *et al.* 1996, Nogueira-
40 Neto 1997). À medida que as abelhas vão se tornando mais velhas, as tarefas tornam-se externas à
41 colônia e, geralmente, iniciam o forrageamento na busca de pólen e néctar (Kerr 1948, Michener
42 1974, Kerr *et al.* 1996, Nogueira-Neto 1997). Já a rainha, por sua vez, desempenha o papel principal
43 de reprodução, sendo essa a única a reproduzir dentro da colônia e sai somente para acasalar ainda
44 enquanto jovem (Michener 1974, Kerr *et al.* 1996, Nogueira-Neto 1997, Santos & Cruz-Landim
45 2002). No caso dos meliponíneos, a rainha realiza o voo nupcial somente uma vez durante toda a
46 sua vida e com um único macho, enquanto a rainha de abelhas melíferas pode acasalar com diversos
47 machos (Kerr 1948, Kerr *et al.* 1996, Imperatriz-Fonseca *et al.* 2017).

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

54 Diversos insetos contribuem para polinização, porém as abelhas se destacam prontamente
55 nesse exercício (Giannini *et al.* 2015, IPBS 2016, BPBES 2019) devido as suas características
56 morfológicas que incluem estruturas especializadas para coletar e carregar pólen e néctar –
57 principais fontes de proteínas e carboidratos desde a fase larval das abelhas, até a fase adulta
58 (Nogueira-Neto 1997, Nicolson 2011, Feás *et al.* 2012, da Silva *et al.* 2014, Mohammad *et al.*
59 2021). Durante visitas, nas mais diversas flores, o pólen se desprende das abelhas e chaga ao estigma
60 de outras flores, fertilizando-as.

61 Apesar de diversos insetos serem de extrema importância para polinização, são as abelhas
62 as principais responsáveis pela polinização de culturas de cunho econômico. Estima-se que 75%
63 das culturas agrícolas que se beneficiam da polinização, são polinizadas por abelhas (Klein *et al.*
64 2007). Apesar de uma longa lista de espécies de abelhas existentes em todo o mundo, *A. mellifera*
65 com certeza ainda é a espécie mais difundida, estudada e utilizada para fins lucrativos, por ser uma
66 espécie generalista, de conhecido manejo e fácil aclimação (Klein *et al.* 2007, Kleijn *et al.* 2015,
67 Klein *et al.* 2018). Porém espécies nativas contribuem significativamente para esse serviço
68 ecossistêmico (Garibaldi *et al.* 2016, Klein *et al.* 2018).

69 Além do serviço ecossistêmico de regulação gerado pelas abelhas, elas oferecem ainda
70 serviços de provisão e cultural através do meio de subsistência de apicultores e meliponicultores O
71 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.

89

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

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

97 O Brasil possui quase a metade das 516 espécies de abelhas sem ferrão descritas no mundo
98 (Ascher & Pickering, 2019). A diversidade de espécies é refletida nas muitas diferenças
99 interespecíficas, como, por exemplo, o tamanho do corpo, o raio de ação, as estratégias de
100 forrageamento e as preferências florais (Kerr 1948, Michener 1974, Nascimento & Nascimento
101 2012, Oliveira *et al.* 2013, Silva *et al.* 2013).

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

113 Dentro da tribo os gêneros que mais se destacam em termos de número de espécie são
114 *Trigona*, *Plebeia*, *Scaptotrigona*, *Trigonisca* e *Melipona* que é representado por 74 espécies, das
115 quais 40 ocorrem no Brasil (Camargo & Vit 2003, Ramírez *et al.* 2010, Pedro 2014, Lavinhas *et al.*
116 2019). As abelhas sem ferrão, assim como *Apis* sp., são eussociais, porém podem apresentar
117 marcantes diferenças no estilo de vida e comportamento. Apresentam ninhos perenes compostos
118 por uma rainha-mãe e centenas a milhares de operárias (Michener 1974, Wille 1983). Devido sua

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

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

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

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

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

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

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

158 Outra característica das espécies do gênero *Melipona* é o fato de serem as únicas abelhas
159 eussociais que realiza “*buzz polination*” ou polinização por vibração, desprendendo o pólen das
160 flores de anteras poricidas (Fidalgo & Kleinert 2009, Nunes-Silva *et al.* 2010, Rosi-Denadai *et al.*
161 2018, Vallejo-Marín 2019). Espécies da família Solanaceae, como tomate e berinjela, são bons
162 exemplos de plantas com anteras poricidas e polinizadas com sucesso por abelhas do gênero (Bispo
163 dos Santos *et al.* 2009, Nunes-Silva *et al.* 2013).

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

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

173 A tribo Meliponini é responsável por grande parte da polinização da flora nativa em diversos
174 biomas brasileiros contribuindo para a conservação da biodiversidade (Silveira *et al.* 2002, Klein *et*
175 *al.*, 2007, Imperatriz-Fonseca & Nunes-Silva 2010, Pioker-Hara *et al.* 2014, Boff *et al.* 2013, Lima
176 & Silvestre, 2017). A flora utilizada por esses meliponíneos varia amplamente conforme a região,
177 o que pode elevar seu papel ecológico no reflorestamento e conservação de remanescentes florestais
178 (Kerr *et al.* 1996, Imperatriz-Fonseca *et al.* 2011, Silva & Paz, 2012, Boff *et al.* 2013, Silva *et al.*
179 2013, Pedro 2014, Imperatriz-Fonseca *et al.* 2017, Imperatriz-Fonseca & Alves 2020).

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

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

195

196 1.3. *Melipona scutellaris*

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

204



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

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

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

218 Além de estudos voltados ao potencial produtivo de mel e das propriedades medicinais da
219 geoprópolis, *M. scutellaris* é modelo de estudos em pesquisas relacionadas a seus aspectos
220 biológicos e comportamentais particulares, tais como: a presença de poliginia – um comportamento
221 raro no gênero *Melipona*, caracterizado pela presença de mais de uma rainha fisiogástrica na
222 colmeia responsável pela postura de ovos (Carvalho *et al.* 2010, Carvalho *et al.* 2011, Souza *et al.*
223 2017); parasitismo intraespecífico praticado por operárias reprodutivas descendentes da rainha que
224 foi substituída (Alves *et al.* 2009a) e por rainhas virgens que saem do seu ninho e invadem colônias
225 órfãs (Wenseleers *et al.* 2011); diferentes estratégias de forrageamento (Silva *et al.* 2011, Roselino
226 & Hrcir, 2012, Schorkopf *et al.* 2016); localização de alimento através das vibrações torácicas
227 (Hrcir *et al.* 2008); provisionamento e oviposição de células (Pereira *et al.* 2009); caracterização
228 de células do sistema imunológico, cromossomos e glândulas *corpora allata* (Amaral *et al.* 2010,
229 Piccoli *et al.* 2018, Schumann *et al.* 2019).

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

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

243 Por conta deste cenário, *M. scutellaris* se encontra na lista de espécies ameaçadas de
244 extinção do ICMBio na categoria em perigo (EN) segundo o critério B2ab (i,ii,iii). Esse critério está
245 ligado a uma distribuição geográfica restrita e apresentando fragmentação, declínio ou flutuações;
246 onde a Área de Ocupação estimada é < 500 km²; com população severamente fragmentada ou em
247 poucas e declínio continuado (ICMBio 2013, ICMBio/MMA 2018).

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

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

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

262

263 **1.4. MICROBIOTA BACTERIANA EM ABELHAS**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

344 Em termos de imunidade, as bactérias atuam no combate de patógenos impedindo que outras
345 bactérias ou fungos entomopatogênicos causem danos à saúde das abelhas (Engel *et al.* 2012,
346 Leonhardt & Kaltenpoth *et al.* 2014, Voulgari-Kokota *et al.* 2019). Bactérias Firmicutes, por
347 exemplo, demonstraram um efeito protetor contra dois dos principais patógenos bacterianos das
348 abelhas, as larvas de *Paenibacillus* e *Melissococcus plutonius* (Forsgren *et al.* 2010, Vásquez *et al.*
349 2012, Wu *et al.* 2014). Em *Bombus* ??, recentemente foi demonstrado que a microbiota intestinal
350 é transmitida por fezes e protege contra o patógeno intestinal tripanossomatídeo *Crithidia*
351 *bombi* (Koch & Schmid-Hempel 2011b). Engel *et al.* (2012) sugeriram a possibilidade do biofilme
352 de *Gilliamella* / *Snodgrassella* funcionar como uma camada protetora contra a invasão do parasita.

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

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

366 Como a maioria dos patógenos identificados em abelhas africanizadas é encontrada em uma
367 vasta gama de espécies de Apoidea, essas abelhas podem ser fontes de contaminação para
368 Meliponini já que estes são intimamente relacionados com os Apini (Brothers 1999, Plischuk *et al.*
369 2009, Ravoet *et al.* 2014, Nunes-Silva *et al.* 2016). Porém estudos de doenças e da microbiota em
370 abelhas sem ferrão ainda são escassos, principalmente no Brasil (Díaz *et al.* 2016, Nunes-Silva *et*
371 *al.* 2016).

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

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

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

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

395

396 **1.5. MICROBIOTA FÚNGICA (MICROBIOTA)**

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

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

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

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

416 O pouco que sabemos sobre a relação entre fungos e abelhas está relacionado principalmente
417 a presença desses fungos em provisões de alimentos, nas células de cria e até mesmo externamente
418 às abelhas (Gilliam *et al.* 1984, Rosa *et al.* 2003, Brysch-Herzberg & Lachance_2004, Ferraz *et al.*
419 2008, Matos *et al.* 2011, Paludo *et al.* 2019, Dharampal *et al.* 2020, Disayathanoowat *et al.* 2020).
420 Em relação a identificação da microbiota fúngica no sistema digestivo das abelhas, os dados são
421 escassos quando comparados ao levantamento da diversidade bactérias (Rosa *et al.* 2003, Martinson
422 2011, Koch *et al.* 2012, Vásquez *et al.* 2012, Koch *et al.* 2013, Killer et a. 2014, Leonhardt e
423 Kaltenpoth 2014, Powell 2016, Graystock *et al.* 2017, Kwong e Moran 2017).

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

430 Silva de Souza *et al.* (2020) publicaram um dos poucos trabalhos no Brasil que identifica os
431 fungos associados ao trato digestivo da abelha *Melipona seminigra*. Os isolados do gênero
432 *Geotrichum* foram os mais encontrados neste estudo, seguido por *Penicillium*, *Curvularia*,
433 *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Colletotrichum* e *Candida*. Foram
434 encontrados na parte anterior do intestino 183 isolados, onde destes foram identificados 10 gêneros,
435 seguido do intestino médio, com 178 isolados e 8 gêneros identificados, e o intestino posterior com
436 161 isolados e 7 gêneros. Devido ao método de identificação desses fungos, a partir da técnica de
437 cultura e identificação morfológica, não foi possível identificar alguns fungos e nem todas as
438 estruturas reprodutivas se desenvolveram (Silva de Souza *et al.* 2020).

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

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

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

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

461

462 **1.6. METABARCODE (METABARCODING)**

463 Antes de falar de metabarcoding, é importante entender a base dessa ferramenta, o DNA
464 barcode (*DNA barcoding*). Conhecido também como código de barras da vida, essa ferramenta visa
465 identificar espécies usando um pequeno fragmento de DNA, um marcador “padrão” de uma região
466 do DNA mitocondrial ou nuclear que deve apresentar uma alta taxa de polimorfismo que fornece
467 uma identidade genética única para cada táxon de estudo. Através do sequenciamento (Método de
468 Sanger) desse fragmento direcionado é possível observar a distância genética entre os indivíduos e
469 assim distinguir em nível de famílias, gêneros ou espécie. Inicialmente foi proposto o uso do gene
470 citocromo oxidase subunidade I (COI), para separação de espécies em animais (Hebert *et al.* 2003a,
471 2003b). Porém com a propagação dessa ferramenta, outros genes passaram a ser utilizados, pois o

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

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

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

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

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

514 Mothur é um projeto criado por Patrick Schloss e colaboradores em 2009, para suprir as
515 necessidades na área de bioinformática que analisa dados de ecologia microbiana, inicialmente
516 voltado principalmente para sequências do gene 16S rRNA, sendo um pacote de software de código
517 aberto e plataforma independente para descrever e comparar a comunidade microbiana (Schloss *et al.*
518 2009). Sendo possível trabalhar com dados brutos como entrada, do demultiplex até as análises de

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

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

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

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

542 dados têm sido alimentados cada vez mais, é o caso por exemplo do UNITE (Abarenkov *et al.*
543 2010), onde as informações das sequencias da região ITS são depositadas.

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

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

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

560
561
562

Literatura Citada

563
564 **Abarenkov, K., R.H. Nilsson, K.H. Larsson, I.J. Alexander, U. Eberhardt, S. Erland, K.**
565 **Høiland, R. Kjølner, E. Larsson, T. Pennanen, R. Sen, A.F.S. Taylor, L. Tedersoo, B.M.**
566 **Ursing, T.Vrålstad, K. Liimatainen, U. Peintner & U. Kõljalg. 2010.** The UNITE database
567 for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. *New Phytologist*.
568 186: 281–285.
569

- 570 **Ahn, J-H., I-P. Hong, J-I. Bok, B-Y. Kim, J. Song & H-Y. Weon. 2012.** Pyrosequencing Analysis
571 of the Bacterial Communities in the Guts of Honey Bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in
572 Korea. *The Journal of Microbiology*. 5: 735–745.
573
- 574 **Alves, R.M.O., C.A.L. Carvalho, B.A. Sousa & W.S. Santos. 2012.** Area of natural occurrence
575 of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) in State of Bahia, Brazil. *Anais*
576 *da Academia Brasileira de Ciências*. 84: 679-688.
577
- 578 **Alves, D.A., V.L. Imperatriz-Fonseca, T.M. Franco, P.S. Santos-Filho, P. Nogueira-Neto, J.**
579 **Billen & T. Wenseleers. 2009a.** The queen is dead—long live the workers: intraspecific
580 parasitism by workers in the stingless bee *Melipona scutellaris*. *Molecular Ecology*. 18: 4102–
581 4111
582
- 583 **Alves, R.M.O., B.A. Souza, C.A.L. Carvalho, L.S. Souza & J.P. Andrade. 2009b.** Substratos
584 vegetais utilizados pela abelha urucu (*Melipona scutellaris*) no litoral norte do Estado da Bahia.
585 *Mensagem Doce*. 83: 44-45.
586
- 587 **Amaral, I.M.R., J.F. Moreira Neto, G.B. Pereira, M.B. Franco, M.E. Beletti, W.E. Kerr, A.M.**
588 **Bonetti & C. Ueira-Vieira. 2010.** Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris*
589 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis. *Micron*. 41:
590 123–129.
591
- 592 **Andrade B.R., A.S. Nascimento, E.L. Franco, D.R. Santos, R.M.O. Alves, M.A.P.C. Costa,**
593 **C.A.L. Carvalho. 2019.** Pollen Spectrum and Trophic Niche Width of *Melipona scutellaris*
594 Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) in Highly Urbanized and Industrialized Sites.
595 *Sociobiology* 66(2): 279-286.
596
- 597 **Andújar, C., P. Arribas, D.W. Yu, A.P. Vogler & B.C. Emerson. 2018.** Why the COI barcode
598 should be the community DNA metabarcode for the metazoa. *Mol Ecol*. 27: 3968– 3975.
599
- 600 **Anjum, S.I., A.H. Shah, M. Aurongzeb, J. Kori, M.K. Azim, M.J. Ansari & L. Bin. 2018.**
601 Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan. *Saudi Journal*
602 *of Biological Sciences*. 25: 388–392
603
- 604 **Anslan, S., M. Bahram, I. Hiiesalu & L. Tedersoo. 2017.** PipeCraft: flexible open-source toolkit
605 for bioinformatics analysis of custom high-throughput amplicon sequencing data. *Molecular*
606 *Ecology Resources*. 17: 234–240.
607
- 608 **Araújo, E.D., M. Costa, J. Chaud-Neto & H.G. Fowler. 2004.** Body size and flight distance in
609 stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): Interference of flight range and possible ecological
610 implications. *Brazilian Journal of Biology*. 64: 563-368.
611
- 612 **Ascher, J.S & J. Pickering. 2019.** Discover life: bee species guide and world checklist
613 (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). [http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=](http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species&flags=HAS)
614 *Apoidea_species&flags= HAS*. Acessado em 7 Janeiro 2019.
615

- 616 **Babendreier, D., D. Joller, J. Romeis, F. Bigler & F. Widmer. 2007.** Bacterial community
617 structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS*
618 *Microbiol Ecol.* 59: 600–610.
619
- 620 **Barbosa, F.M., R.M.O. Alves, B.A. Souza & C.A.L. Carvalho. 2013.** Nest architecture of the
621 stingless bee *Geotrigona subterranea* (Friese,1901) (Hymenoptera: Apidae:
622 Meliponini). *Biota Neotrop.* 13: 147-152.
623
- 624 **Barbosa, W.F., G. Smagghe & R.N.C. Guedes. 2015.** Pesticides and reduced-risk insecticides,
625 native bees and pantropical stingless bees: pitfalls and perspectives. *Pest Manag Sci.* 71: 1049–
626 1053.
627
- 628 **Batista, M.A., M. Ramalho & E.E.A. Soares. 2003.** Nesting sites and abundance of Meliponini
629 (Hymenoptera: Apidae) in heterogeneous habitats of the Atlantic Rain Forest, Bahia, Brazil.
630 *Lundiana.* 4: 19-23.
631
- 632 **Bispo dos Santos, S.A., A.C. Roselino, M. Hrncir & L.R. Bego. 2009.** Pollination of tomatoes by
633 the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera,
634 Apidae). *Genetics and Molecular Research.* 8: 751-757.
635
- 636 **Boff, S., A.C. Araujo & A. Pott. 2013.** Bees (Hymenoptera: Apoidea) and flowers in natural forest
637 patches of southern Pantanal. *Biota Neotropica.* 13: 46-56.
638
- 639 **Bossert, S., E.A. Murray, E.A.B. Almeida, S.G. Brady, B.B. Blaimer & B.N. Danforth. 2019.**
640 Combining transcriptomes and ultraconserved elements to illuminate the phylogeny of Apidae.
641 *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 130: 121–13.
642
- 643 **BPBES/REBIPP. 2019.** Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de
644 Alimentos no Brasil. 1ª edição, São Carlos, SP: Editora Cubo. 184 p.
645
- 646 **Bromenshenk, J.J., C.B. Henderson, C.H. Wick, M.F. Stanford, A.W. Zulich, E.J. Rabih, V.D.**
647 **Samir, P.E. McCubbin, R.A. Seccomb, P.M. Welch, T. Williams, D.R. Firth, E.**
648 **Skowronski, M.M. Lehmann, S.L. Bilimoria, J. Gress, K.W. Wanner & R.A. Cramer Jr.**
649 **2010.** Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. *PLoS ONE.* 5:
650 13181.
651
- 652 **Brosi, B.J., G.C. Daily, T.M. Shih, F. Oviedo & G. Durán. 2008.** The effects of forest
653 fragmentation on bee communities in tropical countryside. *Journal of Applied Ecology.* 45:
654 773–783.
655
- 656 **Brothers, D.J. 1999.** Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera,
657 Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zoologica Scripta.* 28: 233-249.
658
- 659 **Brown, M.J.F. & R.J. Paxton. 2009.** The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie.*
660 40, 410–416.
661

- 662 **Bruening, H. 2001.** Abelha Jandaíra– 2ªEdição – Fundação Guimarães Duque. Fundação Vingt-
663 Un Rosado coleção mossoroense Série “C” – Volume 1189.
664
- 665 **Bruno, A., A. Sandionigi, G. Agostinetto, L. Bernabovi, J. Frigerio, M. Casiraghi & M. Labra.**
666 **2019.** Food Tracking Perspective: DNA Metabarcoding to Identify Plant Composition in
667 Complex and Processed Food Products. *Genes*. 10: 248.
668
- 669 **Brysch-Herzberg, M., & M.A. Lachance. 2004.** *Candida bombiphila* sp. nov., a new asexual yeast
670 species in the Wickerhamiella clade. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1857–1859.
671
- 672 **Buchmann S.L. & J.H. Cane. 1989.** Bees Assess Pollen Returns while Sonicating Solanum
673 Flowers Source: *Oecologia*. 81: 289-294.
674
- 675 **Burgar, J.M., D.C. Murray, M.D. Craig, J. Haile, J. Houston, V. Stokes & M. Bunce. 2014.**
676 Who’s for dinner? High-throughput sequencing reveals bat dietary differentiation in a
677 biodiversity hotspot where prey taxonomy is largely undescribed. *Molecular Ecology*. 23:
678 3605–3617.
679
- 680 **Bush, A., Z.G. Compson, W.A. Monk, T.M. Porter, R. Steeves, E. Emilson, N. Gagne, M.**
681 **Hajibabaei, M. Roy & D.J. Baird. 2019.** Studying Ecosystems With DNA Metabarcoding:
682 Lessons From Biomonitoring of Aquatic Macroinvertebrates. *Front. Ecol. Evol.* 7:434.
683
- 684 **Camargo, J.M.F. 1970.** Ninhos e biología de algumas espécies de Meliponideos (Hymenoptera:
685 Apidae) da região de Porto Velho, Território de Rondônia, Brasil, *Rev. Biol. Trop.* 16: 207-
686 239.
687
- 688 **Camargo, J.M.F. & S.R.M. Pedro. 1992.** Systematics, phylogeny and biogeography of the
689 Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie*. 23: 509-522.
690
- 691 **Camargo, J.M.F & S.R.M. Pedro. 2003.** Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz,
692 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) - bionomia e biogeografia. *Revista Brasileira de*
693 *Entomologia*. 47: 311-372.
694
- 695 **Camargo, J.M.F. & S.R.M. Pedro. 2013.** Meliponini Lepeletier, 1836. Em Moure, JS, Urban, D.
696 e Melo, GAR (Orgs). *Catálogo de Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) na Região Neotropical -*
697 *versão online.* Disponível em <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em 24 / abr /
698 2020
699
- 700 **Caporaso, J.G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F.D. Bushman, E.K. Costello, N.**
701 **Fierer, A.G. Peña, J.K. Goodrich & J.I. Gordon. 2010.** QIIME allows analysis of high-
702 throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 7: 335–336.
703
- 704 **Cariveau, D.P., J. Elijah Powell, H. Koch, R. Winfree & N.A. Moran. 2014.** Variation in gut
705 microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees
706 (*Bombus*). *The ISME Journal*. 8: 2369–2379.
707

- 708 **Carvalho, C.A.L., B.A. Souza, C.S. Dias, R.M.O. Alves, A.F. Lima Melo, A.C.F. Soares, G.A.**
709 **Carvalho-Zilse. 2010.** Five egg-laying queens in a single colony of brazilian stingless bees
710 (*Melipona scutellaris* Latreille). Acta Amazonica. 41: 123 – 126.
711
- 712 **Carvalho, C.A.L., A.C.C.C. Moreti, L.C. Marchini, R.M.O. Alves & P.C.F. Oliveira. 2001.**
713 Pollen spectrum of honey of “Uruçu” bee (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811). Rev. Brasil.
714 Biol. 61: 63-67.
715
- 716 **Carvalho, C.A.L., W.S. Santos, L.A. Nunes, B.A. Souza, G.A. Carvalho-Zilse & Rogério**
717 **Marcos de Oliveira Alves. 2011.** Offspring Analysis in a Polygyne Colony of *Melipona*
718 *scutellaris* (Hymenoptera: Apidae) by Means of Morphometric Analyses. Sociobiology 57:
719 347-354.
720
- 721 **Carvalho de Melo, F.H., F.N.D.D. Menezes, J.M. Batista de Sousa, M.S. Lima, G.S.C. Borges,**
722 **E.L. Souza & M. Magnani. 2020.** Prebiotic activity of monofloral honeys produced by
723 stingless bees in the semi-arid region of Brazilian Northeastern toward *Lactobacillus*
724 *acidophilus* LA-05 and *Bifidobacterium lactis* BB-12. Food Res Int. 128: 108809.
725
- 726 **Cole, J.R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R.J. Farris, A.S. Kulam-Syed-Mohideen,**
727 **D.M. McGarrell, T. Marsh, G.M. Garrity & J.M. Tiedje. 2009.** The Ribosomal Database
728 Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Res. 37: 141–
729 145.
730
- 731 **Cortopassi-Laurino, M., V.L. Imperatriz-Fonseca, D.W. Roubik, A. Dollin, T. Heard & I.**
732 **Ingrid Aguilar. 2006.** Global meliponiculture: challenges and opportunities. Apidologie. 37:
733 275–292.
734
- 735 **Cortopassi-Laurino, M., D.A. Alvez & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2009.** Árvores neotropicais,
736 recursos importantes para a nidificação de abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponini). Mensagem
737 Doce n° 100. Março de 2009. Available
738 in <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/100/artigo9.htm>. Assessed in 12 de janeiro de
739 2020.
740
- 741 **Costa, M.A.D.L., G.A.R. Melo & W.S. Sheppard. 2003.** Molecular phylogeny of the stingless
742 bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences.
743 Apidologie. 34: 73–84.
744
- 745 **Cox-Foster, D.L., S. Conlan, E.C. Holmes, G. Palacios, J.D. Evans, N.A. Moran, P. Quan, T.**
746 **Briese, M. Hornig, D.M. Geiser, V. Martinson, D. Vanengelsdorp, A.L. Kalkstein, A.**
747 **Drysdale, J. Hui, J. Zhai, L. Cui, S.K. Hutchison, J.F. Simons, M. Egholm, J.S. Pettis &**
748 **W.I. Lipkin. 2007.** A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder.
749 Science. 318: 283-287.
750
- 751 **da Cunha, M.G., M. Franchin, L.C.C. Galvão, A.L.T.G. Ruiz, J.E. Carvalho, M. Ikegaki, S.M.**
752 **Alencar, H. Koo & P.L. Rosalen. 2013.** Antimicrobial and antiproliferative activities of
753 stingless bee *Melipona scutellaris* geoprópolis. BMC Complement Altern. Med. 13: 1-9.
754

- 755 **da Cunha, M.G., P.L. Rosalen, M. Franchin, S.M. Alencar, M. Ikegaki, T. Ransom & J.A.**
756 **Beutler. 2016.** Antiproliferative Constituents of Geopropolis from the Bee *Melipona*
757 *scutellaris*. *Planta Med.* 82: 190–194.
758
- 759 **da Silva, G., T. da Natividade, C. Camara, E. da Silva, F. dos Santos & T. Silva. 2014.**
760 identification of sugar, amino acids and minerals from the pollen of Jandaíra Stingless Bees
761 (*Melipona subnitida*). *Food and Nutrition Sci.* 5: 1015-1021.
762
- 763 **da Silva, I.A.A., T.M.S. da Silva, C.A. Camara, N. Queiroz, M. Magnane & J.S. de**
764 **Novais. 2013.** Perfil fenólico, atividade antioxidante e análise palinológica de mel de abelhas
765 sem ferrão do Amazonas, Norte do Brasil. *Food Chem.* 141: 3552–3558.
766
- 767 **de Carvalho, R.M.A., C.F. Martins & J.S. Mourão. 2014** Meliponiculture in Quilombola
768 communities of Ipiranga and Gurugi, Paraíba state, Brazil: na ethnoecological approach. *J.*
769 *Ethnobiol. Ethnomed.* 10: 1-12.
770
- 771 **DeSantis, T.Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E.L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D.**
772 **Dalevi, P. Hu & G.L. Andersen. 2006.** Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene
773 database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5069–5072.
774
- 775 **Dharampal, P.S., L. Diaz-Garcia, M.A.B. Haase, J. Zalapa, C.R. Currie, C.T. Hittinger &**
776 **S.A. Steffan. 2020.** Microbial Diversity Associated with the Pollen Stores of Captive-Bred
777 Bumble Bee Colonies. *Insects.* 11: 250.
778
- 779 **Díaz, S., S.S. Urbano, L. Caesar, B. Blochtein, A. Sattler, V. Zuge & K.L. Haag. 2017.** Report
780 on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. *J. Invert. Pathol.*
781 143: 35–39.
782
- 783 **Disayathanoowat, T., H. Li, N. Supapimon, N. Suwannarach, S. Lumyong, P.**
784 **Chantawannakul & J. Guo. 2020.** Different Dynamics of Bacterial and Fungal Communities
785 in Hive-Stored Bee Bread and Their Possible Roles: A Case Study from Two Commercial
786 Honey Bees in China. *Microorganisms.* 8: 264.
787
- 788 **Duarte, A.W.F., M.R.S. Vasconcelos, A.P.D. Menezes, S.C. Silva, M. Oda-souza & A.M.Q.**
789 **López. 2012.** Composition and antioxidant activity of honey from Africanized and stingless
790 bees in Alagoas (Brazil): a multivariate analysis, *J Apicul Res.* 51: 23-35.
791
- 792 **Engel, P., V.G. Martinson & N.A. Moran. 2012.** Functional diversity within the simple gut
793 microbiota of the honey bee. *PNAS.* 109: 11002–11007.
794
- 795 **Evangelista-Rodrigues, A., E.M.S. Silva, E.M.F. Beserra & M.L. Rodrigues. 2005.** Análise
796 físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em
797 regiões distintas no Estado da Paraíba. *Ciência Rural.* 35: 1166-1171.
798
- 799 **Farrell, B.D., A.S. Sequeira, B.C. O'Meara, B.B. Normark, J.H. Chung & B.H. Jordal. 2001.**
800 The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae).
801 *Evolution.* 55: 2011-2027.

802
803 **Feás, X., M.P. Vázquez-Tato, L. Estevinho, J.A. Seijas & A. Iglesias. 2012.** "Organic bee pollen:
804 botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and
805 microbiological quality". *Molecules*. 17: 8359-8377.
806

807 **Federhen, S. 2012.** The NCBI taxonomy database. *Nucleic Acids Res.* 40:136–143.
808

809 **Ferraz, R.E., P.M. Lima, D.S. Pereira, C.C.O. Freitas & F.M.C. Feijó. 2008.** Microbiota
810 Fúngica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae. *Neotropical Entomology*.
811 37:345-346
812

813 **Ferreira, B.L., L.V. Gonzaga, L. Vitali, G.A. Micke, H.F. Maltez, C. Ressureição, A. C.O.**
814 **Costa, R. Fett. 2019.** Southern-Brazilian geopropolis: A potential source of polyphenolic
815 compounds and assessment of mineral composition. *Food Res. Int.* 126: 1-13.
816

817 **Fidalgo, A.O. & A.M.P. Kleinert. 2009.** Reproductive biology of six Brazilian Myrtaceae: is there
818 a syndrome associated with buzz-pollination?. *New Zealand Journal of Botany*. 47: 355-365.
819

820 **Forsgren, E., T.C. Olofsson, A. Vásquez & I. Fries. 2010.** Novel lactic acid bacteria
821 inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*. 41: 99–108.
822

823 **Franchin, M., M.G. Cunha, C. Denny, M.H. Napimoga, T.M. Cunha, B. Bueno-Silva, S.M.**
824 **Alencar, M. Ikegaki & P.L. Rosalen. 2013.** Bioactive Fraction of Geopropolis from *Melipona*
825 *scutellaris* Decreases Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Involvement of
826 Nitric Oxide Pathway. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2013: 1-9
827

828 **Garibaldi, L.A., I. Steffan-Dewenter, R. Winfree, M.A. Aizen, R. Bommarco, S.A.**
829 **Cunningham, I. Bartomeus, F. Benjamin, V. Boreux, D. Cariveau, N.P. Chacoff, J.H.**
830 **Dudenhöffer, B.M. Freitas, J. Ghazoul, S. Greenleaf, J.H. Sousa, A. Holzschuh, B.**
831 **Howlett, R. Isaacs, S.K. Javorek, C.M. Kennedy, K.M. Krewenka, S. Krishnan, Y.**
832 **Mandelik, M.M. Mayfield, I. Motzke, T. Munyuli, B.A. Nault, M. Otieno, J. Petersen, G.**
833 **Pisanty, S.G. Potts, R. Rader, T.H. Ricketts, M. Rundlöf, C.L. Seymour, C. Schüepp, H.**
834 **Szentgyörgyi, H. Taki, T. Tscharrntke, C.H. Vergara, B.F. Viana, T.C. Wanger, C.**
835 **Westphal, N. Williams & A.M. Klein. 2013.** Wild pollinators enhance fruit set of crops
836 regardless of honey bee abundance. *Science*. 339: 1608- 1611.
837

838 **Garibaldi, L., Luísa G. Carvalheiro, Bernard E. Vaissière, Barbara Gemmill-Herren, Juliana**
839 **Hipólito, Breno M. Freitas, Hien T. Ngo, Nadine Azzu, Agustín Sáez, Jens Åström,**
840 **Jiandong An, Betina Blochtein, Damayanti Buchori, Fermín J. Chamorro García,**
841 **Fabiana Oliveira da Silva, Kedar Devkota, Márcia de Fátima Ribeiro, Leandro Freitas,**
842 **Maria C. Gaglianone, Maria Goss, Mohammad Irshad, Muo Kasina, Alípio J.S. Pacheco**
843 **Filho, Lucia H. Piedade Kiill, Peter Kwapong, Guiomar Nates Parra, Carmen Pires,**
844 **Viviane Pires, Ranbeer S. Rawal, Akhmad Rizali, Antonio M. Saraiva, Ruan Veldtman,**
845 **Blandina F. Viana, Sidia Witter, Hong Zhang. 2016.** Mutually beneficial pollinator diversity
846 and crop yield outcomes in small and large farms. *Science*, 351, pp. 388-391
847

848 **GBIF 2019.** Hymenoptera in GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist
849 dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org. Acessado em 21 de julho de
850 2020.
851

852 **GBIF 2020.** Hymenoptera in GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy
853 https://www.gbif.org/pt/occurrence/map?has_coordinate=false&taxon_key=4334 Acessado
854 em 21 de julho de 2020.
855

856 **Gilliam, M., S.L. Buchmann, B.J. Lorenz & R.J. Schmalzel. 1990.** Bacteria belonging to the
857 genus *Bacillus* associated with three species of solitary bees. *Apidologie*. 21: 99–105.
858

859 **Giannini, T.C., G.D. Cordeiro, B.M. Freitas, A.M. Saraiva & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2015.**
860 The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. *J.*
861 *Econ. Entomol.* 108: 849-857.
862

863 **Giannini, T.C., Camila Maia-Silva, Andre L. Acosta, Rodolfo Jaffé, Airton T. Carvalho, Celso**
864 **F. Martins, Fernando C. V. Zanella, Carlos A. L. Carvalho, Michael Hrnir, Antonio M.**
865 **Saraiva, José Oswaldo Siqueira, Vera L. Imperatriz-Fonseca. 2017.** Protecting a managed
866 bee pollinator against climate change: strategies for an area with extreme climatic conditions
867 and socioeconomic vulnerability. *Apidologie* 48:784–794.
868

869 **Giongo, A., D.B. Crabb, A.G. Davis-Richardson, D. Chauliac, J.M. Mobberley, K.A. Gano,**
870 **N. Mukherjee, G. Casella, L.F. Roesch, B. Walts, A. Riva, G. King & E.W. Triplett. 2010.**
871 PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. *ISME*. 4: 852–861.
872

873 **Graystock, P., S.M. Rehan & Q.S. McFrederick. 2017.** Hunting for healthy microbiomes:
874 Determining the core microbiomes of *Ceratina*, *Megalopta*, and *Apis* bees and how they
875 associate with microbes in bee collected pollen. *Conserv. Genet.* 18: 701–711.
876

877 **Gurung, K., B. Wertheim & J.F. Salles. 2019.** The microbiome of pest insects: it is not just
878 bacteria. *Entomol. Exp. Appl.* 167: 156–170.
879

880 **Gweon, H.S., A. Oliver, J. Taylor, T. Booth, M. Gibbs, D.S. Read, R.I. Griffiths & K.**
881 **Schonrogge. 2015.** PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed
882 spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods Ecol. Evol.* 6: 973–980.
883

884 **Hamad, I., R. Abou Abdallah, I. Ravaux, S. Mokhtari, H. Tissot-Dupont, C. Michelle, A.**
885 **Stein, J.C. Lagier, D. Raoult & F. Bittar. 2018.** Metabarcoding analysis of eukaryotic
886 microbiota in the gut of HIV-infected patients. *PLoS ONE* 13: e0191913.
887

888 **Harrison, J.G., D.M. Urruty & M.L. Forister. 2016.** An exploration of the fungal assemblage in
889 each life history stage of the butterfly, *Lycaeides melissa* (Lycaenidae), as well as its host plant
890 *Astragalus canadensis* (Fabaceae). *Fungal Ecol.* 22: 10-16.
891

892 **Hartfelder, K., G.R. Makert, C.C. Judice, G.A.G. Pereira, W.C. Santana, R. Dallacqua,**
893 **M.M.G. Bitondi. 2006.** Physiological and genetic mechanisms underlying caste development,
894 reproduction and Division of labor in stingless bees. *Apidologie*. 37: 144-163.

895
896 **Hartman, A.L., S. Riddle, T. McPhillips, B. Ludäscher & J.A. Eisen. 2010.** Introducing
897 W.A.T.E.R.S.: a workflow for the alignment, taxonomy, and ecology of ribosomal
898 sequences. *BMC bioinform.* 11: 317.
899

900 **Heard, T.A. 1999.** The role of stingless bees in crop pollination. *Annu. Rev. Entomol.* 44:183–206.
901

902 **Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. deWaard. 2003a.** Biological identifications
903 through DNA barcodes *Proc. R. Soc. Lond. B* 270, 313–321
904

905 **Hebert, P.D.N., S. Ratnasingham & J.R. deWaard 2003b.** Barcoding animal life: cytochrome c
906 oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)*.
907 270: 96–99.
908

909 **Higes, M., R. Martín-Hernández, C. Botías, E.G. Bailón, A.V. González-Porto, L. Barrios, M.**
910 **Jesús del Nozal, J.L. Bernal, J.J. Jiménez, P.G. Palencia & A. Meana. 2008.** How natural
911 infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10: 2659–
912 2669.
913

914 **Hildebrand, F., R.Y. Tadeo, A.Y. Voigt, P. Bork & J. Raes. 2014.** LotuS2: an efficient and user-
915 friendly OTU processing pipeline. *Microbiome.* 2: 30.
916

917 **Hrncir, M., D.L.P. Schorkopf, V.M. Schmidt, R. Zucchi, F.G. Barth. 2008.** The sound field
918 generated by tethered stingless bees (*Melipona scutellaris*): inferences on its potential as a
919 recruitment mechanism inside the hive. *J Expl Biol.* 211: 686–698.
920

921 **ICMBio. 2013.** Instrução Normativa ICMBio nº 34 de 17 de outubro de 2013. Dispõe sobre as
922 diretrizes e procedimentos para a avaliação do estado de conservação das espécies da fauna
923 brasileira. Disponível em
924 [https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-](https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-do-risco/apostila_aplicacao_criterios_categorias_UICN_versao_2.0.pdf)
925 [do-risco/apostila_aplicacao_criterios_categorias_UICN_versao_2.0.pdf](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
926 Maio de 2020.
927

928 **ICMBio/MMA. 2018.** Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VII –
929 Invertebrados -- 1. ed. -- Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018. 7 v. : il.
930

931 **Imperatriz-Fonseca, V.L. & D.A. Alves. 2020.** Abelhas sem ferrão do Pará: a partir das
932 expedições científicas de João M. F. Camargo. Belém, PA: ITV, 280p
933

934 **Imperatriz-Fonseca, V.L., I. Alves-Dos-Santos, P.S. Santos-Filho, W. Engels, M. Ramalho, W.**
935 **Wilms, J.B.V. Aguilar, C.A. Pinheiro-Machado, D.A. Alves & A.M.P. Kleinert. 2011.**
936 Checklist of bees and honey plants from São Paulo State, Brazil. *Biota Neotrop.* 11: 631–655.
937

938 **Imperatriz-Fonseca, V.L., D. Koedam & M. Hrncir, 2017.** Abelha jandaíra: no passado,
939 presente e no futuro. Mossoró, EdUFERSA 254p.
940

- 941 **Imperatriz-Fonseca, V.L. & P. Nunes-Silva. 2010.** As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o
942 código florestal brasileiro. *Biota Neotrop.* 10: 59-62.
943
- 944 **Inoue, M.N., J. Yokoyama & I. Washitani. 2008.** Displacement of Japanese native bumblebees
945 by the recently introduced *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *J Insect Conserv.*
946 12:135–146.
947
- 948 **IPBES 2016.** The assessment report of the intergovernmental science-policy platform on
949 biodiversity and ecosystem services on pollinators, pollination and food production. S.G. Potts,
950 V. L. Imperatriz-Fonseca & H. T. Ngo (eds). Secretariat of the Intergovernmental Science-
951 Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany. 552 p.
952
- 953 **Jacob, C.R.O., H.M. Soares, R.C.F. Nocelli & O. Malaspinaa. 2015.** Impact of fipronil on the
954 mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. *Pest Manag Sci.* 71: 114–122.
955
- 956 **Jaffé, R., U.M. Maia, A. Torres Carvalho & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2013.** Diagnóstico da
957 Meliponicultura no Brasil. *Mensagem Doce* 120: 7-9.
958
- 959 **Jaffé, R., N. Pope, A. Torres Carvalho, U.M. Maia, B. Blochtein, C.A.L. de Carvalho, G.A.**
960 **Carvalho-Zilse, B.M. Freitas, C. Menezes, M.F. Ribeiro, G.C. Venturieri & V.L.**
961 **Imperatriz-Fonseca. 2015.** Bees for Development: Brazilian Survey Reveals How to
962 Optimize Stingless Beekeeping. *PLoS ONE* 10: e0121157.
963
- 964 **Jensen, A.B., K. Aronstein, J.M. Flores, S. Vojvodic, M.A. Palacio & M. Spivak. 2013.**
965 Standard methods for fungal brood disease research. *J Apicul Res*, 52: 1-20.
966
- 967 **Jeyaprakash, A., M.A. Hoy & M.H. Allsopp. 2003.** Bacterial diversity in worker adults of *Apis*
968 *mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S
969 rRNA sequences. *J. Invert. Pathol.* 84: 96–103
970
- 971 **Ji, Y., L. Ashton, S.M. Pedley, D.P. Edwards, Y. Tang, A. Nakamura, R. Kitching, P.M.**
972 **Dolman, P. Woodcock, F.A. Edwards, T.H. Larsen, W.W. Hsu, S. Benedick, K.C. Hamer,**
973 **D.S. Wilcove, C. Bruce, X. Wang, T. Levi, M. Lott, B.C. Emerson & D.W. Yu. 2013.**
974 Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology*
975 *Letters.* 16: 1245–1257.
976
- 977 **Kaltenpoth, M. & S. Steiger. 2014.** Unearthing carrion beetles' microbiome: characterization of
978 bacterial and fungal hindgut communities across the Silphidae. *Mol Ecol.* 23: 1251–1267.
979
- 980 **Kellner, K.H., H.D. Fernandez-Marin, R. Ishak, T. Sen, A. Linksvayer & U.G. Mueller. 2013.**
981 Co-evolutionary patterns and diversification of ant–fungus associations in the asexual fungus-
982 farming ant *Mycocepurus smithii* in Panama. *J. Evol. Biol.* 26: 1353–1362
983
- 984 **Kerr, W.E. 1948.** Estudos sobre o gênero *Melipona*. *An. Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz*, 5: 181-
985 276.
986

- 987 **Kerr, W.E., G.A. Carvalho & V.A. Nascimento. 1996.** A Uruçu: Biologia, Manejo e
988 Conservação. Belo Horizonte, Fundação Acangaú, 144 p.
989
- 990 **Killer, J., S. Dubná, I. Sedláček & P. Švec. 2014.** *Lactobacillus Apis* sp. nov., from the stomach
991 of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of
992 American and European foulbrood. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 152–157.
993
- 994 **Klein, A.M., V. Boreux, F. Fornoff, A-C. Mupepele & G. Pufal. 2018.** Relevance of wild and
995 managed bees for human well-being. Curr Opin Insect Sci. 26: 82–88
996
- 997 **Klein, A.M., B.M. Freitas, I.G.A. Bomfim, V. Boreux, F. Fornoff & M.O. Oliveira. 2020.** A
998 Polinização Agrícola por Insetos no Brasil - Um Guia para Fazendeiros, Agricultores,
999 Extensionistas, Políticos e Conservacionistas. Albert-Ludwigs University Freiburg, Nature
1000 Conservation and Landscape Ecology. 149p.
1001
- 1002 **Klein, A.M., B.E. Vaissière, J.H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunningham, C. Kremen &**
1003 **T. Tscharntke. 2007.** Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc.
1004 R. Soc. B. 274: 303–313
1005
- 1006 **Kleijn, D., R. Winfree, I. Bartomeus, L.G. Carvalheiro, M. Henry, R. Isaacs, A.M. Klein, C.**
1007 **Kremen, L.K. M’Gonigle, R. Rader, T.H. Ricketts, N.M. Williams, N. Lee Adamson, J.S.**
1008 **Ascher, A. Báldi, P. Batáry, F. Benjamin, J.C. Biesmeijer, E.J. Blitzer, R. Bommarco,**
1009 **M.R. Brand, V. Bretagnolle, L. Button, D.P. Cariveau, R. Chifflet, J.F. Colville, B.N.**
1010 **Danforth, E. Elle, M.P. Garratt, F. Herzog, A. Holzschuh, B. G. Howlett, F. Jauker, S.**
1011 **Jha, E. Knop, K.M. Krewenka, V. Le Féon, Y. Mandelik, E.A. May, M.G. Park, G.**
1012 **Pisanty, M. Reemer, V. Riedinger, O. Rollin, M. Rundlöf, H.S. Sardiñas, J. Scheper, A.R.**
1013 **Sciligo, H.G. Smith, I. Steffan-Dewenter, R. Thorp, T. Tscharntke, J. Verhulst, B.F.**
1014 **Viana, B.E. Vaissière, R. Veldtm, C. Westphal & S.G.Potts. 2015.** Delivery of crop
1015 pollination services is an insufficient argument for wild pollinator conservation. Nat.
1016 Commun. 6: 7414.
1017
- 1018 **Koch, H., D.P. Abrol, J. Li & P. Schmid-Hempel. 2013.** Diversity and evolutionary patterns of
1019 bacterial gut associates of corbiculate bees. Mol. Ecol. 22: 2028–2044.
1020
- 1021 **Koch, H., G. Cisarovsky & P. Schmid-Hempel. 2012.** Ecological effects on gut bacterial
1022 communities in wild bumblebee colonies. J. of Animal Ecol. 81: 1202–1210.
1023
- 1024 **Koch, H. & P. Schmid-Hempel. 2011a.** Bacterial Communities in Central European Bumblebees:
1025 Low Diversity and High Specificity. Microb Ecol. 62:121–133.
1026
- 1027 **Koch, H. & P. Schmid-Hempel. 2011b.** Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees
1028 against an intestinal parasite. PNAS 108: 19288–19292.
1029
- 1030 **Koedam, D. 2017.** Ninhos e Biologia geral: comparando as abelhas africanizadas e as abelhas sem
1031 ferrão, p. 29-40. In Imperatriz Fonseca, V.L, D. Koedam & M. Hrncir (eds.), A abelhas
1032 jandaíra: no passado, presente e no futuro. Mossoró, EdUFERSA, 254p.
1033

- 1034 **Kwong, W.K., L.A. Medina, H. Koch, K-W. Sing, E.J.Y. Soh, J.S. Ascher, R. Jaffé & N.A.**
 1035 **Moran. 2017.** Dynamic microbiome evolution in social bees. *Sci. Adv.* 3: e1600513
 1036
- 1037 **Kwong, W.K. & N.A. Moran. 2016.** Gut Microbial Communities of Social Bees. *Nat Rev*
 1038 *Microbiol.* 14: 374–384.
 1039
- 1040 **Lavinas, F.C., E.H.B.C. Macedo, G.B.L. Sá, A.C.F. Amaral, J.R.A. Silva, M.M.B. Azevedo,**
 1041 **B.A. Vieira, T.F.S. Domingos, A.B. Vermelho, C.S. Carneiro & I.A. Rodrigues. 2019.**
 1042 Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active
 1043 compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 29: 389–399.
 1044
- 1045 **Lebonah, D.E., A. Dileep, K. Chandrasekhar, S. Sreevani, B. Sreedevi & J. Pramoda Kumar.**
 1046 **2014.** DNA barcoding on bacteria: A review. *Adv. Biol.* 2014: 1-9.
 1047
- 1048 **Leonhardt, S.D. & M. Kaltenpoth. 2014.** Microbial Communities of Three Sympatric Australian
 1049 Stingless Bee Species. *PLoS ONE* 9: e105718.
 1050
- 1051 **Lima, F.V.O. & R. Silvestre. 2017.** Abelhas (Hymenoptera, Apidae sensu lato) do Estado de Mato
 1052 Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, 107(Suppl.), e2017123.
 1053
- 1054 **Lourenço, C.T., S.M. Carvalho, O. Malaspina & R.C.F. Nocelli. 2012.** Determination of fipronil
 1055 LD₅₀ for the brazilian bee *Melipona scutellaris*. 11th International Symposium of the ICP-BR
 1056 Bee Protection Group, Wageningen (The Netherlands), Julius-Kuhn-Archiv, 437
 1057
- 1058 **Ludvigsen, J., Å. Andersen, L. Hjeljord & K. Rudi. 2021.** The Honeybee Gut Mycobiota Cluster
 1059 by Season versus the Microbiota which Cluster by Gut Segment. *Vet. Sci.* 8: 1-4.
 1060
- 1061 **Luna-Lucena D., F. Rabico & Z.L.P. Simoes. 2019.** Reproductive capacity and castes in eusocial
 1062 stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Curr Opin Insect Sci*, 31:20–28.
 1063
- 1064 **Maia, U.M., R. Jaffe, A. Torres Carvalho & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2015.** Meliponicultura
 1065 no Rio Grande do Norte. *Rev. Bras. Med. Vet.* 37: 327-333.
 1066
- 1067 **Maia-Silva, C., M. Hrcir, C.I. Silva & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2015.** Survival strategies of
 1068 stingless bees (*Melipona subnitida*) in an unpredictable environment, the Brazilian tropical dry
 1069 forest. *Apidologie.* 46: 631-643.
 1070
- 1071 **Malacrinò, A., L. Schena, O. Campolo, F. Laudani, S. Mosca, G. Giunti, C.P. Strano & V.**
 1072 **Palmeri. 2017.** A Metabarcoding Survey on the Fungal Microbiota Associated to the Olive
 1073 Fruit Fly. *Microb Ecol.* 73:677–684.
 1074
- 1075 **Martinson, V.G., B.N. Danforth, R.L. Minckley, O. Rueppell, S. Tingek & N.A. Moran. 2011.**
 1076 A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol Ecol.*,
 1077 20: 619–628.
 1078
- 1079 **Matos, V.R. & F.A.R. Santos. 2017.** Pollen in honey of *Melipona scutellaris* L. (Hymenoptera:
 1080 Apidae) in an Atlantic rainforest area in Bahia, Brazil. *Palynology.* 41: 144-156.

1081
1082 **Matos, I.T.S.R., M.T. Nunes, D.A. Mota, M.M.M. Laureano & M.A. Hoshiba. 2011.** Qualidade
1083 microbiológica do mel de *Melipona sp.* produzido na amazônia central (Parintins – AM –
1084 Brasil). Revista Verde. 6: 91–95.
1085
1086 **McMurdie, P.J. & S. Holmes. 2013.** Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis
1087 and graphics of microbiome census data. PLoS ONE 8: e61217
1088
1089 **Menegatti, C., W.G.P. Melo, D.B. Carrão, A.R. Moraes De Oliveira, F. Santos Do Nascimento,**
1090 **N.P. Lopes & M.T. Pupo. 2018.** *Paenibacillus polymyxa* associated with the stingless bee
1091 *Melipona scutellaris* produces antimicrobial compounds against entomopathogens. J Chem
1092 Ecol. 44:1158–1169.
1093
1094 **Menezes, C., A. Vollet-Neto, A.J. Marsaioli, D. Zampieri, I.C. Fontoura, A.D. Luchessi & V.L.**
1095 **Imperatriz-Fonseca. 2015.** A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. Curr. Biol.
1096 25: 2851–2855.
1097
1098 **Meyer, C.P. & G. Paulay. 2005.** DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling.
1099 PLoS Biol. 3: e422
1100
1101 **Michener, C.D. 1969.** Comparative social behavior of bees. Annu. Rev. Entomol. 14: 299–342.
1102
1103 **Michener, C.D. 1974.** The Social Behavior of the Bees. Cambridge, Harvard University Press, 404p.
1104
1105 **Michener, C.D. 2000.** “The Bees of the World.” Baltimore, The John Hopkins University Press,
1106 913p.
1107
1108 **Mohammad, S.M., N.K. Mahmud-Ab-Rashid & N. Zawawi. 2021.** Stingless bee-collected
1109 pollen (Bee Bread): chemical and microbiology properties and health benefits. Molecules. 26:
1110 957.
1111
1112 **Morales, C.L., M.P. Arbetman, S.A. Cameron & M.A. Aizen. 2013.** Rapid ecological
1113 replacement of a native bumble bee by invasive species. Front Ecol Environ. 11: 529–534.
1114
1115 **Moran, N.A. 2015.** Genomics of the honey bee microbiome. Curr Opin Insect Sci. 10: 22–28.
1116
1117 **Moran, N.A., A.K. Hansen, J.E. Powell & Z.L. Sabree. 2012.** Distinctive gut microbiota of honey
1118 bees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS ONE 7: e36393.
1119
1120 **Morais, C.R., B.A.N. Travençolo, S.M. Carvalho, M.E. Beletti, V.S.V. Santos, C.F. Campos,**
1121 **E.O. Campos Júnior, B.B. Pereira, M.P. Carvalho Naves, A.A.A. Rezende, M.A. Spanó,**
1122 **C. Ueira-Vieira & A.M. Bonetti. 2018.** Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in
1123 Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). Chemosphere. 206:
1124 632-642.
1125

- 1126 **Morandin, L.A., Mark L Winston, Michelle T Franklin and Virginia A Abbott. 2005.** Lethal
1127 and sub-lethal effects of spinosad on bumble bees (*Bombus impatiens* Cresson). *Pest Manag*
1128 *Sci* 61:619–626.
1129
- 1130 **Muli, E., H. Patch, M. Frazier, J. Frazier, B. Torto, T. Baumgarten, J. Kilonzo, J. Ng’ang’a**
1131 **Kimani, F. Mumoki, D. Masiga, J. Tumlinson & C. Grozinger. 2014** Evaluation of the
1132 distribution and impacts of parasites, pathogens, and pesticides on honey bee (*Apis mellifera*)
1133 populations in East Africa. *PLoS ONE*. 9: e94459.
1134
- 1135 **Nascimento, D.L. & F.S. Nascimento. 2012.** Extreme effects of season on the foraging activities
1136 and colony productivity of a stingless bee (*Melipona asilvai* Moure, 1971) in Northeast Brazil.
1137 *Psyche: A J. Entomol.* 2012: 1-6.
1138
- 1139 **Nicolson, S.W. 2011.** Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures
1140 of the two. *Afri. Zoo.* 46: 197-204.
1141
- 1142 **Nieh, J.C. 2004.** Recruitment communication in stingless bees (Hymenoptera, Apidae,
1143 Meliponini). *Apidologie.* 35: 159–182.
1144
- 1145 **Nogueira-Neto, P. 1997.** Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis,
1146 445 p.
1147
- 1148 **Nunes-Silva P., M. Hrcir & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2010.** A polinização por vibração.
1149 *Oecologia Australis.* 14: 140-151.
1150
- 1151 **Nunes-Silva P., M. Hrcir, C.I. da Silva, Y.S. Roldão & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2013.**
1152 Stingless bees, *Melipona fasciculata*, as eficiente pollinators of eggplant (*Solanum melongena*)
1153 in greenhouses. *Apidologie.* 44: 537–546.
1154
- 1155 **Nunes-Silva P., N. Piot, I. Meeus, B. Blochtein & G. Smaghe. 2016.** Absence of Leishmaniinae
1156 and Nosematidae in stingless bees. *Sci Rep.* 6:3254
1157
- 1158 **Oliveira, F.F., B.T.T. Richers, J.R. Silva, R.C. Farias, T.A.L. Matos. 2013.** Guia ilustrado das
1159 abelhas “Sem-Ferrão” das Reservas Amanã e Mamirauá, Amazonas, Brasil (Hymenoptera,
1160 Apidae, Meliponini). Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 267p.
1161
- 1162 **Paludo, C.R., C. Menezes, E.A. Silva-Junior, A. Vollet-Neto, A. Andrade-Dominguez, G.**
1163 **Pishchany, L. Khadempour, F.S. do Nascimento, C.R. Currie, R. Kolter, J. Clardy &**
1164 **M.T. Pupo. 2018.** Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. *Sci Rep.* 8: 1122.
1165
- 1166 **Pavan-Kumar, A., P. Gireesh-Babu & W.S. Lakra. 2015.** DNA Metabarcoding: A new approach
1167 for rapid biodiversity assessment. *J Cell Sci & Mol Biol.* 2: 111.
1168
- 1169 **Pedro, S.R.M. 2014.** The Stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera:Apidae). *Sociobiology.* 61:
1170 348–354.
1171

- 1172 **Pereira, R.A., M.M. Morais, F.S. Nascimento & L.R. Bego. 2009.** Intrinsic colony conditions
 1173 affect the provisioning and oviposition process in the stingless bee *Melipona scutellaris*. Genet.
 1174 Mol. Res. 8: 725-729.
 1175
- 1176 **Piccoli, M.C.A., V.B. Bardella & D.C. Cabral-De-Mello. 2018.** Repetitive DNAs in *Melipona*
 1177 *scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of
 1178 multiple heterochromatin amplification in the genus. Apidologie. 49: 497–504.
 1179
- 1180 **Pioker-Hara, F.C., M.S Drummond & A.M.P. Kleinert. 2014.** The influence of the loss of
 1181 brazilian savanna vegetation on the occurrence of stingless bees nests (Hymenoptera: Apidae:
 1182 Meliponini). Sociobiology. 61: 393-400.
 1183
- 1184 **Piper, A.M., J. Batovska, N.O.I. Cogan, J. Weiss, J.P. Cunningham, B.C. Rodoni & M.J.**
 1185 **Blacket. 2019.** Prospects and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-
 1186 throughput insect surveillance. GigaScience. 8:
 1187
- 1188 **Plischuk, S., R. Martín-Hernández, L. Prieto, M. Lucía, C. Botías, A. Meana, A.H.**
 1189 **Abrahamovich, C. Lange1 & M. Higes. 2009.** South American native bumblebees
 1190 (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (*Microsporidia*), an emerging pathogen
 1191 of honeybees (*Apis mellifera*). Environ. Microbiol. Rep. 1: 131–135.
 1192
- 1193 **Porrini, M.P., L.P. Porrini, P.M. Garrido, C.M. Silva Neto, D.P. Porrini, F. Muller, L.A.**
 1194 **Nuñez, L. Alvarez, P.F. Iriarte & M.J Eguaras. 2017.** *Nosema ceranae* in south american
 1195 native stingless bees and social wasp. Microbiol. Ecol. 74: 761–764.
 1196
- 1197 **Potts, S.G., V.L Imperatriz-Fonseca, H.T. Ngo, M.A. Aizen, J.C. Biesmeijer, T.D. Breeze, L.V.**
 1198 **Dicks, L.A. Garibaldi, R. Hill, J. Settele & A.J. Vanbergen. 2016.** Safeguarding pollinators
 1199 and their values to human well-being. Nature. 540: 220–229.
 1200
- 1201 **Powell, J.E., V.G. Martinson, K. Urban-Mead, N.A. Moran. 2014.** Routes of acquisition of the
 1202 gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. Appl. Environ. Microbiol. 80: 7378 –7387.
 1203
- 1204 **Prado, F.S.R., D.M. dos Santos, T.M. de Almeida Oliveira, J.A.M. Burgarelli, J.B. Castele &**
 1205 **E.M. Vieira. 2020.** Determination and uptake of abamectin and difenoconazole in the stingless
 1206 bee *Melipona scutellaris* Latreille (1811) via oral and topic acute exposure. Environ. Pollut.
 1207 265.
 1208
- 1209 **Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies & F.O.**
 1210 **Glöckner. 2013.** The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing
 1211 and web-based tools. Nucl. Acids Res. 41: 590-596.
 1212
- 1213 **Quezada-Euán, J.J.G., G. Nates-Parra, M.M. Maués, V.L. Imperatriz-Fonseca, D.W. Roubik.**
 1214 **2018.** Economic and cultural values of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) among ethnic
 1215 groups of Tropical America. Sociobiology. 65: 534-557.
 1216
- 1217 **Quezada-Euán, J.J.G., W. May-Itza & J. González-Acereto. 2001.** Meliponiculture in México:
 1218 problems and perspective for development. Bee World. 82:160–167.

1219
1220 **Quiroga-Murcia, D.E., M.J. Zotti, I.Z. Polanía & E.E. Pech-Pech. 2017.** Toxicity evaluation of
1221 two insecticides on *Tetragonisca angustula* and *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera:
1222 Apidae). *Agronomía Colombiana*. 35: 340-349.
1223
1224 **Ramalho, M., M.D.E Silva & C.A.L. Carvalho. 2007.** Dinâmica de uso de fontes de pólen por
1225 *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae): Uma análise comparativa com *Apis*
1226 *mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), no Domínio Tropical Atlântico. *Neotrop Entomol.* 36:
1227 38-45.
1228
1229 **Ramírez, S.R., J.C. Nieh, T.B. Quental, D.W. Roubik, V.L. Imperatriz-Fonseca & N.E. Pierce.**
1230 **2010.** A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae).
1231 *Mol Phylogenet Evol.* 56: 519–525.
1232
1233 **Rasmussen, C. & S.A. Cameron. 2010.** Global stingless bee phylogeny supports ancient
1234 divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol J Linn Soc Lond.* 99: 206–232.
1235
1236 **Ravoet, J., L. De Smet, I. Meeus, G. Smagghe, T. Wenseleers, D.C. de Graaf. 2014.** Widespread
1237 occurrence of honey bee pathogens in solitary bees. *J Invertebr Pathol.* 122: 55–58.
1238
1239 **Rêgo, M.M.C., P.M.C. Albuquerque, R.S. Pinto, M.M. Barbosa & A.G. Silva. 2017.** A abelha
1240 jandaíra no estado do Maranhão, p. 79-85. In: V. L. Imperatriz-Fonseca, D. Koedam & M.
1241 Hrcnir (Eds.), *A abelha jandaíra: no passado, no presente e no futuro*. Mossoró: EdUFERSA,
1242 254p.
1243
1244 **Ribeiro, M.F., T. Wensellers, P.S. Santos Filho, D.A. Alves. 2006.** Miniature queens in stingless
1245 bees: basic facts and evolutionary hypotheses. *Apidologie.* 37: 191–206.
1246
1247 **Romero, S., A. Nastasa, A. Chapman, W.K. Kwong & L.J. Foster. 2019.** The honey bee gut
1248 microbiota: strategies for study and characterization. *Insect Mol. Biol.* 28: 455-472.
1249
1250 **Rosa, C.A., M-A Lachance, J.O.C. Silva, A.C.P. Teixeira, M.M. Marini, Y. Antonini & R.P.**
1251 **Martins. 2003.** Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Res.* 4: 271-
1252 275.
1253
1254 **Roselino, A.C. & M. Hrcnir. 2012.** Repeated unrewarded scent exposure influences the food
1255 choice of stingless bee foragers, *Melipona scutellaris*. *Anim Behav.* 83: 755-762.
1256
1257 **Rosi-Denadai, C.A., P.C.S. Araújo, L.A. Oliveira Campos, L. Cosme Jr. & R.N.C Guedes.**
1258 **2018.** Buzz-pollination in Neotropical bees: genus-dependent frequencies and lack of optimal
1259 frequency for pollen release. *Insect Sci.* 00: 1–10.
1260
1261 **Roubik, D.W. 2006.** Stingless bee nesting biology. *Apidologie.* 37: 124-143.
1262
1263 **Sabree, Z.L., A.K. Hansen, N.A. Moran. 2012.** Independent studies using deep sequencing
1264 resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees. *PLoS*
1265 *ONE.* 7: e41250.

- 1266
1267 **Santos, T.C.A & C. Cruz-Landim. 2002.** Determinação das castas em *Scaptotrigona postica*
1268 (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário. Revta bras. Zool. 19:
1269 703–714.
1270
1271 **Sakagami. S.F., M.J. Montenegro & W.E. Kerr. 1965.** Behavior studies of the stingless bees,
1272 with special reference to the oviposition process. V. *Melipona quadrifasciata anthidioides*
1273 Lepeletier. Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. 15.
1274
1275 **Saraihong, P., Y. Li, K. Saenphet, Z. Chen & P. Chantawannakul. 2015.** Bacterial community
1276 structure in *Apis florea* larvae analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S
1277 rRNA gene sequencing. Insect Sci. 22: 606–618.
1278
1279 **Schloss, P.D., S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A.**
1280 **Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger,**
1281 **D.J. Van Horn & C.F. Weber. 2009.** Introducing mothur: open-source, platform-independent,
1282 community- supported software for describing and comparing microbial communities. Applied
1283 and Environ. Microbiol. 75: 7537–7541.
1284
1285 **Schoch, C.L., K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J.L. Spouge, C.A. Levesque, W. Chen &**
1286 **Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List 2012.** Nuclear
1287 ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker
1288 for *Fungi*. PANAS. 109: 6241–6246.
1289
1290 **Schorkopf, D.L.P., G.F. de Sá Filho, C. Maia-Silva, M. Schorkopf, M. Hrnacir & F.G. Barth.**
1291 **2016.** Nectar profitability, not empty honey stores, stimulate recruitment and foraging in
1292 *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). J Comp Physiol A. 202:709–722.
1293
1294 **Schumann, N.A.B., C.A.M. Cardoso-Junior, E.H. Silva, C. Ueira-Vieira, M.E. Beletti, M.B.**
1295 **Franco, M. Bezerra-Laure, G.R. Araujo, B.A.N. Travençolo & A.M. Bonetti. 2019.** Three-
1296 dimensional reconstruction of corpora allata nucleus reveals insights into epigenetic
1297 mechanisms of caste differentiation in *Melipona scutellaris* stingless bees. Apidologie. 50:330–
1298 339.
1299
1300 **Shanks, J.L., A.M. Haigh, M. Riegler & R.N. Spooner-Hart. 2017.** First confirmed report of a
1301 bacterial brood disease in stingless bees. J Invertebr Pathol. 144: 7–10.
1302
1303 **Shendure, J. & H. Ji. 2008.** Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol. 26: 1135–45.
1304
1305 **Siqueira, E.L., R.B. Martines & F.H. Nogueira-Ferreira. 2007.** Ninhos de abelhas sem ferrão
1306 (hymenoptera, meliponina) em uma região do Rio Araguari, Araguari-MG. Biosci. J. 23: 38-
1307 44.
1308
1309 **Silva de Souza, J.R., M.O. Costa, M.I.L. da Silva & C.G. Nunes da Silva. 2020.** Ocorrência de
1310 fungos associados ao trato digestivo de abelhas sem ferrão *Melipona seminigra merrillae*
1311 Cockerell, 1919. p 114-121. In: Micologia: Fungos e/ou seus Metabólitos como Objeto de
1312 Estudo. Ed. Atena. 253p.

1313
1314 **Silva, M.D.E., M. Ramalho & D. Monteiro. 2013.** Diversity and habitat use by stingless bees
1315 (Apidae) in the Brazilian Atlantic Forest. *Apidologie*. 44:699–707.
1316
1317 **Silva, W.P. & J.R.L. Paz. 2012.** Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância
1318 econômica. *Natureza on line* 10: 146-152.
1319
1320 **Silveira, F.A., G.A.R. Melo & E.A.B. Almeida. 2002.** Abelhas brasileiras: sistemática e
1321 identificação: Belo Horizonte, 253p.
1322
1323 **Six, D.L. 2012.** Ecological and Evolutionary Determinants of Bark Beetle — Fungus Symbioses.
1324 *Insects*. 3: 339-366.
1325
1326 **Slaa, J.E., L.A. Sanchez, M. Sandi & W. Salazar. 2000.** A scientific note on the use of stingless
1327 bees for commercial pollination in enclosures. *Apidologie*. 31: 141-142.
1328
1329 **Souza, E.A., J.R. Trigo, D.E. Santos, C. Ueira-Vieira, J.E. Serrão. 2017.** The relationship
1330 between queen execution and cuticular hydrocarbons in stingless bee *Melipona scutellaris*
1331 (Hymenoptera: Meliponini). *Chemoecology*. 27:25–32.
1332
1333 **Taberlet, P., E. Coissac, F. Pompanon, C. Brochmann & E. Willerslev. 2012.** Towards next-
1334 generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 21: 2045-2050.
1335
1336 **Teixeira, E.W., L.G. Santos, A. Sattler, D. Message, M.L.T.M.F. Alves, M.F. Martins, M.L.**
1337 **Grassi-Sella & T.M. Franco. 2013.** *Ceranae* has been present in Brazil for more than three
1338 decades infecting Africanized honey bees. *J Invertebr Pathol.* 114: 250–254.
1339
1340 **Thomson, D.M. 2006.** Detecting the effects of introduced species: a case study of competition
1341 between *Apis* and *Bombus*. *OIKOS*. 114: 407-418.
1342
1343 **Ursell, L.K., J.L. Metcalf, L.W. Parfrey & R. Knight. 2012.** Defining the Human Microbiome.
1344 *Nutr Rev.* 70: S38–S44.
1345
1346 **Vallejo-Marín, M. 2019.** Buzz pollination: studying bee vibrations on Flowers. *New Phytologist*.
1347 224: 1068–1074.
1348
1349 **van Veen, J.W. & M.J. Sommeijer. 2000.** Colony reproduction in *Tetragonisca angustula*
1350 (Apidae, Meliponini). *Insectes Soc.* 47: 70–75.
1351
1352 **Vásquez, A., E. Forsgren, I. Fries, R.J. Paxton, E. Flaberg, L. Szekely & T.C. Olofsson. 2012.**
1353 Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS*
1354 *ONE*. 7: e33188.
1355
1356 **Villas-Bôas, J. 2012.** Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão. Brasília – DF. Instituto
1357 Sociedade, População e Natureza (ISPN). Brasil, 96p.
1358

- 1359 **Voulgari-Kokota, A., Q.S. McFrederick, I. Steffan-Dewenter & A. Keller. 2019.** Drivers,
1360 diversity, and functions of the solitary-bee microbiota. *Trends Microbiol.* 27: 1034-1044.
1361
- 1362 **Wenseleers, T., D.A. Alves, T.M. Francoy, J. Billen & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2011.**
1363 Intraspecific queen parasitism in a highly eusocial bee. *Biol. Lett.* 7: 173–176.
1364
- 1365 **Wille, A. & C.D. Michener. 1973.** The nest architecture of stingless bees with special reference to
1366 those of Costa Rica (Hymenoptera: Apidae). *Rev. Biol. Trop.*, 21: 1-278.
1367
- 1368 **Wille, A. 1979.** Phylogeny and relationships among the genera and subgenera of stingless bees
1369 (Meliponinae) of the world. *Rev. Biol. Trop.* 27: 241–277.
1370
- 1371 **Wille, A. 1983.** Biology of the stingless bees. *Ann. Rev. Entomol.* 28: 41-64.
1372
- 1373 **Wilson, E.O. & B. Hölldobler. 2005.** Eusociality: Origin and consequences. *Proc. Natl. Acad.*
1374 *Sci.* 102: 13367–13371.
1375
- 1376 **Winfree, R. 2010.** The Conservation And Restoration Of Wild Bees. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1195:
1377 169–197.
1378
- 1379 **Winfree, R., R. Aguilar, D.P. Vázquez, G. Lebuhn, & M.A. Aizen. 2009.** A meta-analysis of
1380 bees responses to anthropogenic disturbance. *Ecology.* 90: 2068–2076.
1381
- 1382 **Witter, S & P. Nunes-Silva. 2014.** Manual de boas práticas para o manejo e conservação de abelhas
1383 nativas (meliponíneos) 1. ed. - Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul,
1384 141p.
1385
- 1386 **Wittwer, B., A. Hefetz, T. Simon, L.E.K. Murphy, M.A. Elgar, N.E. Pierce & S.D. Kocher.**
1387 **2017.** Solitary bees divest in communication. *PNAS.* 114: 6569-6574.
1388
- 1389 **Wu M., Y. Sugimura, K. Iwata, N. Takaya, D. Takamatsu, M. Kobayashi, D. Taylor, K.**
1390 **Kimura & M. Yoshiyama. 2014.** Inhibitory effect of gut bacteria from the Japanese honey
1391 bee, *Apis cerana japonica*, against *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European
1392 foulbrood disease. *J. of Insect Sci.* 14:
1393
- 1394 **Yu, D.W., Y. Ji, B.C. Emerson, X. Wang, C. Ye, C. Yang & Z. Ding. 2012.** Biodiversity soup:
1395 metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods*
1396 *Ecol Evol.* 3: 613-623.
1397
- 1398 **Yun, J.-H., M.-J. Jung, P.S. Kim, J.-W. Bae. 2018.** Social status shapes the bacterial and fungal
1399 gut communities of the honey bee. *Sci. Rep.* 8:
1400
- 1401 **Zanella, F.C.V. & C.F. Martins. 2003.** Abelhas da Caatinga: biogeografia, ecologia e
1402 conservação. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). *Ecologia e*
1403 *conservação da Caatinga.* Recife, UFPE. cap. 2, p. 75-134.
1404

1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430

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, LÍlian 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.

1431 RESUMO - As abelhas meliponinis apresentam diversas espécies encontradas no Brasil. *Melipona*
1432 *scutellaris* pertencente a esse grupo tem grande importância social, econômica e ambiental
1433 principalmente na região Nordeste do país, que é considerada a região original de sua distribuição.
1434 Porém, devido a características relacionadas a seu mel, essa espécie vem ganhando uma outra
1435 realidade de distribuição sendo translocada até o Sul do país. Poucos estudos foram realizados com
1436 *M. scutellaris*, menos ainda quando se trata da microbiota associada. As bactérias exercem diversos
1437 papéis de extrema importância para as abelhas. A identificação dessa microbiota e quais os papéis
1438 de cada bactéria, ajudam a elucidar diversas questões, como o porquê da variação de microbiota
1439 para a mesma espécie em diferentes ecorregiões. É com objetivo de identificar as bactérias presentes
1440 no trato intestinal de *M. scutellaris* e comparar a riqueza e abundância desses microrganismos em
1441 abelhas coletadas de três ecorregiões que esse trabalho foi realizado. Para isso sequenciamos a
1442 região V2-V3 do gene 16S, usando o DNA extraído do sistema digestivo de 30 abelhas para cada
1443 região. No total 13 filos foram identificados, os dominantes foram Firmicutes, Actinobateria,
1444 Proteobacteria e Bacterioides e os gêneros mais abundantes foram *Lactobacillilus*, *Bifidobacterium*,
1445 *Floricoccus*, *Bombella*, *Pectinatus*, *Fruticobacillus* e *Snodgrassella*. Os índices de diversidade alfa
1446 e beta indicaram uma diferença de riqueza e abundância quando comparamos as bactérias
1447 encontradas no trato digestivo para as três regiões, sendo as abelhas coletadas em Mossoró-RN as
1448 que tiveram o maior índice de riqueza, seguido por Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS.

1449

1450

1451 PALAVRAS-CHAVE: Abelha sem ferrão, Bactéria, Microbiota, Sequenciamento de Nova Geração.

1452

1453 IDENTIFICATION OF THE *MELIPONA SCUTELLARIS* GUT BACTERIAL COMMUNITY
1454 FOR THREE DISTINCT LOCALITIES IN BRAZIL BASED ON METABARCODE DATA
1455 FROM THE 16S GENE

1456
1457 ABSTRACT – The meliponinis bees have several species found in Brazil. *Melipona scutellaris*
1458 belonging to this group and has great social, economic, and environmental importance, especially
1459 in the Northeast region of Brazil, which is considered the original region of its distribution.
1460 However, because of the characteristics related to its honey this species has been getting another
1461 distribution reality being translocated to the South of the country. Few studies have been conducted
1462 with *M. scutellaris*, even less when it comes to the associated microbiota. Bacteria play several
1463 extremely important roles for bees. The identification of this microbiota and the roles of each
1464 bacterium help to elucidate many questions, such as why the microbiota variation for the same
1465 species in different locations. It is with the objective of identifying the bacteria present in the
1466 intestinal tract of *M. scutellaris* and comparing the richness and abundance of these microorganisms
1467 in bees collected from three locations that this work was carried out. For this we sequenced the V2-
1468 V3 region of the 16S gene, using DNA extracted from the digestive system of 30 bees for each
1469 region. In total 13 phyla were identified, the dominant ones were Firmicutes, Actinobacteria,
1470 Proteobacteria and Bacterioides and the most abundant genera were *Lactobacillilus*,
1471 *Bifidobacterium*, *Floricoccus*, *Bombella*, *Pectinatus*, *Fruticobacillus* and *Snodgrassella*. The alpha
1472 and beta diversity indices indicated a difference in richness and abundance when comparing the
1473 bacteria found in the digestive tract for the three regions, with bees collected in Mossoró-RN having
1474 the highest richness index, followed by Aldeia-PE and Novo Hamburgo-RS.

1475

1476 KEY WORDS: Bacteria, Microbiota, Next Generation Sequencing, Stingless Bees.

1477
1478

Introdução

1479 De forma geral, organismos multicelulares apresentam uma relação de sinergismo com
1480 micro-organismos procarióticos e eucarióticos (Esser *et al.* 2018). Essas interações entre os micro-
1481 organismos e os hospedeiros são reconhecidas como uma única unidade funcional denominada
1482 como metaorganismo ou holobionte (Bosch & Miller 2016). A comunidade microbiana interage de
1483 uma forma a contribuir em diversos aspectos na fisiologia do hospedeiro, por exemplo,
1484 comportamento, desenvolvimento, metabolismo, imunidade, entre outros (Esser *et al.* 2018). Uma
1485 das maiores densidades microbianas pode ser encontrada no trato gastrointestinal de hospedeiros
1486 animais, a qual é responsável por uma série de atividades que implicam na sua participação desde
1487 o metabolismo e até na imunidade do hospedeiro (Esser *et al.* 2018; Hall *et al.* 2020).

1488 Nos insetos, as associações com esses microrganismos não se diferem muito da relação
1489 existente entre microbiota e hospedeiros mamíferos, por exemplo. A microbiota intestinal de insetos
1490 pode exercer papéis que tanto beneficiam o hospedeiro, quanto podem causar problemas em
1491 situações de desequilíbrio da microbiota e aparecimento de patógenos (Engel & Moran 2013).
1492 Dentre as abelhas corbiculadas, principalmente *Apis mellifera*, a caracterização de bactérias e
1493 fungos que compõem a microbiota é bem documentada em recursos produzidos pela colônia como
1494 o pólen, mel, própolis, interior de colmeias e nos compartimentos que compõe o sistema digestivo
1495 das abelhas (Gilliam 1997, Hamdi *et al.* 2011, Engel *et al.* 2012, Jensen *et al.* 2013, Powell *et al.*
1496 2014, Erban *et al.* 2017, Bovo *et al.* 2018, Martín-Hernández *et al.* 2018, Ellegaard & Engel 2019,
1497 McFrederick & Rehan 2019, Balzan *et al.* 2020, Wirta *et al.* 2021). As abelhas corbiculadas
1498 apresentam uma microbiota bacteriana intestinal central que é simples e consistente em diferentes
1499 colônias e regiões, e que é obtida a partir do forrageamento em flores (Kwong *et al.* 2017,

1500 McFrederick *et al.* 2012). Além da participação de bactérias simbiotes na proteção contra
1501 patógenos, a microbiota também auxilia na fermentação do pólen (Vásquez e Olofsson, 2009).

1502 Das mais de 500 espécies de abelhas sem ferrão identificadas ao redor do mundo (Michener,
1503 2013), pouco mais de 20 espécies de abelhas sem ferrão tiveram a microbiota caracterizada
1504 (Leonhardt & Kaltenpoth 2014, Diaz *et al.* 2017, Kwong *et al.* 2017, Cerqueira *et al.* 2021, Tang *et*
1505 *al.* 2021, de Sousa 2021). Entretanto, ainda existe uma escassez de informações referente à dinâmica
1506 populacional bacteriana dentro do gênero *Melipona* (Diaz *et al.* 2017, Cerqueira *et al.* 2021). Uma
1507 doença recorrente conhecida como mal de março levou Diaz *et al.* (2017) a investigar uma possível
1508 causa analisando a microbiota de *M. quadrifasciata*, porém os autores não encontraram um padrão
1509 que se associasse às amostras doentes. Um levantamento da microbiota em espécies do gênero
1510 *Melipona* spp. de diferentes biomas brasileiros, Cerqueira *et al.* (2021) observou a perda de
1511 importantes simbiotes de abelhas sociais corbiculadas dentro do gênero *Melipona*.

1512 *Melipona scutellaris* (Meliponini), tinha originalmente sua distribuição restrita as florestas
1513 úmidas do litoral brasileiro, do Rio Grande do Norte até a Bahia, com uma população geneticamente
1514 diferenciada na Chapada Diamantina (Alves *et al.* 2012). Translocadas para as regiões Sul, Sudeste
1515 e na região de Caatinga incluindo Mossoró-RN em virtude do seu potencial como produtora de um
1516 mel de excelente qualidade, de fácil aclimação às diferentes regiões e fácil manejo (Nogueira-
1517 Neto 1997, Imperatriz-Fonseca *et al.* 2007, Alves *et al.* 2012). Popularmente conhecida como urucu
1518 nordestina, *M. scutellaris* até então não teve seu microbioma intestinal caracterizado. Alguns
1519 estudos com espécies de abelhas sem ferrão mostraram que a relação geográfica pode modular a
1520 comunidade bacteriana (Liu *et al.* 2021), fenômeno também observado em *A. mellifera*, onde
1521 colônias de diferentes regiões geográficas, expostas à condições ambientais diferentes, divergiam
1522 em diversidade e abundância de táxons bacterianos (Hroncova *et al.* 2015, Ge *et al.* 2021).

1523 O Brasil abrange em seu território seis biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata
1524 Atlântica, Pampa e Pantanal. A presença desses biomas em território brasileiro faz com que
1525 possamos encontrar as mais diversas condições de vegetação, fauna e clima (Ministério do Meio
1526 Ambiente 2021). Na região Nordeste, há a predominância dos biomas Caatinga e Mata Atlântica.
1527 O primeiro deles, Caatinga, é uma das ecorregiões com maior biodiversidade de clima semiárido,
1528 caracterizado por vegetação de árvores baixas, troncos tortos com poucas folhas e adaptadas aos
1529 períodos de seca (Araújo *et al.* 2005). Por outro lado, o bioma Mata Atlântica, compreende os tipos
1530 de florestas: florestas ombrófilas densas e abertas e floresta sazonal semidecídua (Joly *et al.* 1999).
1531 Na região Sul do Brasil, no estado do Rio Grande do Sul, encontra-se o bioma Pampa localizado na
1532 Zona Temperada do Sul que é caracterizado por prados contendo arbustos e árvores (Roesch *et al.*
1533 2009).

1534 Levando-se em consideração a distribuição atual da espécie *M. scutellaris* e as diferentes
1535 características geográficas onde as colônias destas espécies estão inseridas, o objetivo deste estudo
1536 é descrever a comunidade bacteriana, com base no gene do rRNA 16S, encontrada no trato intestinal
1537 de *M. scutellaris* de três diferentes ecorregiões do Brasil: Mossoró-RN, Novo Hamburgo-RS e
1538 Recife-PE.

1539

1540 **Material e Métodos**

1541 **Amostras**

1542 Indivíduos adultos da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* foram coletados em três
1543 ecorregiões diferentes, Aldeia-PE, Mossoró-RN e Porto Alegre-RS (Figura 1). Para cada local
1544 foram coletadas 10 abelhas de três colmeias diferentes, sendo cinco capturadas com auxílio de pinça
1545 dentro da colmeia, na área de cria e cinco capturadas na entrada da colmeia com auxílio de um
1546 sugador, resultando em 30 amostras por localidade e 90 no total (Tabela 1). As abelhas foram

1547 armazenadas individualmente em eppendorf de 2ml, contendo álcool 70% e logo após alocados em
1548 freezer a -4°C.

1549 As amostras de Aldeia-PE foram coletadas no Meliponário Aldeia que se localiza no
1550 município de Camaragibe, região metropolitana do Recife, Capital do Estado de Pernambuco.
1551 Apresenta 34 colônias manejadas em caixas do tipo nordestina, em uma área seminatural de Floresta
1552 Atlântica com pomar de fruteiras nativas e cultivadas, de aproximadamente 3 hectares. A área
1553 apresenta clima muito úmido, com floresta perenifólia e chuvas ao longo de todo o ano, exceto pelo
1554 curto período de setembro à dezembro, quando a precipitação diminui. É uma área de ocorrência
1555 natural de *M. scutellaris* e ninhos nativos já foram localizados nas proximidades.

1556 Em Mossoró-RN as abelhas foram coletadas em um meliponário urbano, com cerca de 15
1557 colônias manejadas em caixas tipo nordestina translocadas para a região em 2014, provenientes de
1558 Natal – RN e Igarassu – PE. O clima da região é semiárido muito quente com chuvas irregulares
1559 concentradas nos meses de março a abril (Carmo Filho & Oliveira 1989). Na caatinga o manejo da
1560 espécie é intensivo, com alimentação artificial energética de água e açúcar ministrado
1561 quinzenalmente às colônias. Já em Novo Hamburgo-RS, as coletas foram realizadas em ninhos
1562 provenientes de um Meliponário em uma área semiurbana com elementos de floresta mista (Floresta
1563 Atlântica com elementos de Floresta de Araucárias) (IBGE 2012). Caixas do tipo INPA manejadas
1564 intensivamente com alimentação energética e com aquecimento artificial durante o inverno foram
1565 selecionadas. O clima da região é subtropical com chuvas de inverno. A área do Meliponário
1566 apresenta vegetação nativa com elementos cultivados, especialmente *Eucalyptus* e árvores
1567 ornamentais.

1568 **Extração de DNA**

1569 O DNA genômico total foi extraído do sistema digestivo completo de cada uma das abelhas
1570 separadamente. Para isso as abelhas foram dissecadas em placas de petri contendo solução salina

1571 tampão de fosfato estéril (PBS). Logo após a dissecação o sistema digestivo foi colocado em
1572 Eppendorf de 2ml para seguir com a extração de DNA. O DNA gnômico total foi extraído utilizado
1573 o PureLink® Genomic DNA Mini Kit K182002 conforme instruções do fabricante. E após a
1574 extração o DNA foi armazenado em freezer -4°C.

1575 ***Metabarcoding de bactérias***

1576 Os segmentos correspondentes à região V3-V4 do gene RNAr 16S (464 pares de bases) de
1577 bactérias foram amplificados com os *primers* 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e 805R
1578 (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Klindworth et., 2013). Os primers foram sintetizados
1579 com etiquetas (*tags*) de 8 nucleotídeos na extremidade 5' dos primers *forward* e *reverse* (HONG *et*
1580 *al.*, 2016). A escolha da marcação dos *primers* com *tags* tem por objetivo a multiplexação das
1581 amostras anteriormente à etapa de preparação da biblioteca para o sequenciamento, desta forma foi
1582 possível reduzir os custos nesta etapa do estudo. A amplificação dos fragmentos de DNA foi
1583 confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, através de luz UV. Um controle negativo foi
1584 usado para certificação da ausência de contaminação nas reações de PCR.

1585 ***Pooling e sequenciamento***

1586 Para o sequenciamento, todas as amostras foram normalizadas a uma concentração de 4
1587 ng/μl. Adicionamos 5μl de cada amostra normalizada a um tubo de 1,5 mL como etapa anterior à
1588 preparação das bibliotecas de 16S. A partir dessa mistura (“pool”) foi realizada uma segunda
1589 diluição para uma concentração final de 2 ng/μl, que foram utilizadas na preparação das bibliotecas
1590 usando o kit Truseq Nano DNA LT Library Prep (Illumina, San Diego, Califórnia). O Protocolo de
1591 preparação das duas bibliotecas foi iniciado a partir da etapa de Limpeza de DNA Fragmentado e
1592 todos os passos posteriores realizados segundo o fabricante. O sequenciamento foi realizado no
1593 Plataforma Multiusuários de Genômica e Transcriptômica do Centro de Biociências da
1594 Universidade Federal de Pernambuco. O sequenciamento *paired end* das bibliotecas foi realizado

1595 em um instrumento MiSeq, usando kit MiSeq Reagent kit V3 600 ciclos (Illumina, San Diego,
1596 Califórnia).

1597 **Processamento dos dados**

1598 As sequências brutas passaram primeiro por um processo de análise no FastQC para
1599 verificar a qualidade, e a presença de adaptadores, que foram removidos usando o Cutadapt para
1600 posterior análise que foram realizadas utilizando o Mothur (Schloss *et al.* 2009). Na etapa de corte,
1601 eliminamos sequências fora de tamanhos mínimos=150 pb e máximos= 500pb. Para o alinhamento
1602 das sequências e classificação das OTUS foi utilizado o banco de dados silva.nr_v138.pcr.align
1603 fornecido pelo próprio programa em seu site. Após a etapa de pré-cluster foi aplicado um comando
1604 adicional que separa as OTUs abundantes das OTUs raras e somente as OTUs abundantes foram
1605 utilizadas para análises posteriores. Sequências quiméricas também foram removidas através do
1606 software UCHIME (Edgar *et al.* 2011). A classificação das OTUs foi com base na similaridade de
1607 97%, usando o método AGC de agrupamento baseado na abundância.

1608 **Rarefação, Índices de Diversidade e Visualização dos dados**

1609 Para criar um gráfico de rarefação, calcular as diversidades alfa e beta, microbioma central,
1610 Lefse (*Linear discriminant analysis Effect Size*) e visualização dos dados utilizamos a plataforma
1611 online MicrobiomeAnalyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>) (Dhariwal *et al.* 2017, Chong *et*
1612 *al.* 2020). Os dados analisados no MicrobiomeAnalyst não foram normalizados e transformados,
1613 porém passaram por um filtro de prevalência de 10% para contagens mínimas de quatro sequências.

1614 A curva rarefação foi calculada a partir do número de sequências geradas no
1615 sequenciamento para cada uma das 89 amostras de abelhas. Para uma melhor visualização dos dados
1616 de abundância e dos principais filos, famílias e gêneros identificados, plotamos gráficos de barras
1617 com a abundância real dos três níveis taxonômicos para cada uma das amostras. As bactérias que
1618 fazem parte do microbioma central para cada região também foram identificadas para cada uma das

1619 regiões estudadas, o microbioma central indica quais são as bactérias mais prevalentes na maioria
1620 das amostras analisadas.

1621 Além de classificar as bactérias presente no sistema digestivo de *M. scutellaris*, buscamos
1622 identificar as diferenças na composição da comunidade bacteriana das abelhas em cada uma das
1623 três ecorregiões (Mossoró-RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS), através da riqueza e abundância
1624 das OTUs. Com essa finalidade calculamos a nível de gênero a diversidade alfa (OTUs observados,
1625 Chao1, Simpson, Shannon) que levam em consideração a riqueza e abundância de espécies, e teste
1626 estatístico de significância ANOVA para cada um dos índices de diversidade. Calculamos, também,
1627 a diversidade beta utilizando o Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) (Kruskal,
1628 1964a,b) para computar a distância entre as amostras, com base na dissimilaridade de Bray-Curtis
1629 onde o fator localidade foi testado como fonte de variação. Além disso, para observar melhor o
1630 agrupamento entre as ecorregiões, baseado na composição de bactérias e melhor visualização dos
1631 dados, geramos um dendrograma utilizando o índice de Jaccard que aponta a proporção de espécies
1632 compartilhadas entre as amostras em relação ao número total de espécies.

1633 Ainda usando o MicrobiomeAnalyst, calculamos o Lefse que emprega o teste de soma de
1634 classificação de Kruskal-Wallis para detectar características com abundância diferencial
1635 significativa para cada região, ou seja, quais são as OTUs mais significativas para a comunidade.
1636 Já o Diagrama de Venn foi elaborado a partir de uma planilha de presença e ausência das 220 OTUs
1637 nas três regiões usando a plataforma InteractiVenn (Heberle *et al.* 2015).

1638

1639

1640

Resultados

1641 **Sequenciamento**

1642 Das 90 amostras iniciais, uma foi descartada (Novo Hamburgo - RS) devido a qualidade do
1643 DNA, antes do sequenciamento. O sequenciamento das 89 amostras das três ecorregiões estudadas
1644 resultou em 12.284.581 sequências. Após a filtragem por número de bases, só sequências que
1645 tinham entre 150 pb e 500 pb foram mantidas, permanecendo um total de 7.108.736, sendo
1646 1.894.252 o número de sequências únicas. Após a filtragem por qualidade, que gerou um total de
1647 7.021.000 sequências, os filtrados foram separados em dois grupos: um grupo de sequências raras
1648 e um outro grupo de sequências abundantes contendo 5.327.077 sequências usadas nas análises
1649 posteriores, e dessas o número de sequências únicas foi de 3.956, ou seja, sem contar o número de
1650 cópias da mesma sequência.

1651 A análise de rarefação indica que nem todas as amostras atingiram o platô, porém para
1652 amostras das três cidades, houve uma boa representatividade de riqueza, com algumas amostras
1653 atingindo a saturação ou próximo a saturação, o que significa que a amostragem de dados foi
1654 suficiente para acessar a microbiota total das abelhas (Figura 2).

1655 **Análise da composição bacteriana**

1656 As sequências foram agrupadas em OTUs segundo o método de agrupamento ambicioso
1657 baseado em abundância (AGC, do inglês *Abundance-Based Greedy Clustering*), com o corte de
1658 97% de similaridade (*label* = 0.03). Um total de 220 OTUs foram criadas compreendendo as
1659 amostras de Mossoró-RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS, que tiveram 189, 127 e 77 OTUs
1660 respectivamente e com uma média 40 ($\pm 13,68$), 33 ($\pm 7,84$) e 26 ($\pm 3,56$) OTUs por amostra. A
1661 amostra com maior riqueza de OTUs foi a M4F5 (Mossoró) com 78 OTUs e a menor foi para as
1662 amostras 16 (Novo Hamburgo) e M2C5 (Mossoró) com 19 OTUs. A terminologia NC (Não
1663 Identificada) foi utilizada para os táxons que não foram classificados em níveis superiores.

1664 No total 13 filos foram identificados, os dominantes são *Firmicutes*, *Actinobateria*,
1665 *Proteobacteria* e *Bacterioides*. As proporções de cada filo para as três cidades variaram (Figura 3).

1666 O microbioma central para as classes de bactérias com prevalência de 20% e abundância relativa
1667 de 0.01% (Figura 4), apresenta *Bacilli* e *Actinobacteria* como as classes detectadas altamente
1668 abundantes para as três cidades amostradas e Alphaproteobacteria também representado como
1669 classe central para as regiões.

1670 A nível de família, a comunidade bacteriana para Aldeia-PE e Mossoró-RN apresenta uma
1671 maior abundância de *Lactobacillaceae* e *Bifidobacteriaceae*. Em Mossoró-RN algumas amostras
1672 foram proporcionalmente mais abundantes para *Lactobacillaceae* e para as amostras M2C3, M3F5
1673 e M4F3 que tiveram uma alta abundância de *Acetobacteriaceae*. Novo Hamburgo-RS foi mais
1674 abundante para *Bifidobacteriaceae* e *Lactobacillaceae* (Figura 5). Outras famílias como
1675 *Neisseriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Bdellovibrionaceae*,
1676 *Erythrobacteraceae*, *Nevskiaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Streptococcaceae*, *Actinobacteria*,
1677 *Atopobiaceae*, *Selenomonadaceae* e *Prevotellaceae* também foram identificadas.

1678 Alguns gêneros de bactéria como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Floricoccus*, *Bombella*,
1679 *Pectinatus* e *Fruticobacillus*, *Snodgrassella* foram identificados dentre os mais abundantes no
1680 intestino das abelhas, porém em proporções diferentes para as três regiões (Figura 6). Diversas
1681 OTUs, até mesmo com alta abundância, não foram classificadas (NC) a nível de gênero e
1682 permaneceram só com a classificação de família ou classe.

1683 Diversas OTUs tiveram sua abundância com proporções bem diferentes para as três regiões.
1684 Algumas OTUs como OTU15 (*Prevotellaceae_NC*) (90,00; 9,95; 0,05%), OTU 22
1685 (*Acetobacteraceae_NC*) (56,34; 40,78; 2,88%), OTU21 (*Rosenbergiella*) (99,02; 0,88; 0,11%) e
1686 OTU25 (*Acinetobacter*) (99,49; 0,43; 0,07%), tiveram maiores proporções para Novo Hamburgo-
1687 RS, Aldeia-PE e Mossoró-RN respectivamente (Tabela 2).

1688 Já OTUs como OTU12 (*Selenomonadaceae_NC*) (44,48; 55,30; 0,22%), OTU16
1689 (*Pectinatus*) (31,76; 68,05; 0,19%), OTU20 (*Atopobiaceae_NC*) (33,58; 64,64; 1,78%) e OTU27

1690 (*Fructobacillus*) (10,55; 89,30; 0,15%), foram melhor representadas para Aldeia-PE, sendo que as
1691 proporções para cada OTU são referentes a Novo Hamburgo-RS, Aldeia-PE e Mossoró-RN
1692 respectivamente (Tabela 2).

1693 Em Mossoró-RN OTU19 (*Apilactobacillus*) (0,24; 0,23; 99,54%), OTU26 (*Aquabacterium*)
1694 (0,09; 0,04; 99,87%), OTU29 (*Bdellovibrio*) (0,07; 0,13; 99,80%) e OTU32 (*Novosphingobium*)
1695 (0,18; 45,99; 53,83%) tiveram as maiores proporções (Tabela 2). A OTU17 (*Snodgrassella*) teve
1696 99,87% das suas sequências identificadas em Mossoró-RN, com elevada quantidade na amostra
1697 M4C1.

1698 Algumas OTUs identificadas como *Azonexus*, *Lactobacillaceae*-NC, *Burkholderiales*-NC,
1699 *Comamonadaceae*-NC, *Acidovorax*, *Bacteria*-NC, *Bombilactobacillus*, *Aquabacterium*,
1700 *Hydrocarboniphaga*, *Pseudomonas* estavam presente nas amostras de Aldeia-PE e Mossoró -RN
1701 ou em ambas e totalmente ausente em Novo Hamburgo-RS. No Diagrama de Venn (Figura 7)
1702 podemos observar as OTUs compartilhadas e exclusivas de cada uma das cidades amostradas, todas
1703 as ecorregiões compartilham 51 OTUs, Mossoró-RN compartilha mais OTUs cm Aldeia-PE (54)
1704 do que com Novo Hamburgo-RS (9) e tem também o maior número de OTUs exclusivas (75)
1705 (Figura 7).

1706 **Índices de diversidade e análise de agrupamento da comunidade bacteriana**

1707 A diversidade alfa e o valor de significância do p da Anova foram estimados para as colônias
1708 amostradas em cada uma das três ecorregiões, Aldeia-PE, Mossoró-RN e Novo Hamburgo-RS. Os
1709 índices de diversidade observada ($p= 0,00004$) (Figura 8) e Chao1 ($p=0,000005$) (Figura 9)
1710 apontaram uma diferença significativa da diversidade nas colônias das três ecorregiões, com as
1711 colônias de Mossoró-RN com os maiores índices. Esses índices levam em consideração
1712 principalmente o número de espécies (riqueza) e não a abundância. Entretanto, a diversidade alfa

1713 (Shannon e Simpson) não apresentou diferença significativa entre as colônias de Aldeia-PE,
1714 Mossoró-RN e Novo Hamburgo (Figuras 10 e 11).

1715 A diversidade beta foi avaliada através da análise multivariada NMDS baseada no índice de
1716 dissimilaridade de Bray-Curtis (Figura 12) com um valor de estresse de 0,20891. As amostras foram
1717 analisadas por localidade e observamos que há uma sobreposição entre as amostras de Aldeia-PE e
1718 Novo Hamburgo-RS, indicando uma forte similaridade entre as bactérias que compõem sua
1719 comunidade microbiana. No entanto, as amostras provenientes de Mossoró-RN apresentaram
1720 alguma dissimilaridade em relação às outras duas regiões. Resultado similar foi obtido através do
1721 índice de Jaccard, onde o padrão de agrupamentos se repetiu no dendrograma gerado (Figura 13).

1722 O LefSe (análise discriminante linear do tamanho do efeito) determina as OTUs com maior
1723 probabilidade de explicar as diferenças entre as comunidades. 13 OTUs foram responsáveis por
1724 explicar as diferenças entre as três comunidades bacterianas (Figura 14), para Novo Hamburgo-RS
1725 o gênero *Bifidobacterium* foi o que mais teve efeito sobre a comunidade, entre as amostras de
1726 Mossoró-RN o maior efeito foi gerado pela *Lactobacillales*-NC e Aldeia-PE por
1727 *Acetobacteriaceae*-NC.

1728

1729

Discussão

1730 No presente estudo realizamos uma caracterização da microbiota bacteriana presente no
1731 sistema digestivo da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* coletada nas cidades brasileiras de
1732 Aldeia-PE, Mossoró-RN e Novo Hamburgo-RS, onde características de Remanescente de Mata
1733 Atlântica, Semiárido e Floresta Ombrófila Mista estão presentes. Estudos que identificam as
1734 bactérias do sistema digestivo de abelhas sem ferrão são escassos, as abelhas melíferas têm sua
1735 microbiota melhor caracterizadas e por sua vez uma microbiota central bem estabelecida (Cox-
1736 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).

1760 *Floricoccus* foi identificada em todas as amostras analisadas. Essa bactéria foi descrita em
1761 um único trabalho com abelhas sem ferrão, colonizando o sistema digestivo de outras espécies de
1762 *Melipona* (Cerqueira *et al.* 2021). A associação dessa bactéria com abelhas pode ser recente, porém
1763 segundo os pesquisadores aparenta ser estável, funcional, e possivelmente é adquirida a partir do
1764 ambiente, sendo esse gênero identificado em flores de hibiscus (Chuan *et al.* 2017, Cerqueira *et al.*
1765 2021).

1766 Os gêneros *Bombella* e *Snodgrassella* foram encontrados colonizando o sistema digestivo
1767 de *M. scutellaris*, porém, quase 92% das sequências de *Bombella* foram identificadas nas amostras
1768 de Mossoró-RN, apesar de estar presente em praticamente todas as amostras analisadas das outras
1769 regiões. *Snodgrassella* teve 99,86% de suas sequências registradas para Mossoró-RN, presente em
1770 14 das 30 amostras dessa região, e dessas 99,45% das sequências estava presente em uma única
1771 amostra (M4C1). Esses dois táxons são considerados bactérias centrais em *A. mellifera* e, também,
1772 colonizam *Bombus sp.* (Martinson *et al.* 2011, Moran *et al.* 2012). Ambos gêneros são descritos
1773 como bactérias que exercem função proteção e nutrição (Koch & Schmid-Hempel 2011b, Engel *et*
1774 *al.* 2012, Corby-Harris *et al.* 2016, Motta *et al.* 2018, Miller *et al.* 2021), e foram identificadas em
1775 abelhas sem ferrão (Botina *et al.* 2018, Yun *et al.* 2018, Hall *et al.* 2021, Liu *et al.* 2021, Tanget *al.*
1776 2021).

1777 Em relação a *Snodgrassella*, Cerqueira *et al.* (2021) evidencia que as espécies de *Melipona*
1778 podem estar perdendo essa bactéria, por não dependerem mais de *Snodgrassella* para contribuir na
1779 nutrição e proteção. Nossos dados de certa forma contribuem para essa afirmativa, devido à baixa
1780 ocorrência dessa bactéria em nossas amostras. Já no caso de *Bombella* um fator que poderia explicar
1781 a presença mais acentuada nas amostras de Mossoró-RN seria a distância geográfica e
1782 consequentemente o tipo de vegetação, clima da região, além disso a comunidade bacteriana de

1783 abelhas sem ferrão indicar ser mais variável (Kwong et al. 2017, Jones *et al.* 2018a, Hall *et al.* 2021,
1784 Liu *et al.* 2021).

1785 Alguns gêneros de bactérias como *Pectinatus*, *Rosenbergiela* e *Fructobacillus* são
1786 encontrados com menor frequência no sistema digestivo de abelhas sem ferrão e, também, em
1787 outros grupos de abelhas (Kwong *et al.* 2017, Praet *et al.* 2017, Botina *et al.* 2019, Hall *et al.* 2021).
1788 Bactérias destes gêneros foram identificadas em nossas amostras com abundâncias bem variadas
1789 nas três ecorregiões estudadas, em Mossoró-RN as abundâncias dessas bactérias foram menores
1790 que 1%, estando ausente em grande parte das amostras, o gênero *Rosenbergiela* teve 99% das suas
1791 sequências identificadas em Novo Hamburgo-RS e *Fructobacillus* 89,3% em Aldeia-PE.

1792 Duas OTUs foram identificadas como Prevotallaceae-NC e *Bdellovibrio*, a primeira família
1793 de bactérias está associada positivamente ao sistema imunológico em camundongos e foi observado
1794 um aumento significativo dessa família no sistema digestivo de larvas de *A. mellifera* criadas *in*
1795 *vitro* após tratamento com glifosato podendo ser um indicador de resposta da microbiota ao
1796 inseticida, e apesar de dificilmente ser encontrada em abelhas, foi identificada no intestino de *Apis*
1797 *floreana* como família dominante (Dai *et al.* 2018, Ding *et al.* 2019, Ganeshprasad *et al.* 2021).

1798 *Bdellovibrio* são predadores obrigatórios de bactérias Gram-negativas (Stolp 1973) podendo
1799 afetar comunidades bacterianas e podendo ser um eficiente controlador de bactérias patogênicas
1800 (Oyedara *et al.* 2016, Bratanis *et al.* 2020, Sivakala *et al.* 2021), alguns trabalhos relataram a
1801 eficiência de *Bdellovibrio* como predador de bactérias patogênicas do gênero *Pseudomonas* e da
1802 ordem Burkholderiales (Saxon *et al.* 2014, McNeely *et al.* 2016). Porém, os dados para essas
1803 associações com abelhas são poucos, e mais raro ainda para abelhas sem ferrão. Os poucos trabalhos
1804 são limitados a identificar essas bactérias, sem discutir o seu papel (Tang *et al.* 2021).

1805 Para os nossos resultados observamos que seis (todas de Mossoró-RN) amostras que
1806 apresentavam a OTU *Bdellovibrio* em quantidades bem expressivas, também apresentavam uma

1807 relação positiva com bactérias do gênero *Pseudomonas*, família *Moraxellaceae*
1808 (*Pseudomonadales*), alguns representantes da ordem *Burkholderiales* (*Aquabacterium/ Acidovorax/*
1809 *Burkholderiales*-NC/ *Comamonadaceae*-NC), *Methyloversatilis* e *Azonexus*. No entanto, a relação
1810 de todas essas bactérias com abelhas não é conhecida, principalmente se existe uma relação
1811 patogênica entre gêneros de *Pseudomonas*, ou membro da ordem *Burkholderiales*, e se *Bdellovibrio*
1812 seria predador desses patógenos. Novos estudos e mais levantamentos de microbiotas são
1813 necessários, para saber se essas bactérias são comumente encontradas em abelhas sem ferrão ou se
1814 realmente é um caso isolado.

1815 Outra OTU identificada neste trabalho foi classificada como *Prevotellaceae* e 90% das
1816 sequências dessa bactéria foram provenientes de amostras de Novo Hamburgo-RS, em trabalhos
1817 realizados com exposição de organismos ao glifosato, bactérias da família *Prevotellaceae* tem sido
1818 relacionada positivamente com essa exposição, possivelmente relacionada a uma resposta imune
1819 (Larsen *et al.* 2017, Dechartres *et al.* 2019, Hu *et al.* 2021). Em *A. mellifera* a abundância de
1820 *Prevotellaceae* ao ser exposta ao glifosato foi significativamente maior do que o grupo de abelha
1821 não exposta (Dai *et al.* 2018). Para a região de Novo Hamburgo-RS não temos dados que
1822 comprovem a interação dessas abelhas com glifosato ou algum outro produto químico que pudesse
1823 justificar a presença de *Prevotellaceae*, porém não podemos descartar a possibilidade, já que
1824 pesticidas são amplamente utilizados no Brasil (Braga *et al.* 2020, Nunes *et al.* 2021).

1825 Como podemos observar, assim como nesse e em outros trabalhos aqui expostos a diferença
1826 em relação a composição e abundância de bactérias encontradas nas abelhas são comuns e diferentes
1827 fatores podem estar relacionados a essas diferenças. Alguns trabalhos com abelhas que analisam
1828 diferentes fatores, sejam eles infecção, clima, opções de recursos, tamanho corporal ou asa, tamanho
1829 das colônias, status social, idade dos indivíduos ou distância geográfica; usam diferentes índices de
1830 diversidade para entender mais como a comunidade bacteriana se comporta diante desses fatores,

1831 ou utilizam deles para explicar as diferenças entre as comunidades (Koch *et al.* 2012, Cariveau *et*
1832 *al.* 2014, Jones et al 2018b, Yun *et al.* 2018, Kešnerová *et al.* 2020).

1833 Nossas amostras foram coletadas em três ecorregiões distantes geograficamente, com clima
1834 e formação faunística bem distintas e em duas dessas ecorregiões (Mossoró-RN e Novo Hamburgo-
1835 RS) essas abelhas são introduzidas. Diversas OTUs foram compartilhadas entre amostras de
1836 Mossoró-RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS, e tiveram abundâncias variadas, além disso
1837 encontramos OTUS exclusivas para amostras de cada ecorregião coletada, o que gerou diferenças
1838 nos índices diversidade alfa.

1839 Para a diversidade de OTUs Observadas e índice de Chao1 teve diferença significativas
1840 entre as ecorregiões levantadas, esses índices refletem a riqueza de bactérias encontrada nas abelhas
1841 desses locais, é possível observar que existe uma tendência de maior riqueza de bactérias para as
1842 amostras de Mossoró-RN com amostras destoando com mais de 60 OTUs identificadas, o que
1843 reflete no índice de Chao1 que usa a riqueza de espécies como base para seu cálculo, indicando que
1844 em diversos intestinos de abelhas dessa região tiveram índices maiores. Quando comparadas as
1845 outras duas ecorregiões, principalmente Novo Hamburgo-RS.

1846 Já para os índices de Shannon e de Simpson não houve diferença significativa entre as
1847 ecorregiões, esses índices estão relacionados com a riqueza e abundância das OTUs. As amostras
1848 de Mossoró-RN e Aldeia-PE apresentam amostras com valores de índices baixos o que significa
1849 uma baixa abundância e amostras com elevada abundância, enquanto as amostras de Novo
1850 Hamburgo-RS apresentam índices com faixas de valores menos variados entre suas amostras. Tang
1851 *et al.* 2021 observou o mesmo padrão de diversidade alfa encontrados aqui com diferenças
1852 significativas na riqueza da comunidade (Sobs e Chao) e não significativa para índices de
1853 diversidade Shannon e Simpson.

1854 No agrupamento de similaridade como NMDS (diversidade beta) o dendrograma baseado
1855 no índice de Jaccard, tivemos amostras das três ecorregiões que se agrupavam apresentando uma
1856 composição de bactérias relacionadas e amostras principalmente de Mossoró-RN que destoam em
1857 sua composição das demais regiões e uma tendência maior de agrupamento das amostras de Aldeia-
1858 PE com Novo Hamburgo-RS.

1859 Diferenças na composição bacteriana podem ser explicadas por diversos fatores como a
1860 localidade geográfica e história de vida das abelhas. As diferentes regiões geográficas onde essas
1861 abelhas são encontradas são compostas por vegetação e climas diferentes, esses fatores podem
1862 influenciar na estrutura da microbiota intestinal das abelhas, já que muitas bactérias são adquiridas
1863 do meio ambiente durante o forrageamento (McFrederick *et al.* 2012, Jones *et al.* 2017,
1864 McFrederick & Rehan 2019), especialmente os meliponíneos em que os indícios de que a maioria
1865 das bactérias são adquiridas nesse momento (Hall *et al.* 2021, Keller *et al.* 2021). Além disso
1866 estudos mostram que as diferentes plantas podem ser colonizadas por diferentes bactérias
1867 (Vannette 2020), e certos componentes do néctar podem alterar as bactérias intestinais das abelhas
1868 (Ma *et al.* 2020).

1869 A influência da distância e regiões geográficas na diversidade microbiana de duas espécies
1870 de abelhas sem ferrão foi mostrada por Liu *et al.* (2021), o que corrobora as mesmas teorias por
1871 outros trabalhos (Soininen *et al.* 2007). Além disso, trabalhos não tendo esse viés como objetivo
1872 principal, também relacionaram o local como um fator que diferenciava a comunidade bacteriana
1873 de abelhas (Leonhardt & Kaltenpoth, 2014, Kwong *et al.* 2017, Jones *et al.* 2018a, Hall *et al.* 2021)
1874 tendo como uma das justificativas a paisagem onde as abelhas foram coletadas. Usando
1875 megaquilídeos como base de estudo, McFrederick *et al.* (2017) mostrou que essas abelhas e flores
1876 compartilham as mesmas bactérias e que a exposição a essas plantas além de atuarem como fontes
1877 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).

1901 Tendo que *M. scutellaris* ocorre naturalmente em florestas de clima úmido e ameno e que
1902 nossas amostras foram translocadas para ecorregiões de clima semiárido seco com altas
1903 temperaturas e para um clima subtropical marcado com períodos de baixas temperaturas, essa
1904 condição pode ser um diferencial na composição bacteriana de nossas amostras. A abelha sem ferrão
1905 *Partamona orizabaensis* teve sua atividade de voo afetada e conseqüentemente seu comportamento
1906 competitivo por recursos devido a influência de fatores climáticos, podendo levar a um menor nível
1907 de recursos, ou seja, menos visitas a diferentes plantas (Keppner & Jarau 2016) podendo assim
1908 afetar na diversidade microbiana das abelhas.

1909 Essas diferenças marcantes de cada localidade, pode ser um dos fatores que diferenciam a
1910 microbiota de *M. scutellaris*, porém não podemos afirmar ao certo se é o único ou o quanto ele
1911 influencia, já que os estudos para espécies de abelhas sem ferrão e mais especificamente *M.*
1912 *scutellaris* em relação a microbiota intestinal quase não existem. Os estudos que podemos nos
1913 basear ainda são relacionados principalmente *A. mellifera*.

1914 Para entender um pouco melhor a dinâmica da colonização bacteriana, suas diferenças,
1915 influências e importância desses microrganismos para nutrição, saúde e sobrevivência de *M.*
1916 *scutellaris* assim como outras abelhas sem ferrão, são necessários amplos estudos. Recentemente,
1917 o cenário tem sido favorável para nossas abelhas nativas, trabalhos de grande importância como o
1918 de Cerqueira *et al.* (2021) com diversas populações de *Melipona* brasileira que mostrou um possível
1919 ganho e perda de linhagens bacterianas e como isso pode afetar essas abelhas, e Díaz *et al.* 2016
1920 com *M. quadrifasciata*, com a investigação da microbiota para identificar possíveis doenças; têm
1921 demonstrado mais ainda a importância de novos estudos.

1922 Outros trabalhos fora do Brasil com abelhas sem ferrão como o de Hall *et al.* (2021) e Liu
1923 *et al.* (2021) que usam ferramentas para identificar a microbiota intestinal das abelhas e explicar a

1924 variação na abundância e riqueza de bactérias em diferentes regiões geográficas e a influência da
1925 translocação de colmeias, acrescentam na discussão e entendimento de trabalhos como o nosso.

1926 Portanto, obtivemos resultados importantes sobre a microbiota bacteriana de *M. scutellaris*.
1927 Observamos que existem famílias de bactérias que são centrais e estão presentes em todas as
1928 amostras, assim como alguns gêneros, mas também observamos diferenças de riqueza e abundância
1929 de famílias e gêneros de bactérias colonizando o sistema digestivo dessas abelhas. Talvez, um
1930 elemento chave para essas diferenças seja a localidade (diferença geográfica) onde as abelhas foram
1931 coletadas. Analisamos amostras de colônias dentro da distribuição original da espécie e que foram
1932 translocadas para outras regiões. Apesar dos interessantes resultados obtidos aqui, ainda são
1933 necessários mais levantamentos como esse para elucidar melhor a dinâmica da microbiota de *M.*
1934 *scutellaris*.

1935

1936 **Agradecimentos**

1937
1938 Agradeço a CAPES pela concessão da Bolsa, ao programa de Pós-graduação em Entomologia da
1939 Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Laboratório de Bioinformática e Biologia
1940 Evolutiva. Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, à Associação A.B.E.L.H.A e ao Instituto
1941 Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA pelo financiamento do
1942 projeto, Edital CNPq/ABELHA/IBAMA – 400597/2018-7; Licença de coleta SISBIO - 67393-1;
1943 SISGEN Cadastro nº A1B8F1F.

1944

1945 **Literatura Citada**

1946
1947 **Ambika M.B., S. Ratering, V. Rusch, A. Schwiertz, R. Geissler-Plaum, M. Cardinale, & S.**
1948 **Schnell. 2016.** Bacterial microbiota associated with flower pollen is influenced by
1949 pollination type, and shows a high degree of diversity and species-specificity. *Environ*
1950 *Microbiol*, 18: 5161-5174.

1951

- 1952 **Anjum, S.I., A.H. Shah, M. Aurongzeb, J. Kori, M.K. Azim, M.J. Ansari & L. Bin. 2018.**
 1953 Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan. Saudi J.
 1954 Biolog Sci. 25: 388–392
 1955
- 1956 **Araújo, F.S., M.J.N. Rodal & M.R.V. Barbosa. 2005.** Análise das variações da biodiversidade
 1957 do bioma caatinga: suporte a estratégias regionais de conservação. Ministério do Meio
 1958 Ambiente, Brasília. P.446
 1959
- 1960 **Bäckhed, F., R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson & J.I. Gordon. 2005.** Host-bacterial
 1961 mutualism in the human intestine. Science. 25: 1915-1920.
 1962
- 1963 **Bajaj, J.S., D.M. Heuman, P.B. Hylemon, A.J. Sanyal, M.B. White, P. Monteith, N.A. Noble,
 1964 A.B. Unser, K. Daita, A.R. Fisher, M. Sikaroodi & P.M. Gillevet. 2014.** Altered profile
 1965 of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. J Hepatol. 60:
 1966 940-947.
 1967
- 1968 **Balzan, S., L. Carraro, R. Merlanti, L. Lucatello, F. Capolongo, F. Fontana, E. Novelli, I.
 1969 Larini, N. Vitulo & B. Cardazzo. 2020.** Microbial metabarcoding highlights different
 1970 bacterial and fungal populations in honey samples from local beekeepers and market in
 1971 northeastern Italy. Int J Food Microbio. 334: 108806
 1972
- 1973 **Beng, K.C & R.T. Corlett. 2019.** Amplicon sequencing dataset of soil fungi and associated
 1974 environmental variables collected in karst and non-karst sites across Yunnan province,
 1975 southwest China. Data in brief. 27: 104575,
 1976
- 1977 **Bosch, T.C & D.J. Miller. 2016.** The holobiont imperative: Perspectives from early emerging
 1978 animals. Springer-Verlag Wien. 155p.
 1979
- 1980 **Bovo, S., A. Ribani, V.J. Utzeri, G. Schiavo, F. Bertolini & L. Fontanesi. 2018.** Shotgun
 1981 metagenomics of honey DNA: Evaluation of a methodological approach to describe a
 1982 multikingdom honey bee derived environmental DNA signature. PloS ONE. 13: e0205575.
 1983
- 1984 **Bratanis, E., T. Andersson, R. Lood & E. Bukowska-Faniband. 2020.** Biotechnological
 1985 potential of *Bdellovibrio* and like organisms and their secreted enzymes. Front. Microbiol.
 1986 11:662.
 1987
- 1988 **Cani, P.D. & N.M. Delzenne. 2009.** The role of the gut microbiota in energy metabolism and
 1989 metabolic disease. Curr Pharm Des. 15: 1546–1558.
 1990
- 1991 **Cariveau, D., J.E. Powell, H. Koch, W. Rachael & N.A. Moran. 2014.** Variation in gut microbial
 1992 communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*).
 1993 ISME J. 8: 2369–2379.
 1994
- 1995 **Carmo Filho, F. & O.F. Oliveira. 1989.** Mossoró: um município do semiárido: caracterização
 1996 climática e aspecto florístico. Mossoró: UFERSA, 1989. 62 p. (Coleção Mossoroense, 672,
 1997 série B).
 1998

1999 **Cerqueira, A.E.S., T.J. Hammer, N.A. Moran, W.C. Santana, M.C.M. Kasuya & C.C. da**
2000 **Silva. 2021.** Extinction of anciently associated gut bacterial symbionts in a clade of stingless
2001 bees. *ISME J.* 15:2813-2816.
2002

2003 **Chong, J., P. Liu, G. Zhou, & J. Xia. 2020** "Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive
2004 statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data" *Nat Protoc.*15: 799–821.
2005

2006 **Chuah, L.O., K.P. Yap, A.K. Shamila-Syuhada, K.L. Thong, R. Ahmad, M.T. Liong, G.**
2007 **Rusul. 2017.** *Floriccoccus tropicus* gen. nov., sp. Nov. and *Floriccoccus penangensis* sp. Nov.
2008 isolated from fresh flowers of durian tree and hibiscus. *Int J Syst Evol Microbiol.* 67: 4979-
2009 4985.
2010

2011 **Climate-Data.org** - [.climate-data.org/america-do-sul/brasil/rio-grande-do-sul/novo-hamburgo-](https://climate-data.org/america-do-sul/brasil/rio-grande-do-sul/novo-hamburgo-4791/)
2012 [4791/](https://climate-data.org/america-do-sul/brasil/rio-grande-do-sul/novo-hamburgo-4791/) acessado dia 20 de outubro de 2021.
2013

2014 **Corby-Harris, V., L. Snyder, C.A.D. Meador, R. Naldo, B. Mott, K.E. Anderson. 2016.**
2015 *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. Nov., improves honey bee (Hymenoptera:
2016 Apidae) resistance to *Nosema*. *J Econ Entomol.* 109: 537–543.
2017

2018 **Dai, P., Y. Zhenxiong, S. Ma, Y. Yang, Q. Wang, C. Hou, Y. Wu, Y. Liu & Q. Diao. 2018.** The
2019 herbicide Glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of
2020 Honey Bee during larvae reared in Vitro. *J Agric Food Chem.* 66: 7786-7793.
2021

2022 **De Sousa, L.P. 2021.** Bacterial communities of indoor surface of stingless bee nests. *PloS ONE*,
2023 16: e0252933.
2024

2025 **De Vega, C., S. Álvarez-Pérez, R.G. Albaladejo, S-L. Steenhuisen, M-A. Lachance, S.D.**
2026 **Johnson & C.M. Herrera. 2021.** The role of plant–pollinator interactions in structuring
2027 nectar microbial communities. *J Ecol.* 109: 3379– 3395.
2028

2029 **Dechartres,J., J.L. Pawluski, M-M. Gueguen, A. Jablaoui, E. Maguin, R. Moez & T.D.**
2030 **Charlier. 2019.** Glyphosate and glyphosate-based herbicide exposure during the peripartum
2031 period affects maternal brain plasticity, maternal behaviour and microbiome. *J.*
2032 *Neuroendocrinol.* 31: e12731.
2033

2034 **Dhariwal, A., J. Chong, S. Habib, I. King, L.B. Agellon, & J. Xia. 2017.** MicrobiomeAnalyst -
2035 a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome
2036 data". *Nucleic Acids Res.* 45: 180-188.
2037

2038 **Ding, Y., Y. Yan, D. Chen, L. Ran, J. Mi, L. Lu, B. Jing, X. Li, X. Zeng & Y. Cao 2019.**
2039 Modulating effects of polysaccharides from the fruits of *Lycium barbarum* on the immune
2040 response and gut microbiota in cyclophosphamide-treated mice. *Food & Function*, 10: 3671-
2041 3683
2042

2043 **Edgar, R.C. 2010.** Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.*
2044 26:2460–2461.
2045

- 2046 **Edgar, R.C., B.J. Haas, J.C. Clemente, C. Quince & R. Knight. 2011.** UCHIME improves
2047 sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinform.* 27: 2194–2200.
2048
- 2049 **Ellegaard, K.M. & P. Engel. 2019.** Genomic diversity landscape of the honey bee gut microbiota.
2050 *Nat Commun.* 10:446.
2051
- 2052 **Endo, A., Y. Futagawa-Endo & L.M.T. Dicks. 2009.** Isolation and characterization of fructophilic
2053 lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Syst Appl Microbiol.* 32: 593–600.
2054
- 2055 **Engel, P., V.G. Martinson & N.A. Moran. 2012.** Functional diversity within the simple gut
2056 microbiota of the honey bee. *PNAS.* 109: 11002–11007.
2057
- 2058 **Engel, P. & N.A. Moran. 2013.** The gut microbiota of insects – diversity in structure and Function.
2059 *FEMS Microbiol Rev* 37: 699–735.
2060
- 2061 **Erban, T., O. Ledvinka, M. Kamler, M. Nesvorna, B. Hortova, J. Tyl, D. Titera, M. Markovic
2062 & J. Hubert. 2017.** Honeybee (*Apis mellifera*)- associated bacterial community affected by
2063 American foulbrood: detection of *Paenibacillus larvae* via microbiome analysis. *Sci Rep.*
2064 7:5084.
2065
- 2066 **Esser, D., J. Lange, G. Marinos, M. Sieber, L. Best, D. Prasse, J. Bathia, M.C. Rühlemann, K.
2067 Boersch, C. Jaspers & F. Sommer. 2019.** Functions of the microbiota for the physiology
2068 of animal metaorganisms. *J Innate Immun.* 11: 393–404.
2069
- 2070 **Evans, J.D. & R.S. Schwarz. 2011.** Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee
2071 health. *Trends Microbiol.* 19: 614-620.
2072
- 2073 **Forsgren, E., T.C. Olofsson, A. Vásquez & I. Fries. 2010.** Novel lactic acid bacteria inhibiting
2074 *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie* 41: 99–108.
2075
- 2076 **Ganeshprasad, D.N., K. Jani, Y.S. Shouche & A.H. Sneharani. 2021.** Gut bacterial inhabitants
2077 of open nested honey bee, *Apis florea*, PREPRINT (Version 1) available at Research Square
2078
- 2079 **Ge, Y., Z. Jing, Q. Diao, J-Z. He & Y-J. Liu. 2021.** Host species and geography differentiate
2080 honeybee gut bacterial communities by changing the relative contribution of community
2081 assembly processes. *mBio* 12:e00751-21.
2082
- 2083 **Gilliam, M. 1997.** Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey
2084 bees. *FEMS Microbiol Lett.* 155: 1–10.
2085
- 2086 **Hamdi, C., A. Balloi, J. Essanaa, E. Crotti, E. Gonella, N. Raddadi, I. Ricci, A. Boudabous, S.
2087 Borin, A. Manino, C. Bandi, A. Alma, D. Daffonchio & A. Cherif. 2011.** Gut microbiome
2088 dysbiosis and honey bee health. *J. Appl. Entomol.* 135: 524–533.
2089
- 2090 **Heberle, H., G.V. Meirelles, F.R. da Silva, G.P. Telles & R. Minghim, R. 2015.** InteractiVenn:
2091 a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinform.* 16:169.
2092

- 2093 **Hildebrand, F., R.Y. Tadeo, A.Y. Voigt, P. Bork & J. Raes. 2014.** LotuS2: an efficient and user-
2094 friendly OTU processing pipeline. *Microbiome*. 2: 30.
2095
- 2096 **Hroncova, Z., J. Havlik, J. Killer, I. Dostkocil, J. Tyl, M. Kamler, T. Dalibor, H. Josef, M.**
2097 **Jakub, B. Vera & R. Vojtech. 2015.** Variation in honey bee gut microbial diversity affected
2098 by ontogenetic stage, age and geographic location. *PLoS ONE* 10: e0118707.
2099
- 2100 **Hu, J., C. Lesseur, Y. Miao, F. Manservisi, S. Panzacchi, D. Mandrioli, F. Belpoggi, J. Chen**
2101 **& L. Petrick 2021.** Low-dose exposure of glyphosate-based herbicides disrupt the urine
2102 metabolome and its interaction with gut microbiota. *Sci Rep* 11, 3265.
2103
- 2104 **Jensen, A.B., K. Aronstein, J.M. Flores, S. Vojvodic, M.A. Palacio & M. Spivak. 2013.**
2105 Standard methods for fungal brood disease research. *J Apicul Res*. 52: 1-20.
2106
- 2107 **Jessy, P., P. Anneleen, S-H. Regula, M. Ivan, S. Guy & V. Peter. 2017.** Large-scale cultivation
2108 of the bumblebee gut microbiota reveals an underestimated bacterial species diversity
2109 capable of pathogen inhibition. *Environ. Microbiol.* 20: 214-227.
2110
- 2111 **Joly, C.A., M.P.M. Aidar & C.A. Klink. 1999.** Evolution of the Brazilian phytogeography
2112 classification systems: implications for biodiversity conservation. *Ciência e Cultura*. 51:
2113 331-348.
2114
- 2115 **Jones, J.C, C. Fruciano, F. Hildebrand, H. Al Toufalilia, N.J Balfour, P. Bork, P. Engel,**
2116 **F.L.W. Ratnieks & W.O.H. Hughes. 2018a.** Gut microbiota composition is associated
2117 with environmental landscape in honey bees. *Ecol Evol*. 8: 441– 451.
2118
- 2119 **Jones, J.C., C. Fruciano, J. Marchant, F. Hildebrand, S. Forslund, P. Bork, P. Engel &**
2120 **W.O.H. Hughes. 2018b.** The gut microbiome is associated with behavioural task in honey
2121 bees. *Insect. Soc.* 65: 419–429.
2122
- 2123 **Keller, A., Q.S. McFrederick, P. Dharampa, S. Steffan, B.N. Danforth, S.D. Leonhardt. 2021.**
2124 (More than) Hitchhikers through the network: the shared microbiome of bees and flowers.
2125 *Curr Opin Insect Sci*. 44: 8-15.
2126
- 2127 **Keppner, E.M. & S. Jarau. 2016.** Influence of climatic factors on the flight activity of the stingless
2128 bee *Partamona orizabaensis* and its competition behavior at food sources. *J Comp*
2129 *Physiol*. 202: 691–699.
2130
- 2131 **Kešnerová L, O. Emery, M. Troilo, J. Liberti, B. Erkosar & P. Engel. 2020.** Gut microbiota
2132 structure differs between honeybees in winter and summer. *ISME J* 14: 801–814.
2133
- 2134 **Koch, H. & P. Schmid-Hempel. 2011a.** Bacterial communities in Central European Bumblebees:
2135 Low diversity and high specificity. *Microb Ecol*. 62: 121–133.
2136
- 2137 **Koch, H. & P. Schmid-Hempel. 2011b.** Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees
2138 against an intestinal parasite. *PNAS*. 108: 19288–19292.
2139

2140 **Kruskal, J.B. (1964a)**. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric
2141 hypothesis. *Psychometrika*. 29: 1–27
2142 .

2143 **Kruskal, J.B. (1964b)**. Nonmetric multidimensional scaling: A numerical method. *Psychometrika*.
2144 29: 115–129.
2145

2146 **Kwong, W.K., L.A. Medina, H. Koch, K-W. Sing, E.J.Y. Soh, J.S. Ascher, R. Jaffé & N.A.**
2147 **Moran. 2017**. Dynamic microbiome evolution in social bees. *Sci. Adv.* 3: e1600513
2148

2149 **Larsen, J.M. 2017**. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease.
2150 *Immunology*. 151: 363–374.
2151

2152 **Lebonah, D.E., A. Dileep, K. Chandrasekhar, S. Sreevani, B. Sreedevi & J. Pramoda Kumar.**
2153 **2014**. DNA barcoding on bacteria: A review. *Adv. Biol.* 2014: 1-9.
2154

2155 **Leonhardt, S.D. & M. Kaltenpoth. 2014**. Microbial communities of three sympatric australian
2156 stingless bee species. *PLoS ONE* 9: e105718.
2157

2158 **Li, P-D., R. Jeewon, B. Aruna, H-Y. Li, F-C. Lin & H-K. Wang. 2019**. Metabarcoding reveals
2159 differences in fungal communities between unflooded versus tidal flat soil in coastal saline
2160 ecosystem. *Sci. Total Environ.* 690: 911-922.
2161

2162 **Ma, W.H., X.Y. Zheng, L.X. Li, J.S. Shen, W.H. Li & Y. Gao. 2020**. Changes in the gut
2163 microbiota of honey bees associated with jujube flower disease. *Ecotox Environ Safe*
2164 198:11066.
2165

2166 **Martín-Hernández, R., C. Bartolomé, N. Chejanovsky, Y. Le Conte, A. Dalmon, C.**
2167 **Dussaubat, P. García-Palencia, A. Meana, M.A. Pinto, V. Soroker & M. Higes. 2018.**
2168 *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environ Microbiol.*
2169 20:1302-1329.
2170

2171 **Martinson, V.G., B.N. Danforth, R.L. Minckley, O. Rueppell, S. Tingek & N.A. Moran. 2011.**
2172 A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol Ecol.*
2173 20: 619–628.
2174

2175 **McFrederick, Q.S. & S.M. Rehan. 2019**. Wild Bee pollen usage and microbial communities co-
2176 vary across landscapes. *Microbiol Ecol.* 77: 513–522.
2177

2178 **McFrederick Q.S, J.M. Thomas, J.L. Neff, H.Q. Vuong, K.A. Russell, A.R. Hale & U.G.**
2179 **Mueller. 2017**. Flowers and wild *Megachilid* bees share microbes. *Microbiol Ecol* 73:
2180 188–200.
2181

2182 **McFrederick, Q.S., W.T. Wcislo, D.R. Taylor, H.D. Ishak, S.E. Dowd & U.G. Mueller. 2012.**
2183 Environment or kin: whence do bees obtain acidophilic bacteria?. *Mol Ecol.* 21: 1754-1768.
2184

2185 **Michener, C.D. 2013**. The meliponini, p. 3–17 In: Vit, P., S.R.M. Pedro & D. Roubik (eds) Pot-
2186 honey: a legacy of stingless bees. New York, Springer, 697p.

2187
2188 **Miller, D.L., E.A. Smith & I.L.G. Newton. 2021.** A bacterial symbiont protects honey bees from
2189 fungal disease. *mBio* 12:e00503-21.
2190
2191 **Ministério do Meio Ambiente. 2021.** Disponível em antigo.mma.gov.br/biomas.html . Acessado em 22
2192 de outubro de 2021.
2193
2194 **Mohammad, S.M., N-K. Mahmud-Ab-Rashid & N. Zawawi. 2020.** Probiotic properties of
2195 bacteria isolated from bee bread of stingless bee *Heterotrigona itama*. *J Apicul Res*, 60: 1–
2196 16.
2197
2198 **Motta, E.V.S., K. Raymann & N.A. Moran. 2018.** Glyphosate perturbs the gut microbiota of
2199 honey bees. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci.* 115: 10305-10310
2200
2201 **Nunes, A., C. Schmitz, S. Moura & M. Maraschin. 2021.** The influence of recent Brazilian policy
2202 and legislation on increasing bee mortality. *Res., Soc. Dev.* 10: e36910414157.
2203
2204 **Olofsson, T.C. & A. Vásquez. 2008.** Detection and Identification of a Novel Lactic Acid Bacterial
2205 Flora Within the Honey Stomach of the Honeybee *Apis mellifera*. *Curr Microbiol.* 57: 356–
2206 363.
2207
2208 **Oyedara, O.O., E.J. De Luna-Santillana, O. Olguin-Rodriguez, X. Guo, M.A. Mendoza-Villa,
2209 J.L. Menchaca-Arredondo, T.O. Elufisan, J.A. Garza-Hernandez, I. Garcia Leon &
2210 M.A. Rodriguez-Perez. 2016.** Isolation of *Bdellovibrio sp.* from soil samples in Mexico
2211 and their potential applications in control of pathogens. *MicrobiologyOpen*. 5: 992–1002.
2212
2213 **Powell, J.E., V.G. Martinson, K. Urban-Mead, N.A. Moran. 2014.** Routes of acquisition of the
2214 gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 7378 –7387.
2215
2216 **Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies & F.O.
2217 Glöckner. 2013.** The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data
2218 processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* 41: 590-596.
2219
2220 **Roesch, F.L., W. Costa, B. Vieira, A. Pereira, A.L. Schünemann, I.F. Teixeira, A. Julia, T.
2221 Senna, V.M Stefenon. 2009.** The Brazilian Pampa: A Fragile Biome. *Diversity* 1: 182–198.
2222
2223 **Rosal, M.J.N. & E.V.S.B. Sampaio.** A vegetação do bioma caatinga, p. 11-24. In: Sampaio,
2224 E.V.S.B., A.M. Giuliatti, J. Virgínio, C.F.L. Gamarra-Rojas (eds.), *Vegetação e flora da*
2225 *caatinga*. Recife, PNE/CNIP, 176p.
2226
2227 **Rouzé, R., A. Moné, F. Delbac, L. Belzunces & N. Blot. 2019.** The honeybee gut microbiota is
2228 altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema*
2229 *ceranae*. *Microbes Environ.* 34:226-233.
2230
2231 **Saxon, E. B., R.W. Jackson, S. Bhumbra, T. Smith & R.E. Sockett. 2014.** *Bdellovibrio*
2232 *bacteriovorus* HD100 guards against *Pseudomonas tolaasii* brown-blotch lesions on the

- 2233 surface of post-harvest *Agaricus bisporus* supermarket mushrooms. BMC microbiol. 14: 1-
2234 11.
2235
- 2236 **Schloss, P.D., S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A.**
2237 **Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G.**
2238 **Thallinger, D.J. Van Horn & C.F. Weber. 2009.** Introducing mothur: open-source,
2239 platform-independent, community- supported software for describing and comparing
2240 microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 75: 7537–7541.
2241
- 2242 **Serviço Florestal Brasileiro. 2018.** Inventario Florestal Nacional: principais resultados: Rio
2243 Grande do Sul. Brasília, DF: MMA, 83 p. (Série Relatórios Técnicos - IFN).
2244
- 2245 **Soininen, J., R. McDonald & H. Hillebrand. 2007.** The distance decay of similarity in ecological
2246 communities. Ecography. 30: 3-12.
2247
- 2248 **Stolp, H. 1973.** The *Bdellovibrios*: Bacterial Parasites of Bacteria. Annu Rev Phytopathol. 11: 53-
2249 76.
2250
- 2251 **Syed Yaacob, S. N., F. Huyop, R.K.R. Ibrahim, & R.A. Wahab. 2018.** Identification of
2252 *Lactobacillus* spp. and *Fructobacillus* spp. isolated from fresh *Heterotrigona itama* honey
2253 and their antagonistic activities against clinical pathogenic bacteria. J Apicul Res. 57: 395–
2254 405.
2255
- 2256 **Tang, Q.H., C.H. Miao, Y.F. Chen, Z-X. Dong, Z. Cao, S-Q. Liao, J-X. Wang, Z-W. Wang &**
2257 **J. Guo. 2021.** The composition of bacteria in gut and beebread of stingless bees (Apidae:
2258 Meliponini) from tropics Yunnan, China. Antonie van Leeuwenhoek 114: 1293–1305.
2259
- 2260 **Vannette, R.L. 2020.** The floral microbiome: Plant, pollinator, and microbial perspectives. Annu.
2261 Rev. Ecol. Evol. Syst. 51: 363–86
2262
- 2263 **Vásquez A & T.C. Olofsson. 2009.** The Lactic Acid Bacteria involved in the production of bee
2264 pollen and bee bread, J. Apicult. Res 48: 189–195.
2265
- 2266 **Wirta, H., N. Abrego, K. Miller, T. Roslin & E. Vesterinen. 2021.** DNA traces the origin of
2267 honey by identifying plants, bacteria and fungi. Sci Rep. 11: 4798.
2268
- 2269 **Yu, D.W., Y. Ji, B.C. Emerson, X. Wang, C. Ye, C. Yang & Z. Ding. 2012.** Biodiversity soup:
2270 metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. Methods
2271 Ecol Evol. 3: 613-623.
2272
- 2273 **Yun, J-H., M-J. Jung, P.S. Kim & J-W. Bae. 2018.** Social status shapes the bacterial and fungal
2274 gut communities of the honey bee. Sci Rep. 8: 1-11.
2275
- 2276 **Zeid, A.A.A., A.M. Khattaby, I.A.A El-Khair & H.I.A. Gouda. 2021.** Detection bioactive
2277 metabolites of *Fructobacillus fructosus* strain HI-1 isolated from honey bee’s digestive tract
2278 against *Paenibacillus larvae*. Probiotics & Antimicro. Prot, 13: 1-10.
2279

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 colmeia	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 colmeia	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 colmeia	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 colmeia	M2F1-M2F2-M2F3- M2F4-M2F5	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Dentro da colmeia	M3C1-M3C2-M3C3- M3C4-M3C5	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Entrada da colmeia	M3F1-M3F2-M3F3- M3F4-M3F5	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Dentro da colmeia	M4C1-M4C2-M4C3- M4C4-M4C5	Semiárido	Introduzida
Mossoró-RN	Entrada da colmeia	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 colmeia	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 colmeia	16-17-18-19-20	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida
Novo Hamburgo-RS	Dentro da colmeia	21-22-23-24-25	Floresta Ombrófila Mista	Introduzida

Novo Hamburgo-RS Entrada da colméia 26-27-28-29-30 Floresta Ombrófila Mista Introduzida

2282

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

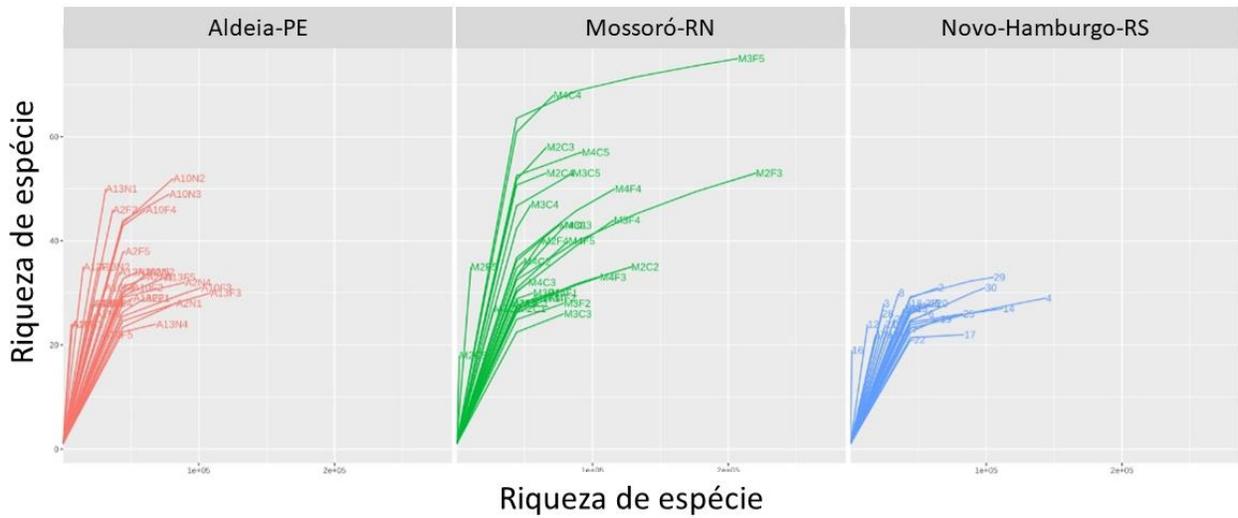
2288

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

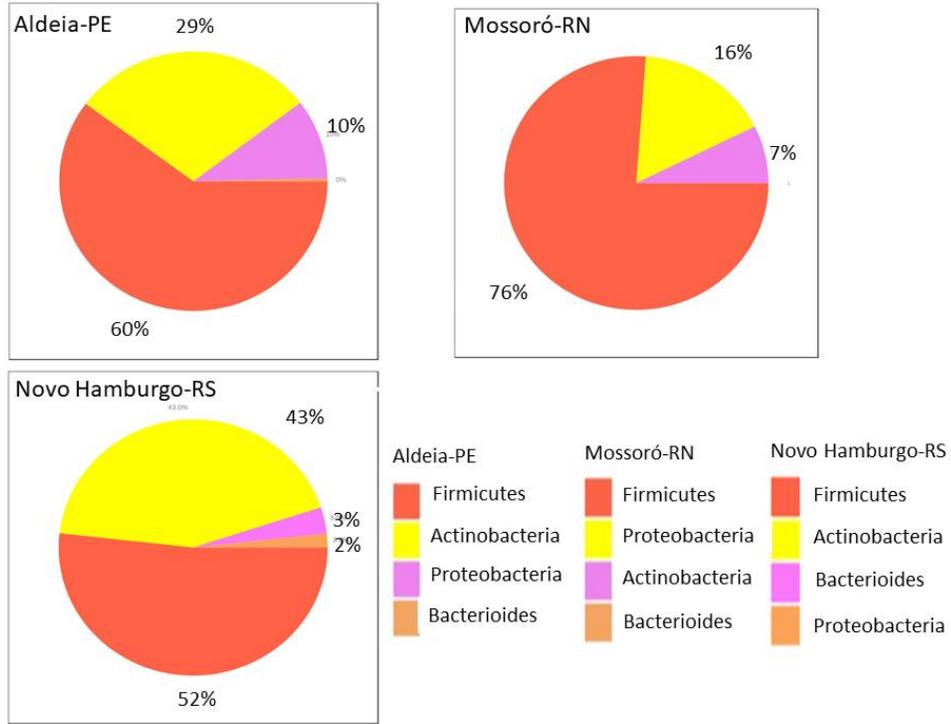


2294 Figura 2. Curva de rarefação, baseada na riqueza de espécies por amostra para as três regiões
2295 incluídas neste estudo.

2296

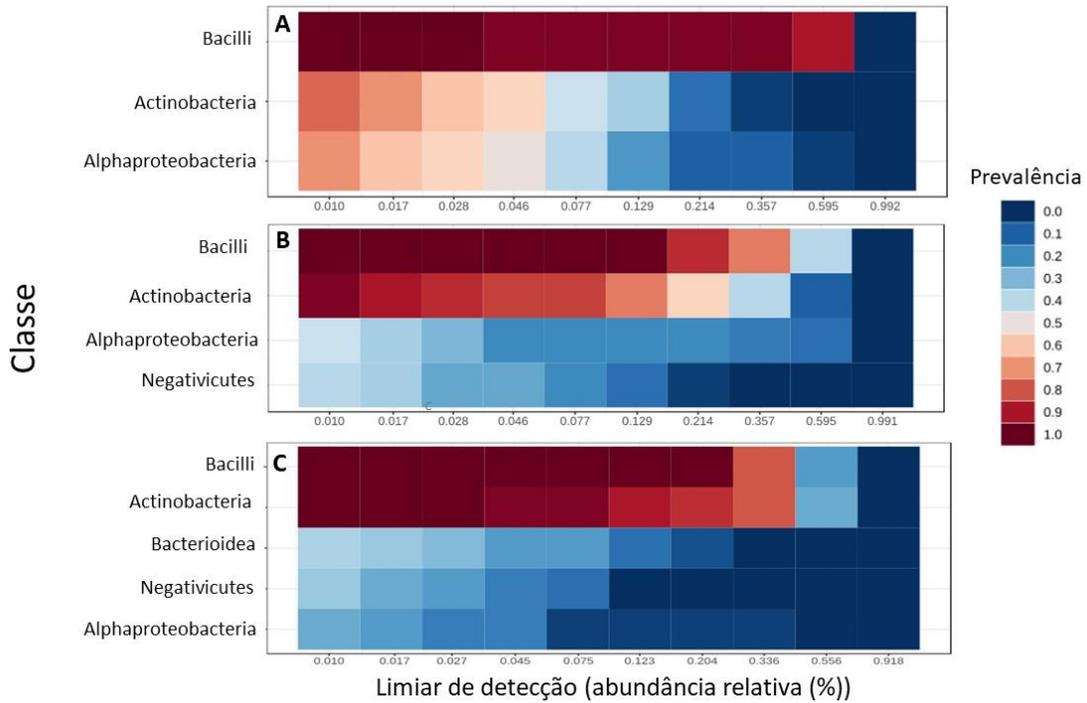
2297

2298



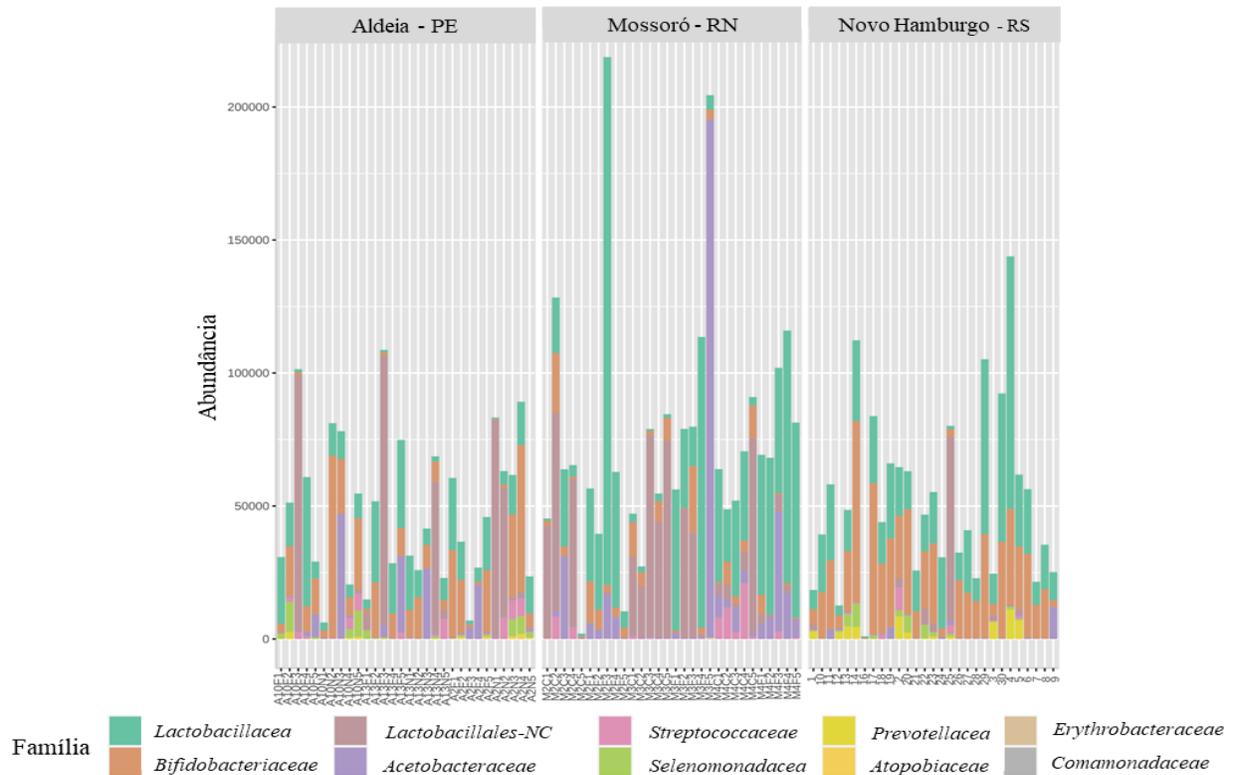
2299
 2300 Figura 3. Proporção dos filos bacterianos dominantes encontrados no sistema digestivo das abelhas
 2301 das colônias amostradas nas cidades de Aldeia-PE, Mossoró-RN e Novo Hamburgo-RS.

2302
 2303



2304 Figura 4. Análise do microbioma central com base na abundância relativa e prevalência de amostra
 2305 de classe bacteriana em (A) Mossoró-RN, (B) Aldeia-PE e (C) Novo Hamburgo-RS.

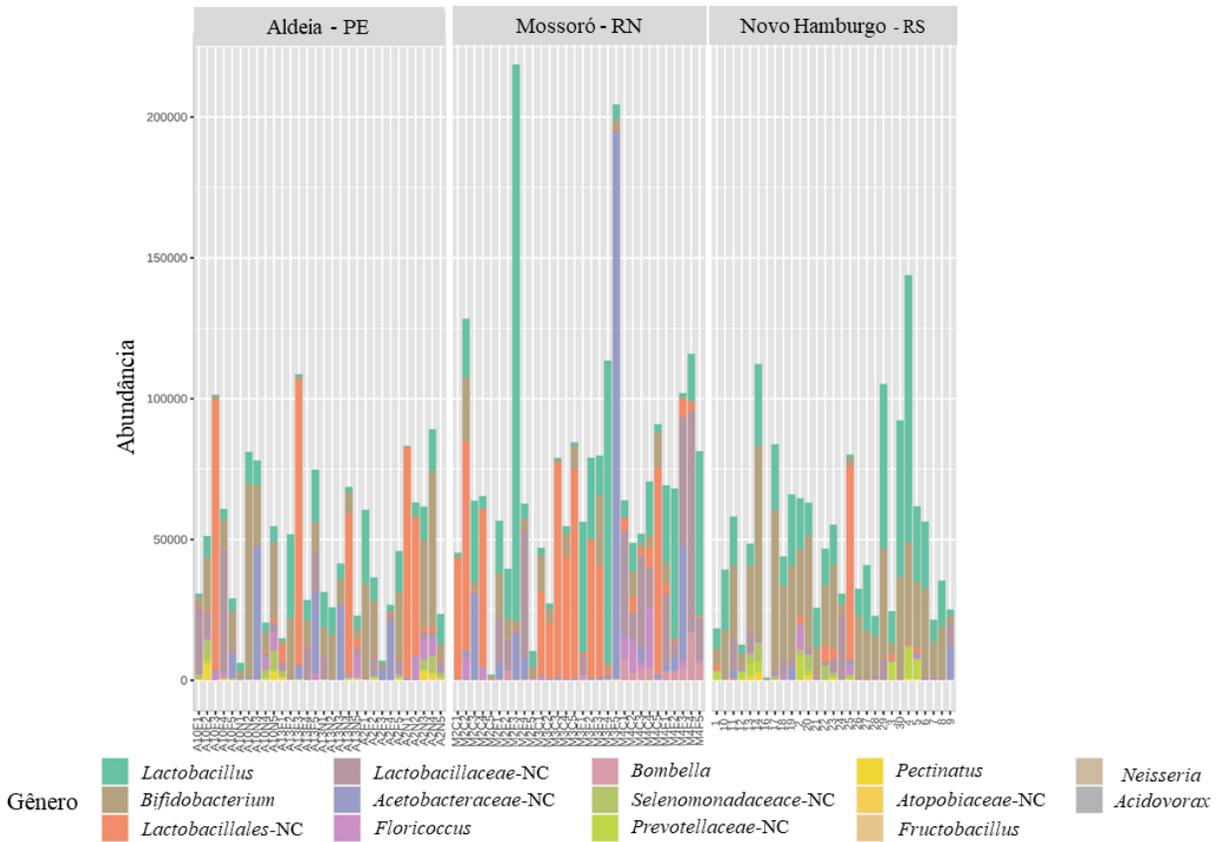
2306



2307 Figura 5. Abundância real das principais famílias bacterianas identificadas no sistema digestivo de
 2308 cada amostra de *Melipona scutellaris* coletadas em três cidades com características fitogeográficas
 2309 diferentes: Camaragibe Aldeia-PE (Floresta Atlântica), Mossoró-RN (Caatinga) e Novo Hamburgo
 2310 (Floresta Atlântica/Pampa).

2311

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.

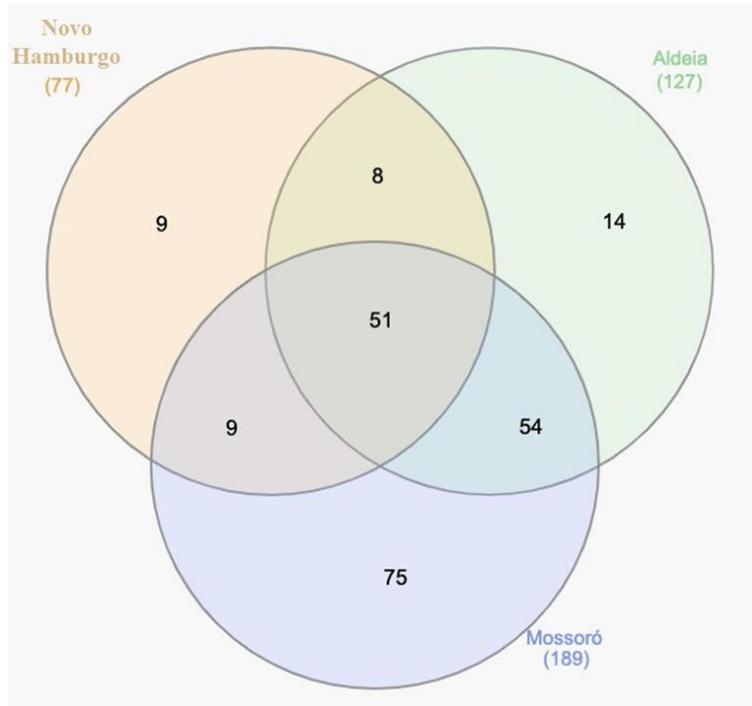
2317

2318

2319

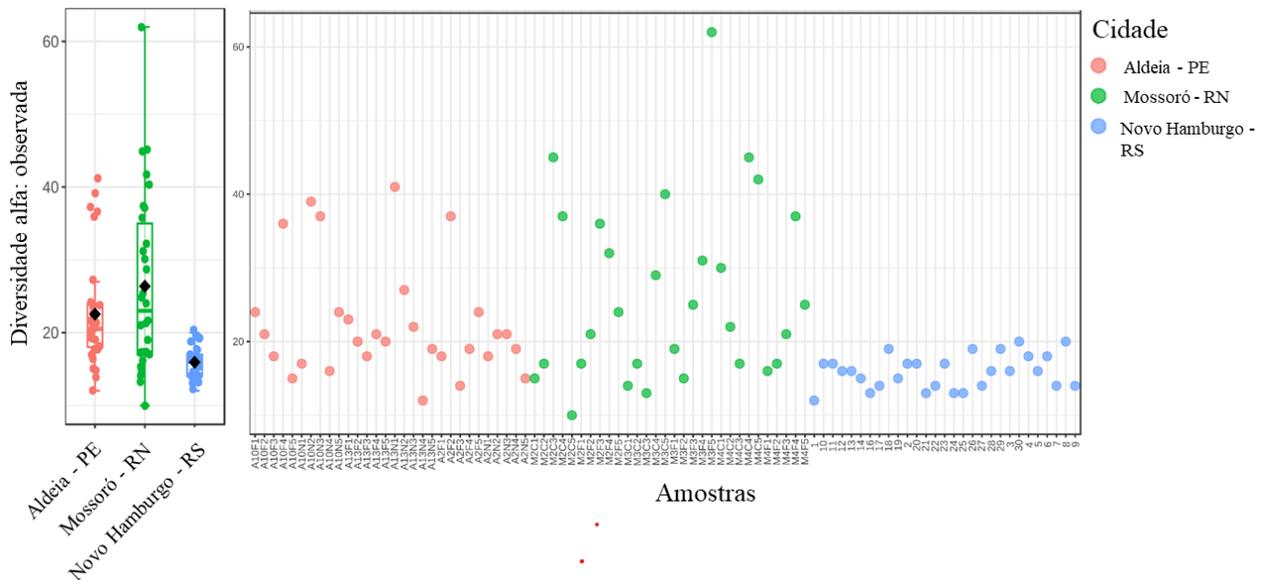
2320

2321



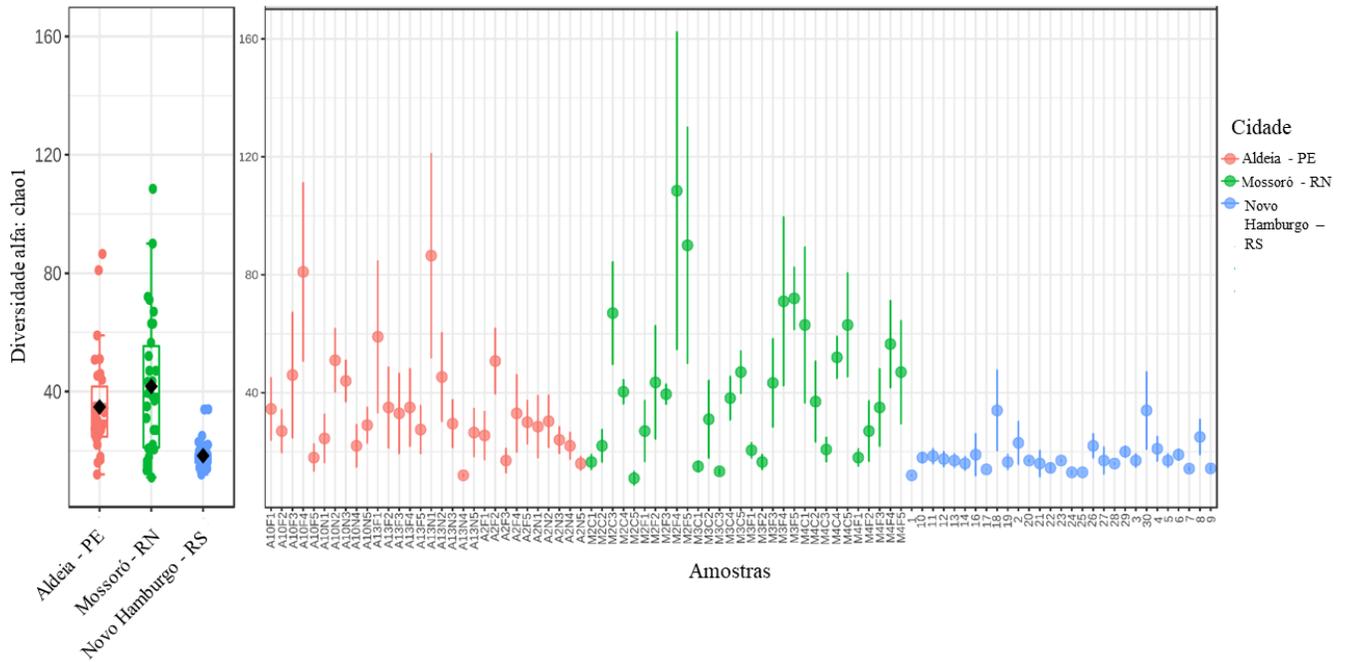
2322 Figura 7. Diagrama de Venn mostrando as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) bacterianas
2323 compartilhadas e únicas entre Mossoró-RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS (OTUs; 97% de
2324 identidade).

2325
2326



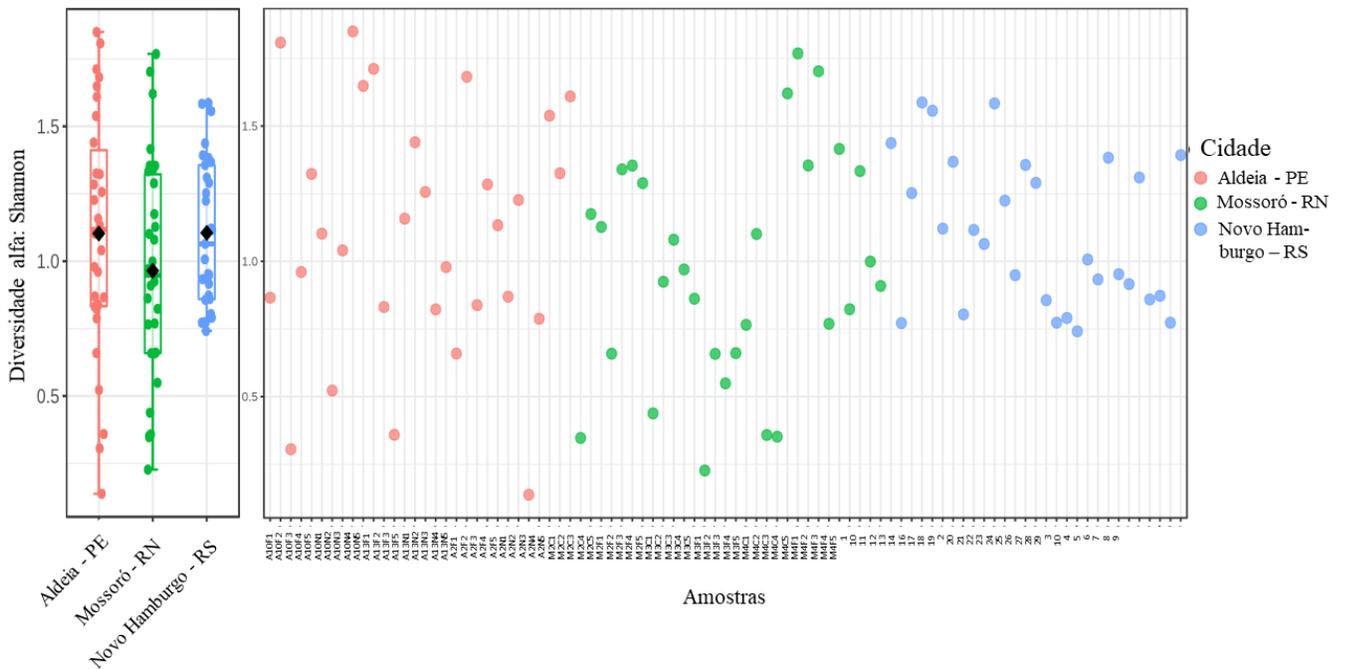
2327 Figura 8. Diversidade alfa avaliada por OTUs observadas (Sobs) de comunidades bacteriana em
2328 relação as ecorregiões.

2329
2330



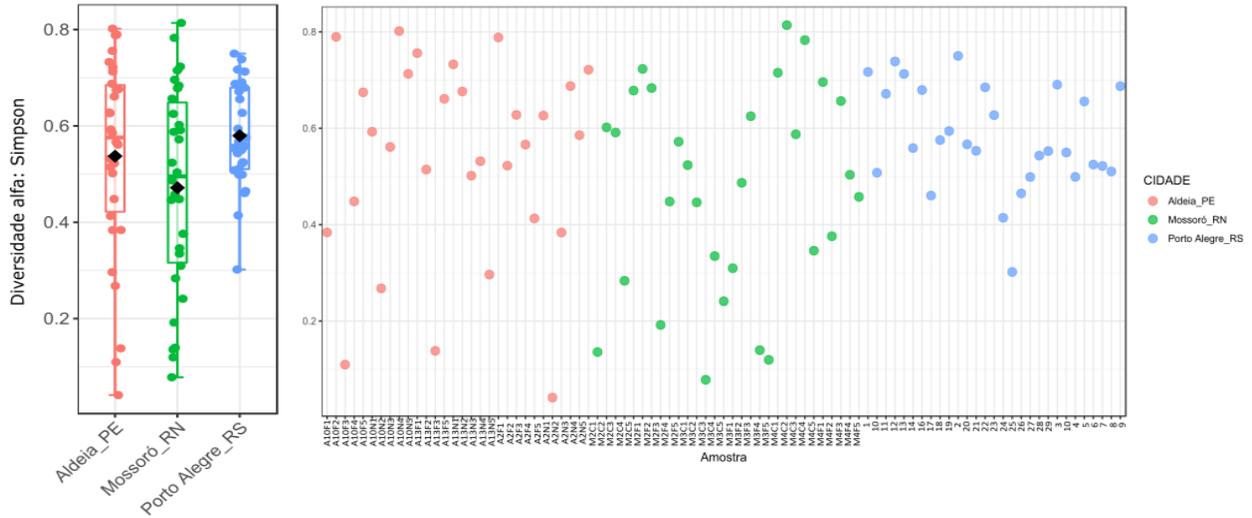
2331 Figura 9. Diversidade alfa avaliada por riqueza (Chao1) de comunidades bacteriana em relação as
2332 ecorregiões.

2333
2334



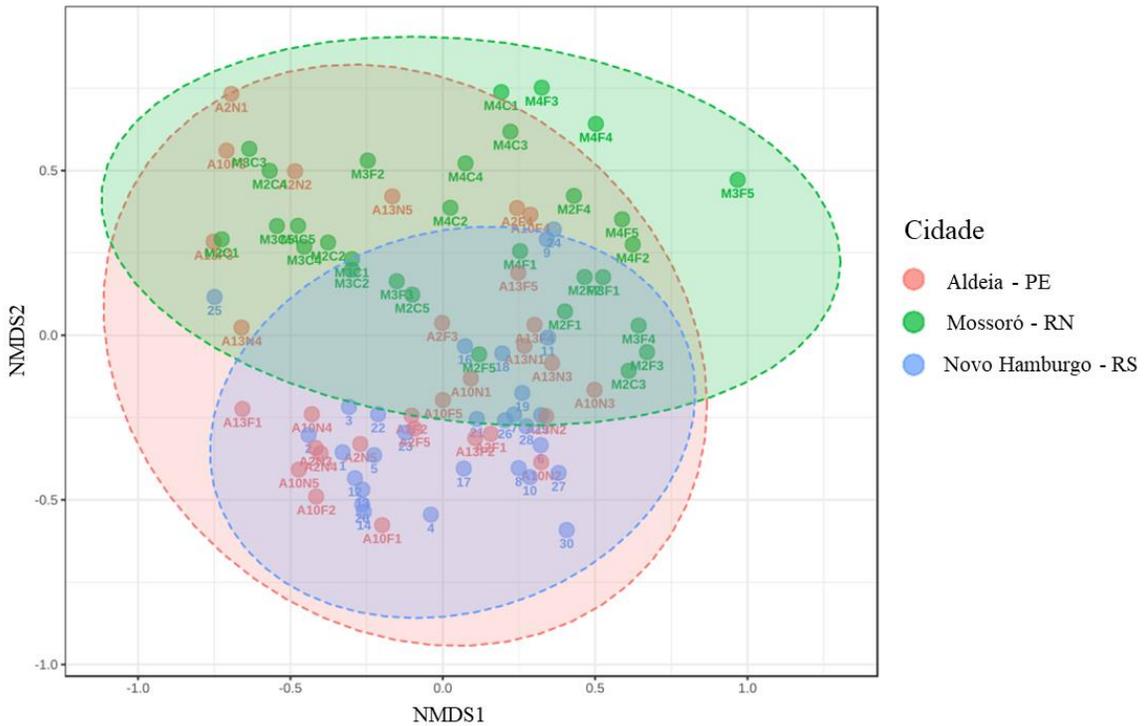
2335 Figura 10. Diversidade alfa avaliada por diversidade (Shannon) de comunidades bacteriana em
2336 relação as ecorregiões.

2337
2338

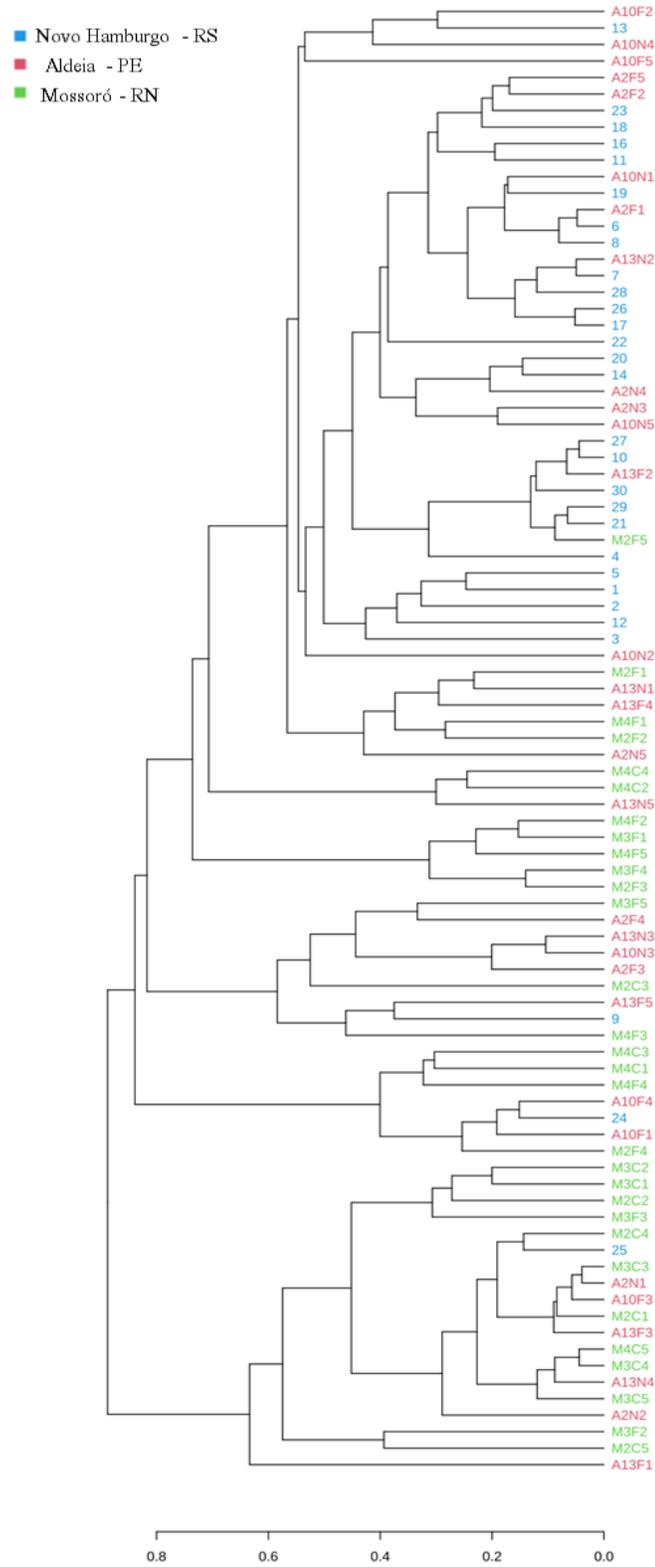


2339 Figura 11. Diversidade alfa avaliada por diversidade (Simpson) de comunidades bacteriana em
2340 relação as ecorregiões.

2341
2342



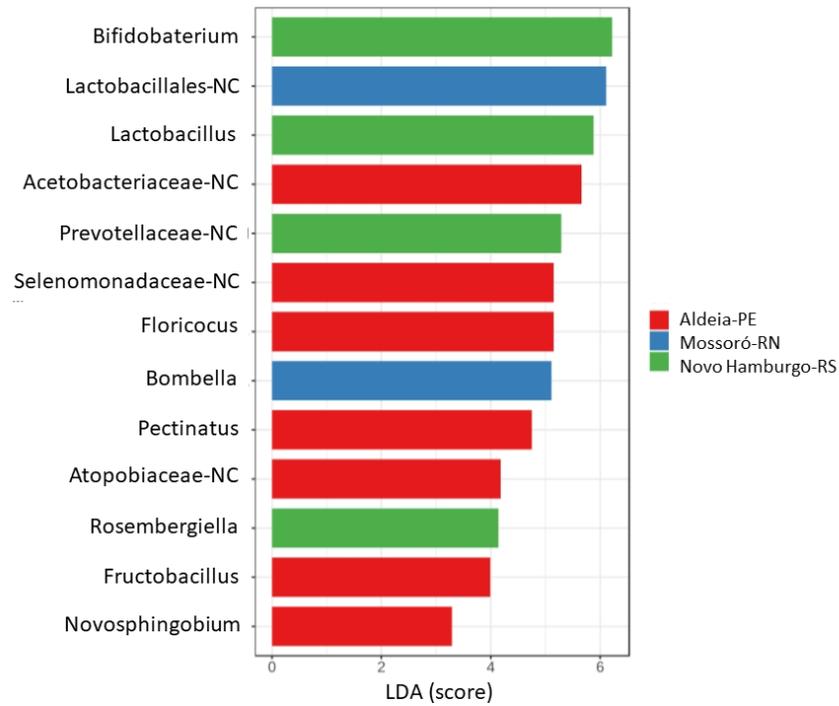
2343 Figura 12. Análise Multivariada (NMDS) utilizando como matriz a distância de dissimilaridade de
2344 Bray-Curtis para as amostras de Mossoró-RN (círculo verde), Novo Hamburgo-RS (círculo azul) e
2345 Aldeia-PE (círculo rosa), valor de Stress= 0.20891



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*) discrimina as OTUs quem tiveram
2351 maior efeito sobre a comunidade bacteriana.

2352

2353

2354

2355

2356

2357

2358

2359

2360

2361

2362

2363

2364
2365
2366
2367
2368
2369
2370
2371
2372
2373
2374
2375
2376
2377
2378
2379
2380
2381
2382
2383
2384
2385
2386
2387
2388
2389

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, Lílian 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 ??

2390 RESUMO - As relações simbióticas entre fungos e diversos insetos são bem conhecidas como é o
2391 caso por exemplo das formigas que cultivam fungos e se alimentam dele. Recentemente, esse
2392 mesmo tipo de relação foi descoberta para uma abelha sem ferrão e um fungo ascomiceto. Os
2393 poucos trabalhos com *Melipona scutellaris* relacionadas a comunidade fúngica são mais restritos
2394 ao mel, pólen e superfície do corpo. A identificação da microbiota do trato digestivo das abelhas é
2395 necessária pois fungos podem beneficiar as abelhas através de função protetora contribuindo com
2396 o estado de saúde combatendo patógenos, participando nos processos de digestão dos alimentos,
2397 assim como ocorre em outros insetos. *M. scutellaris* tem sido translocada para regiões que não são
2398 de ocorrência natural e apresentando uma boa aclimatação a esses locais, o manejo de colmeias para
2399 outras ecorregiões pode implicar em diversos fatores da biologia e saúde desses
2400 meliponíneos, inclusive na mudança da microbiota intestinal, pois muitos fungos são
2401 adquiridos através do ambiente. O objetivo do atual trabalho foi caracterizar a microbiota fúngica
2402 do sistema digestivo de *M. scutellaris* através do metabarcoding do gene ITS e verificar se existe
2403 diferença de riqueza e abundância na microbiota das abelhas coletadas em diferentes ecorregiões,
2404 Aldeia-PE (ocorrência natural) Mossoró-RN e Novo Hamburgo-RS (translocada). Os principais
2405 gêneros identificados nas nossas amostras foram *Starmerella*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*,
2406 *Malassezia*, *Lachancea*, *Aspergillus*, *Sterigmatomyces* e *Meyerozyma*. Os índices de diversidade
2407 não deram diferença significativa ao comparar comunidade fúngica das diferentes ecorregiões,
2408 porém o NMDS mostrou uma dissimilaridade das comunidades.

2409

2410 PALAVRAS-CHAVE: Microbiota, Abelha sem ferrão, Ascomycota, Basidiomycota, Sistema
2411 digestivo.

2412

2413

2414

2415 CHARACTERIZATION OF THE FUNGAL COMMUNITY IN THE GUT OF MELIPONA
2416 SCUTELLARIS FROM THREE ECOREGIONS IN BRAZIL BASED ON METABARCODE
2417 DATA FROM ITS GENE

2418 ABSTRACT – The symbiotic relationships between fungi and various insects are well established,
2419 it is the case for example of ants that grow fungi and feed on it, recently this same type of
2420 relationship was discovered for a stingless bee and an ascomycete fungus. The few works with
2421 *Melipona scutellaris* related to fungal community are more restricted to honey, pollen and body
2422 surface. The identification of the mycobiota of the digestive tract of bees is necessary because fungi
2423 can benefit the bees through a protective function contributing to the health status by fighting
2424 pathogens, participating in the food digestion processes, as it occurs in other insects. *M. scutellaris*
2425 has been translocated to regions that are not naturally occurring and presenting a good acclimation
2426 to these locations, the management of hives to other locations may involve several factors of the
2427 biology and health of these meliponins, including the change of the intestinal mycobiota, because
2428 many fungi are acquired through the environment. The aim of this study was to characterize the
2429 mycobiota of the digestive system of *M. scutellaris* using the ITS gene metabarcode and to verify
2430 if there is a difference in richness and abundance in the microbiota of bees collected in different
2431 locations, Aldeia-PE (natural occurrence) Mossoró-RN and Novo Hamburgo-RS (translocated).
2432 The main genera identified in our samples were *Starmerella*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*,
2433 *Malassezia*, *Lachancea*, *Aspergillus*, *Sterigmatomyces* and *Meyerozyma*. The diversity indices gave
2434 no significant difference when comparing the fungal community of the different sites, but the
2435 NMDS showed a dissimilarity of the communities.

2436

2437 KEY WORDS: Mycobiota, Stingless Bee, Ascomycota, Basidiomycota, Digestive system.

2438

2439

2440
2441
2442

Introdução

2443 As ferramentas de identificação molecular, como forma integrativa e complementar a
2444 taxonomia clássica, se popularizaram no meio científico e têm evoluído durante os anos. O uso do
2445 DNA como código de barras para classificar espécies, vem sendo cada vez mais explorado e tem
2446 ganhado novos recursos para a identificação em larga escala, é o caso da técnica de metabarcodes
2447 que associa o código de barras da vida (*DNA Barcoding*) ao sequenciamento de alto rendimento
2448 (HTS) (Taberlet *et al.* 2012, Hebert *et al.* 2013).

2449 A técnica de metabarcodes tem sido de grande relevância para estudar comunidades
2450 microbianas, principalmente para microrganismos de difícil caracterização morfológica e de
2451 amostras com grande riqueza e diversidade de espécies. Fungos são um dos grupos que se
2452 beneficiam com a técnica, eles representam o terceiro maior grupo de organismos eucarióticos
2453 (Blackwell 2011, Schoch *et al.* 2012, Xu 2016, Hawksworth e Lücking 2018, Vu *et al.* 2019). O
2454 grande número de espécies também reflete em uma grande diversidade morfológica, de vida e
2455 espécies crípticas, que dificulta uma padronização de identificação através da morfologia, biologia
2456 e estruturas reprodutivas, além da falta de especialistas para cada grupo (Drew 2011, Lumbsch &
2457 Leavitt 2011, Xu 2016, Raja *et al.* 2017, Lücking *et al.* 2020).

2458 A associação de fungos com insetos é documentada para diversas espécies, entre as
2459 relações mais conhecidas estão as com formigas, cupins e besouros (Zoberi & Grace 1990, Currie
2460 *et al.* 2001). As abelhas também apresentam uma estreita relação com a comunidade fúngica, muitas
2461 vezes sendo uma relação não benéfica, onde fungos são responsáveis por afetar o estado de saúde
2462 desses insetos, e por outras vezes sendo responsáveis por auxiliar na formação do alimento,
2463 transformação do pólen, fornecendo nutrientes (Gilliam 1972, Gilliam 1979, Cornman *et al.* 2012,
2464 McFrederick *et al.* 2014, Ptaszynska *et al.* 2016, Paludo *et al.* 2018, de Paula *et al.* 2021).

2465 No entanto a comunidade fúngica das abelhas sem ferrão ainda não foi bem caracterizada.
2466 Para o Brasil as poucas informações de micodiversidade para abelhas sem ferrão estão
2467 principalmente relacionadas a presença de fungos em potes de alimento, tanto pólen quanto mel,
2468 ninho, corpo da abelha (Rosa *et al.* 2003, Teixeira *et al.* 2003, Ferraz *et al.* 2008, Gois *et al.* 2010,
2469 Daniel *et al.* 2013, Barbosa *et al.* 2016, Barbosa *et al.* 2017, Tiago 2017, Barbosa *et al.* 2018, Souza
2470 *et al.* 2018).

2471 Estudos com *Scaptotrigona depilis* (Ordem: Família), uma espécie de abelha sem ferrão
2472 brasileira, revelou a importância que bactérias, fungos e outros microrganismos exercem sobre a
2473 biologia destas abelhas, onde estas dependem de interações com uma complexa comunidade de
2474 fungos para completar seu desenvolvimento (Menezes *et al.* 2015, Paludo *et al.* 2018). Dentre as
2475 espécies de fungo identificadas, o fungo *Zygosaccharomyces* sp. cresce dentro das células de cria
2476 de *S. depilis*, junto ao alimento larval, e seus micélios são consumidos pelas larvas, fornecendo às
2477 mesmas um tipo de esterol necessário para síntese de ecdisteróides utilizados na morfogênese
2478 durante o desenvolvimento larval (Paludo *et al.* 2018).

2479 Esse tipo de simbiose, até então desconhecida em qualquer outra espécie de abelhas sem
2480 ferrão (Menezes *et al.* 2015, Paludo *et al.* 2018), expõe o vazio existente nesta área do conhecimento
2481 e confirma a influência que microrganismos exercem em interação com abelhas. Assim como o
2482 entendimento destas relações em *S. depilis*, demais descobertas para outras espécies podem implicar
2483 em informações cruciais para a sobrevivência de diferentes espécies de abelhas sem ferrão. E essas
2484 informações se tornam mais escassas ainda quando se fala da comunidade microbiana que
2485 colonizam o intestino de abelhas e que provavelmente cumpre papéis importantes nesse meio
2486 (Ngalimat *et al.* 2020, de Paula *et al.* 2021).

2487 Nosso modelo de estudo para ampliar as informações relativas à representação de fungos
2488 que colonizam o sistema digestivo de abelhas sem ferrão, foi a espécie *Melipona scutellaris*. Apesar

2489 de ser uma espécie endêmica no Nordeste, devido a atividade de meliponicultores, a translocação
2490 de ninhos para outras regiões do país, acabou aumentando a distribuição de *M. scutellaris* que se
2491 adaptou a regiões como sul e sudeste. Portanto, a micobiota intestinal de abelhas provenientes de
2492 três estados brasileiros serão identificadas e comparadas através do sequenciamento de um
2493 fragmento do gene ITS.

2494
2495
2496
2497
2498

Material e Métodos

Amostras

2499 Indivíduos adultos da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* foram coletados em três
2500 ecorregiões diferentes, Aldeia-PE, Mossoró-RN e Porto Alegre-RS (Figura 1). Para cada local
2501 foram coletadas 10 abelhas de três colmeias diferentes, sendo cinco capturadas com auxílio de pinça
2502 dentro da colmeia, na área de cria e cinco capturadas na entrada da colmeia com auxílio de um
2503 sugador, resultando em 30 amostras por localidade e 90 no total (Tabela 1). As abelhas foram
2504 armazenadas individualmente em eppendorf de 2ml, contendo álcool 70% e logo após alocados em
2505 freezer a -4°C.

2506 As amostras de Aldeia-PE foram coletadas no Meliponário Aldeia que se localiza no
2507 município de Camaragibe, região metropolitana do Recife, Capital do Estado de Pernambuco.
2508 Apresenta 34 colônias manejadas em caixas do tipo nordestina, em uma área seminatural de Floresta
2509 Atlântica com pomar de fruteiras nativas e cultivadas, de aproximadamente 3 hectares. A área
2510 apresenta clima muito úmido, com floresta perenifólia e chuvas ao longo de todo o ano, exceto pelo
2511 curto período de setembro à dezembro, quando a precipitação diminui. É uma área de ocorrência
2512 natural de *M. scutellaris* e ninhos nativos já foram localizados nas proximidades.

2513 Em Mossoró-RN as abelhas foram coletadas em um meliponário urbano, com cerca de 15
2514 colônias manejadas em caixas tipo nordestina translocadas para a região em 2014, provenientes de

2515 Natal – RN e Igarassu - PE. O clima da região é semiárido muito quente com chuvas irregulares
2516 concentradas nos meses de março a abril (Carmo Filho & Oliveira 1989). Na caatinga o manejo da
2517 espécie é intensivo, com alimentação artificial energética de água e açúcar ministrado
2518 quinzenalmente às colônias. Já em Novo Hamburgo-RS, as coletas foram realizadas em ninhos
2519 provenientes de um Meliponário em uma área semiurbana com elementos de floresta mista (Floresta
2520 Atlântica com elementos de Floresta de Araucárias) (IBGE 2012). Caixas do tipo INPA manejas
2521 intensivamente com alimentação energética e com aquecimento artificial durante o inverno foram
2522 selecionadas. O clima da região é subtropical com chuvas de inverno. A área do Meliponário
2523 apresenta vegetação nativa com elementos cultivados, especialmente *Eucaliptus* e árvores
2524 ornamentais.

2525 **Extração de DNA**

2526 O DNA genômico total foi extraído do sistema digestivo completo de cada uma das abelhas
2527 separadamente. Para isso as abelhas foram dissecadas em placas de petri contendo solução salina
2528 tampão de fosfato estéril (PBS). Logo após a dissecação o sistema digestivo foi colocado em
2529 Eppendorf de 2ml para seguir com a extração de DNA. O DNA gnômico total foi extraído utilizado
2530 o PureLink® Genomic DNA Mini Kit K182002 conforme instruções do fabricante. E após a
2531 extração o DNA foi armazenado em freezer -4°C.

2532 **Metabarcode de bactérias e fungos**

2533 Para o segmento correspondente a região de ITS2 dos fungos foram amplificadas com
2534 iniciadores ITS3_KYO (5'-GATGAAGAACGYAGYRAA-3') e ITS4 (5'-
2535 TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Toju *et al.* 2012). Os primers foram sintetizados com
2536 etiquetas (tags) de 8 nucleotídeos em ambas as extremidades para distinguir as amostras (HONG *et*
2537 *al.*, 2016) e serem agrupadas antes de construir as bibliotecas de sequenciamento para o
2538 metabarcode.

2539 Os ciclos de termociclagem foram realizados segundo Toju *et al.* (2012) para ITS. A
2540 amplificação dos fragmentos de DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, através
2541 de luz UV para confirmação da amplificação e verificar contaminantes nas amostras de controle
2542 negativo. Foi realizada também a quantificação de cada amostra utilizando o Nanodrop Lite.

2543 **Sequenciamento do metabarcodes**

2544 Para o sequenciamento, juntamos 5µl de cada amostra ajustada a uma concentração de
2545 4ng/µl em um tubo para os amplicons de ITS. A partir dessa mistura (“pool”) foi realizada uma
2546 segunda diluição para uma concentração final de 2 ng/µl, que foram utilizadas na preparação das
2547 bibliotecas usando o kit Truseq Nano DNA LT Library Prep. O Protocolo de preparação da
2548 biblioteca foi iniciada na etapa de Limpeza de Fragmento (Clean Up Fragmented DNA) e todos os
2549 passos posteriores realizados segundo o fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas usando a
2550 tecnologia MiSeq da Illumina, usando Reagente kit V3 que produziu leituras de extremidades
2551 emparelhadas em ciclo de 2 X 300. O sequenciamento foi realizado no Laboratório de
2552 Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE) da Universidade Federal de Pernambuco.

2553 **Análise, filtragem, agrupamento e taxonomia das sequências**

2554 A priori, as plataformas de tratamento de bioinformática dos dados metabarcodes eram
2555 direcionados quase sempre para o gene 16S rRNA, como RDP (Cole *et al.* 2009); MOTHUR
2556 (Schloss *et al.* 2009); QIIME (Caporaso *et al.* 2010); PANGEA (Giongo *et al.* 2010); WATERS
2557 (Hartman *et al.* 2010); CANGS (Pandey *et al.* 2010), com a finalidade de identificar bactérias,
2558 evidenciando assim a pouca visibilidade dada a comunidade de fungos. Apesar disso, alguns desses
2559 programas, como Mothur e QIIME que processam dados fúngicos de ITS, podem apresentar vieses
2560 nas análises devido à falta de especificidade do programa para analisar dados com as características
2561 desse gene (Bengtsson-Palme *et al.* 2013).

2562 Tendo em vista esses fatores para analisar nossos dados, usamos a plataforma Lotus2 que
2563 foi projetada pensando em ambos os genes 16S e ITS (Hildebrand *et al.* 2014). As sequências brutas
2564 passaram primeiro por um processo de análise no FastQC para verificar a qualidade, e a presença
2565 de adaptadores, que foram removidos usando o Cutadapt para posterior análise utilizando o Lotus2.

2566 Em uma única linha de comando os parâmetros trabalhados foram adicionados assim como
2567 o caminho para os arquivos de entrada necessários. Os parâmetros não especificados na linha de
2568 comando, foram predefinidos pelo próprio programa. Para nossa linha de comando foram
2569 fornecidos os arquivos com as sequências forward e reverse em formato fastaq; um arquivo de mapa
2570 contendo informações com o nome das amostras, sequências barcodes, iniciadores e o nome dos
2571 arquivos fastq. Para o processo de demultiplex e filtragem de qualidade a plataforma usa o SDM,
2572 um software autônomo integrado ao Lotus2. Os comandos que indicamos nesta etapa foram -
2573 `s|sdmopt <sdm_miSeq_ITS>` com a configuração de `minSeqLength 130 maxSeqLength 1000`
2574 `minAvgQuality 27`.

2575 As leituras também foram submetidas ao ITSx (Bengtsson-Palme *et al.* 2013) para extrair
2576 as sub-regiões ITS1 e ITS2 altamente variáveis das sequências. Durante o sequenciamento, as
2577 regiões dos genes ribossômicos variáveis (ITS1 e ITS2) e regiões conservadas (SSU, 5S e LSU)
2578 são sequenciadas, essas regiões conservadas podem levar a resultados enganosos no processo de
2579 identificação das sequências, para eliminar esse erro o ITSx identifica e extrai apenas as próprias
2580 regiões ITS para serem usadas nas etapas seguintes (Bengtsson-Palme *et al.* 2013).

2581 As opções de agrupamento de sequências foram realizadas usando UPARSE (Edgar 2013),
2582 que agrupa as sequências em OTUs (Unidade Taxonômica Operacional). O banco de dados usando
2583 como referência para taxonomia foi UNITEv8_sh_dynamic_all (Kõljalg *et al.* 2013) e para o
2584 alinhamento das sequências com bancos RDP (Martin & Rybicki 2000).

2585 **Análises abundância, diversidades e multivariadas**

2586 O Lotus2 gerou arquivos de saída que foram usados para processamento dos dados no pacote
2587 Phyloseq no software R (versão 4.1.1). Com o pacote Phyloseq medimos a riqueza usando o número
2588 de espécies observadas (Sobs), Chao1 e a diversidade usando InvSimpson, para os três índices as
2589 diferenças de grupo nesses índices foram testadas usando uma análise de variância (ANOVA). Foi
2590 possível também fazer a análise multivariada NMDS (escalonamento multidimensional não
2591 métrico) usando a matriz de distância de Bray-Curtis leva em consideração a presença / ausência
2592 das espécies, bem como a abundância. Todas essas análises foram usadas para comparar as
2593 comunidades fúngicas de Mossoró-RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS, através do número de
2594 gêneros identificados, abundância desses, e escalonamento das amostras.

2595

2596

Resultados

2597 De um total de 11.485.922; 11.485.922 (par 1; par 2) de leituras processadas, foram aceitas
2598 3.926.367; 5.305.655 com alta qualidade e leituras com qualidade média 37.895; 900.309, sendo um
2599 total de 81.529 sequências únicas. O comprimento médio da sequência foi de 272 pb. ITSx descartou
2600 853 OTUs e após a filtragem 423 OTUs foram mantidas e identificadas.

2601 Das 423 OTUs geradas pelo Lotus2, 128 são compartilhadas entre as amostras de Mossoró-
2602 RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS. Aldeia-PE apresenta a maior quantidade de OTUs exclusivas
2603 (58) e é o local que mais compartilha OTUs com as outras duas ecorregiões, sendo 35 OTUs com
2604 Mossoró-RN e 38 OTUs com Novo Hamburgo-RS (Figura 2).

2605 Das 90 amostras analisadas, três foram descartadas da análise após sequenciamento (ITS 102,
2606 ITS 104 e ITS 109) todas de Novo Hamburgo-RN, pois não tiveram sequências de boa qualidade
2607 para serem analisadas.

2608 Os filós identificados foram restritos a Basidiomycota e Ascomycota. Dentre as famílias mais
2609 abundantes estão Saccharomycetaceae, Malasseziaceae, Aspergillaceae, Botryosphaeriaceae e

2610 Debaryomycetaceae (Figuras 3). Em Mossoró-RN as amostras foram dominadas principalmente por
2611 Saccharomycetaceae, em Aldeia-PE a família dominante foi Malasseziaceae, já para Novo
2612 Hamburgo as famílias Saccharomycetaceae, Malasseziaceae e Aspergillaceae tiveram sua
2613 abundância bem equiparadas (Figuras 3).

2614 Um total de 68 gêneros e 92 espécies foram identificadas (Tabela 2). Porém 123 OTUs não
2615 chegaram a serem classificados nem a nível de ordem. A abundância dos oito gêneros mais
2616 representativos (*Starmerella*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Malassezia*, *Lachancea*, *Aspergillus*,
2617 *Sterigmatomyces* e *Meyerozyma*) apresentaram uma variação entre as ecorregiões amostradas
2618 (Figura 3). O gênero *Candida* estava entre os mais abundantes nas três ecorregiões, sendo que para
2619 Novo Hamburgo-RS era o mais abundante. Mossoró-RN apresentou maior abundância para
2620 *Zygosaccharomyces* e em Aldeia-PE, *Malassezia* teve maior abundância (Figura 4).

2621 Os índices Sobs ($p = 0.7633$), Chao1 ($p = 0.2484$), e InvSimpson ($p = 0.07569$) não
2622 apresentaram diferença significativa (Figura 5). A análise multivariada NMDS mostrou que a
2623 comunidade fúngica das amostras coletadas em Mossoró-RN foram as que mais destoaram na
2624 ordenação com base na distância de Bray-Curtis, indicando uma maior dissimilaridade na sua
2625 composição quando comparada com amostras de Novo Hamburgo-RS e Aldeia-PE e assim não se
2626 sobrepondo a essas (Figura 6). Porém é possível observar também que algumas amostras de Novo
2627 Hamburgo-RS estão bem distantes das outras ecorregiões indicando uma maior dissimilaridade entre
2628 elas e outras amostras estão ordenadas mais próximas indicando uma maior similaridade com
2629 Aldeira-PE, (Figura 6).

2630

2631

Discussão

2632 Fungos e insetos apresentam diversas interações conhecidas, incluindo a associação com o
2633 sistema digestivo, esse mutualismo envolve a fermentação, produção de compostos essenciais para

2634 a nutrição e desenvolvimento de insetos, proteção contra patógenos e por sua vez, as abelhas servem
2635 de vetores de fungos entre as plantas (Rosa *et al.* 2003, Paludo *et al.* 2018, Rothman *et al.* 2019,
2636 Costa Neto & Morais 2020, Malassigné *et al.* 2021). Os dados sobre a interação entre abelhas sem
2637 ferrão e fungos ainda são limitados.

2638 Os filos Basidiomycota e Ascomycota foram os únicos filos encontrados e parecem ser
2639 unânimes nas abelhas, seja no intestino, mel ou pão de abelhas (Bosmans *et al.* 2018, Ludvigsen *et*
2640 *al.* 2020, Silva de Souza *et al.* 2020), incluindo também abelhas sem ferrão (Rosa *et al.* 2003, Ferraz
2641 *et al.* 2008, Barbosa *et al.* 2016, Souza *et al.* 2018).

2642 Dentre as famílias mais abundantes encontradas nesse estudo Saccharomycetaceae,
2643 Malasseziaceae, Aspergillaceae, Botryosphaeriaceae e Debaryomycetaceae temos diversos gêneros
2644 e espécies associados a abelhas melíferas, abelhas solitárias e outras abelhas sem ferrão, Villegas-
2645 Plaza *et al.* (2018) catalogou mais de 29 espécies de 13 gêneros de fungos que tem sido
2646 frequentemente associada a abelhas sem ferrão, dentre esses fungos identificados no atual trabalho
2647 alguns como os gêneros *Pichia*, *Papiliotrema*, *Starmerella*, *Candida*, *Zygosaccharomyces* e
2648 *Aureobasidium*.

2649 O gênero *Zygosaccharomyces* foi o mais abundante nas amostras de Mossoró-RN e menos
2650 abundante em Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS. Yun *et al.* (2018) e Ludvigsen *et al.* (2020)
2651 encontraram *Zygosaccharomyces* dominando o trato digestivo de rainhas de *Apis mellifera*, mas não
2652 das trabalhadoras. Liu *et al.* (2021) e Brysch-Herzberg (2004) também identificaram no intestino de
2653 *Austroplebeia australis* e *Bombus* respectivamente. Esse mesmo gênero foi identificado em outros
2654 trabalhos em detritos intestinais de *Tetragonisca angustula* (Rosa & Lachance 2005), em mel de *A.*
2655 *mellifera* (Saksinchai *et al.* 2021) e associado ao processo de fermentação do mel em *Apis ceranae*
2656 (Chikano & Takanhashi 2020).

2657 No Brasil, identificou-se uma simbiose entre a abelha meliponini *Scaptotrigona depilis* e um
2658 fungos do gênero *Zygosaccharomyces*, as abelhas aparentemente cultivam o fungo que cresce
2659 internamente à célula de cria e as larvas se alimentam desse fungo que fornece precursores de
2660 esteróides que são essenciais durante o seu desenvolvimento e metamorfose. Por sua vez, as abelhas
2661 perpetuam o fungo, transmitindo-o para outras gerações por meio de materiais de construção
2662 contaminados com esporos (Menzes *et al.* 2015, Paludo *et al.* 2018, Paludo *et al.* 2019).O fato de
2663 encontrarmos *Zygosaccharomyces* no intestino de nossas abelhas e de ter sido encontrado também
2664 em detritos intestinais de outra abelha sem ferrão (Rosa & Lachance 2005), podem ser indícios que
2665 essa simbiose seja estendida a outras abelhas e não só a *S. depilis*, sendo as abelhas beneficiadas no
2666 seu desenvolvimento e atuando como propagadora desse fungo.

2667 O gênero mais abundante identificado no nosso estudo e que teve abundância bem próxima
2668 entre as amostra de Mossoró-RN, Aldeia-PE e Novo Hamburgo-RS, apresenta uma relação com o
2669 processo de simbiose entre *S. depilis* e *Zygosaccharomyces sp.*, o gênero *Candida*, que também foi
2670 isolado em células de cria de *S. depilis* e em estudos *in vitro* produziu compostos orgânicos voláteis
2671 que estimulam o desenvolvimento de *Zygosacchromyces sp.* (Paludo *et al.* 2019). Apesar de *Candida*
2672 ter sido isolado por Paludo *et al.* (2019) em provisões de cria, outros estudos encontraram, assim
2673 como no nosso esse gênero no sistema digestivo de abelhas, em *A. melífera* foi um dos gêneros mais
2674 abundantes em abelhas forrageiras (Yun *et al.* 2018), Brysch-Herzberg (2004) e Silva de Souza *et*
2675 *al.* (2020) identificaram também no trato digestivo de *Bombus* e *Melipona seminigra*
2676 respectivamente. *Candida* também parece estar envolvida na digestão de substratos, secreção de
2677 enzimas na desintoxicação de metabólitos vegetais tóxicos e foram isoladas em abelhas alimentadas
2678 com herbicida e antibióticos (Gilliam *et al.* 1974, Vega & Dowd 2005).

2679 O gênero *Candida* parece estar intimamente relacionado com o gênero *Starmerella*,
2680 levantando até dúvidas se seriam a mesma espécie e sendo usadas como sinônimos (Rosa &

2681 Lachance 1998, Pimentel *et al.* 2005, Santos *et al.* 2018). Diferente dos nossos resultados Cerqueira
2682 *et al.* 2020 identificou o gênero *Starmerella* em todas as amostras de *Melipona*. Identificamos cinco
2683 OTUs para o gênero, sendo que três não foram classificadas a nível de espécie e as outras duas
2684 correspondiam às espécies *Starmerella bombicola* e *Starmerella meliponinorum*.

2685 A interação entre abelhas sem ferrão e o gênero parece ser bem estabelecida, já que é
2686 frequentemente isolada nessas abelhas, incluindo no trato digestivo (Rosa *et al.* 2003, Teixeira *et*
2687 *al.* 2003; Daniel *et al.* 2013, Villegas-Plaza *et al.* 2018, Costa Neto & Morais 2020, Cerqueira *et al.*
2688 2021, Echeverrigaray *et al.* 2021) e isolada em flores (Rosa & Lachance 1998, Santos *et al.* 2018).

2689 O gênero é considerado um fungo frutofílico, ou seja, tem preferência por frutose em vez
2690 de glicose participando do processo de fermentação e essa é uma condição considerada rara para
2691 fungos. Várias espécies de *Starmerella* são conhecidas por produzirem soforolipídios indicando
2692 que esses fungos podem estar relacionados com a nutrição das abelhas, já que os grãos de pólen são
2693 revestidos por uma membrana rica em lipídios e hidrocarbonetos, e os soforolipídios das leveduras
2694 podem interagir com esse pólen por serem glicolipídios surfactantes, reduzindo assim a tensão
2695 superficial com o pólen e participando do processo de fermentação (Kurtzman *et al.* 2010, Pacini
2696 *et al.* 2005, Detry *et al.* 2020, Gonçalves *et al.* 2020).

2697 *Malassezia* foi o gênero com maior abundância dentre as amostras de Aldeia-PE, seguido
2698 por Novo Hamburgo-RN e com baixa abundância em Mossoró-RN. Identificamos nas nossas
2699 amostras duas espécies *Malassezia globosa* e *Malassezia restricta*. Essas duas espécies foram
2700 identificadas no intestino de *T. carbonaria* e *A. australis* entre as seis OTUs mais abundantes e no
2701 de *A. mellifera* (Ludvigsen *et al.* 2020, Liu *et al.* 2021), esse mesmo gênero também foi identificado
2702 colonizando o intestino de *Aedes albopictus* e utiliza ativamente a frutose adquirida pelo mosquito
2703 ao se alimentar de plantas como fonte de energia (Guégan *et al.* 2020a,b). *Malassezia* e as duas
2704 espécies identificadas no nosso trabalho foram identificadas em outros trabalhos estando associadas

2705 a borboletas, mosca das frutas e plantas (Harrison *et al.* 2016, Malacrinò *et al.* 2017, Qian *et al.*
2706 2021).

2707 Curiosamente esse gênero está intimamente associado ao homem causando doenças de pele
2708 como caspa e eczema (Ashbee *et al.* 2007, Cabañes 2014), sendo assim não é possível descartar
2709 contaminação de amostras. Apesar dessa possibilidade não podemos descartas os achados dos
2710 trabalhos citados acima, o que nos faz pensar que existe sim uma relação das abelhas com
2711 *Malassezia* e que merece atenção, já que em nossos estudos é um dos gêneros mais abundantes e
2712 identificado em amostras das três ecorregiões em que as abelhas foram coletadas.

2713 *Aspergillus* também apresentou abundância diferenciada para as três ecorregiões
2714 amostradas, em Mossoró-RN foi o menos abundante dentre os oito gêneros mais abundantes. Esse
2715 gênero é identificado recorrentemente em amostras de mel, ninho, trato digestivo e principalmente
2716 em pólen processado das abelhas melíferas (Gilliam & Prest 1972, Gilliam *et al.* 1977, Gilliam *et*
2717 *al.* 1989, Disayathanoowat *et al.* 2020), já em abelhas sem ferrão *Aspergillus* foi isolado em
2718 *Melipona subnitida* (corpo), *M. scutellaris* (mel), *Trigona* (corpo), *M. seminigra* (trato digestivo)
2719 (Stuart *et al.* 2004, Ferraz *et al.* 2008, Gois *et al.* 2010, Souza *et al.* 2018, Silva de Souza *et al.*
2720 2020). No nosso estudo, três OTUs corresponderam às seguintes espécies: *Aspergillus niger*,
2721 *Aspergillus penicillioides* e *Aspergillus ruber*; e outras oito não foram classificadas em espécie.

2722 Apesar do gênero *Aspergillus* estar associada a diferentes espécies de abelhas, vale ressaltar
2723 que o gênero é composto por algumas espécies comprovadamente patogênicas, inclusive para *A.*
2724 *mellifera* causando uma doença chamada “Stonebrood” (cria pedra), sendo algumas espécies mais
2725 virulentas que outras (Foley *et al.* 2014). O acometimento das colônias por *Aspergillus* não é
2726 frequente, sendo considerado um patógeno oportunista, facultativo e de alta virulência ao se
2727 manifestar (Vojvodic *et al.* 2011). A principal espécie associada a doença é *Aspergillus flavus*, essa

2728 espécie não foi identificada nos nossos estudos, porém, *Aspergillus niger* estava presente nas
2729 nossas amostras, que ocasionalmente é agente etiológico de “Stonebrood” (Foley *et al.* 2014).

2730 Entre os oito gêneros mais abundantes para todas nossas amostras, *Sterigmatomyces* e
2731 *Lachancea* não estavam entre as mais abundantes em Mossoró-RN e Aldeia-PE respectivamente.
2732 Diversas OTUs foram compartilhadas entre as amostras das três ecorregiões e outras eram
2733 compartilhadas entre duas ou encontrada exclusivamente em uma única localidade, mesmo assim
2734 ao comparar a comunidade fúngica das ecorregiões as análises de diversidade alfa (OTUs
2735 observadas, Chao1 e InvSimpson) não apresentaram diferença significativa.

2736 No entanto, nosso NMDS mostrou que as amostras de Mossoró-RN formam um agrupamento
2737 que não se sobrepõem a Novo Hamburgo-RS, apresentando dissimilaridade na comunidade
2738 microbiana entre essas ecorregiões, e a maior similaridade está entre as amostras de Aldeia-PE e
2739 Novo Hamburgo-RN tendo várias amostras agrupadas próximas umas das outras, mesmo assim as
2740 oriundas de Novo Hamburgo-RS apresentam-se bem distanciadas das amostras de Aldeia-PE. A
2741 análise de NMDS é uma forma de condensar informações de dados multidimensionais (múltiplas
2742 variáveis/espécies/OTUs) em uma representação ou ordenação. Quanto mais próximas as amostras
2743 (pontos) estiverem no espaço de ordenação, mais semelhantes serão suas comunidades microbianas.

2744 Ainda não temos trabalhos comparando a diversidade de fungos para o sistema digestivo de
2745 uma mesma espécie de abelhas em diferentes ecorregiões especialmente com características de
2746 clima e vegetação tão distintos e com abelhas translocadas para regiões fora da sua distribuição
2747 natural como no nosso trabalho. Além de amostras de local nativo em um remanescente de Mata
2748 Atlântica e temperatura amena com curto período de seca, e dois locais que foram translocadas um
2749 no Sul do Brasil com temperaturas mais baixas e uma vegetação mista de dois tipos de Mata
2750 Atlântica e outro extremo na Caatinga com temperaturas elevadas durante quase o ano todo e pouca
2751 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 & Morais 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

2776 desses insetos é o conhecimento da microbiota fúngica, a qual pode causar enfermidade a esses
2777 organismos e apresentar novos fatos para entender aspectos biológicos. A partir desse estudo foi
2778 possível acrescentar informações importantes para a comunidade fúngica de *M. scutellaris*, pois
2779 observamos uma diferença na composição dessas abelhas coletadas em diferentes ecorregiões do
2780 Brasil, identificamos fungos que *Pichia*, *Starmerella*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Aspergillus* e
2781 *Aureobasidium* associadas a outras espécies de abelhas sem ferrão.

2782 Entender a riqueza e diversidade de fungos encontrados nas diferentes ecorregiões de coleta
2783 é um desafio devido às poucas informações que temos. Estudos relacionados a geografia e o manejo
2784 de *M. scutellaris* merecem um destaque, por ser de relevante importância para a sociedade e
2785 apresentar manejo dessas colmeias para fora da sua área de ocorrência natural, já que fungos
2786 comuns a outras espécies de abelhas podem ser adquiridos através do contato com as flores
2787 contaminadas por esses fungos. É importante saber como esses processos afetam as abelhas e sua
2788 comunidade fúngica para o manejo adequado e conservação da espécie.

2790 **Agradecimentos**

2791 Agradeço a CAPES pela concessão da Bolsa, ao programa de Pós-graduação em Entomologia da
2792 Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Laboratório de Bioinformática e Biologia
2793 Evolutiva. Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, à Associação A.B.E.L.H.A e ao Instituto
2794 Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA pelo financiamento do
2795 projeto, Edital CNPq/ABELHA/IBAMA – 400597/2018-7; Licença de coleta SISBIO - 67393-1;
2796 SISGEN Cadastro nº A1B8F1F.

2798 **Literatura Citada**

2799 **Ashbee, H.R. 2007.** Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol* 45: 287–303.
2800
2801
2802

- 2803 **Bäckhed, F., R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson & J.I. Gordon. 2005.** Host-bacterial
2804 mutualism in the human intestine. *Science*. 25: 1915-1920.
2805
- 2806 **Bajaj, J.S., D.M. Heuman, P.B. Hylemon, A.J. Sanyal, M.B. White, P. Monteith, N.A. Noble,**
2807 **A.B. Unser, K. Daita, A.R. Fisher, M. Sikaroodi & P.M. Gillevet. 2014.** Altered profile
2808 of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J Hepatol*. 60:
2809 940-947.
2810
- 2811 **Barbosa, R.N., J. Bezerra, C.S. Motta, B.S. Gomes, C. Costa & H. Melo. 2016.** Prospection on
2812 yeasts from stingless bees honey in brazilian tropical dry forest (Caatinga). *Gaia Scientia*
2813 10: 151-159.
2814
- 2815 **Bengtsson-Palme, J., M. Ryberg, M. Hartmann, S. Branco, Z. Wang, A. Godhe, P. De Wit, M.**
2816 **Sanchez-Garcia, I. Ebersberger, F. de Sousa, A.S. Amend, A. Jumpponen, M.**
2817 **Unterseher, E. Kristiansson, K. Abarenkov, Y.J.K. Bertrand, K. Sanli, K.M. Eriksson,**
2818 **U. Vik, V. Veldre & R.H. Nilsson. 2013.** Improved software detection and extraction of
2819 ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of
2820 environmental sequencing data. *Methods Ecol Evol*. 4: 914–919.
2821
- 2822 **Bovo, S., A. Ribani, V.J. Utzeri, G. Schiavo, F. Bertolini & L. Fontanesi. 2018.** Shotgun
2823 metagenomics of honey DNA: Evaluation of a methodological approach to describe a
2824 multikingdom honey bee derived environmental DNA signature. *PLoS ONE*. 13: e0205575.
2825
- 2826 **Brysch-Herzberg, M. & M.A. Lachance. 2004.** *Candida bombiphila* sp. nov., a new asexual yeast
2827 species in the *Wickerhamiella* clade. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54: 1857-1859.
2828
- 2829 **Cabañes, F.J. 2014.** *Malassezia* Yeasts: how many species infect humans and animals? *PLoS*
2830 *Pathog*. 10: e1003892
2831
- 2832 **Cani, P.D. & N.M. Delzenne. 2009.** The role of the gut microbiota in energy metabolism and
2833 metabolic disease. *Curr Pharm Des*. 15:1546–1558.
2834
- 2835 **Caporaso, J.G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F.D. Bushman, E.K. Costello, N.**
2836 **Fierer, Peña, A. G., J.K. Goodrich, J.I. Gordon, G.A. Huttley, S.T. Kelley, D. Knights,**
2837 **J.E. Koenig, R.E. Ley, C.A. Lozupone, D. McDonald, B.D. Muegge, M. Pirrung, J.**
2838 **Reeder & R. Knight. 2010.** QIIME allows analysis of high-throughput community
2839 sequencing data. *Nat Methods*. 7: 335–336.
2840
- 2841 **Chikano, M. & J-I. Takahashi. 2020.** Complete mitochondrial DNA sequence of the yeast
2842 *Zygosaccharomyces siamensis* (Saccharomycetes: Saccharomycetales) from fermented
2843 honey of the *Apis cerana japonica* in Japan. *Mitochondrial DNA Part B Res*. 5:2645-2647.
2844
- 2845 **Cole, J.R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R.J. Farris, A.S. Kulam-Syed-Mohideen,**
2846 **D.M. McGarrell, T. Marsh, G.M. Garrity & J.M. Tiedje. 2009.** The Ribosomal Database
2847 Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 37:
2848 141–145.
2849

- 2850 **Currie, C.R. 2001.** A community of ants, fungi, and bacteria: A multilateral approach to studying
2851 symbiosis. *Annu Rev Microbiol.* 55: 357-380.
2852
- 2853 **Currie, C.R., J.A. Scott, R.C. Summerbell & D. Malloch. 1999.** Fungus-growing ants use
2854 antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398: 701–704.
2855
- 2856 **Daniel, H.M., C.A. Rosa, P.S.S. Thiago-Calaça, Y. Antonini, E.M.A.F. Bastos, P. Evrard, S.**
2857 **Huret, A. Fidalgo-Jiménez & M.A. Lachance. 2013.** *Starmerella neotropicalis* f. a., sp.
2858 nov., a yeast species found in bees and pollen. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63: 3896-3903.
2859
- 2860 **De Lucca, P.A & M. Vallejo-Marín. 2013.** What’s the ‘buzz’ about? The ecology and
2861 evolutionary significance of buzz-pollination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 429-435.
2862
- 2863 **Detry, R., N. Simon-Delso, E. Bruneau & H-M. Daniel. 2020.** Specialisation of yeast genera in
2864 different phases of bee bread maturation. *Microorganisms* 8: 1789.
2865
- 2866 **Díaz, S., S.S. Urbano, L. Caesar, B. Blochtein, A. Sattler, V. Zuge & K.L. Haag. 2017.** Report
2867 on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. *J Invertebr*
2868 *Pathol.* 143: 35–39.
2869
- 2870 **Disayathanoowat, T., H. Li, N. Supapimon, N. Suwannarach, S. Lumyong, P.**
2871 **Chantawannakul & J. Guo. 2020.** Different dynamics of bacterial and fungal communities
2872 in hive-stored bee bread and their possible roles: A case study from two commercial honey
2873 bees in China. *Microorganisms* 8: 264.
2874
- 2875 **Drew, L.W. 2011.** Are we losing the science of taxonomy? *BioScience* 61: 942–946.
2876
- 2877 **Edgar, R.C. 2013.** UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat*
2878 *Methods* 10: 996–998.
2879
- 2880 **Engel, P., V.G. Martinson & N.A. Moran. 2012.** Functional diversity within the simple gut
2881 microbiota of the honey bee. *PNAS.* 109: 11002–11007.
2882
- 2883 **Evison, S.E. & A.B. Jensen. 2018.** The biology and prevalence of fungal diseases in managed and
2884 wild bees. *Curr Opin Insect Sci.* 26: 105–113.
2885
- 2886 **Ferraz, R.E., P.M. Lima, D.S. Pereira, C.C.O. Freitas & F.M.C. Feijó. 2008.** Microbiota
2887 fúngica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). *Neotrop Entomol.* 37: 345–
2888 346
2889
- 2890 **Foley, K., G. Fazio, A.B. Jensen & W.O. Hughes. 2014.** Nutritional limitation and resistance to
2891 opportunistic *Aspergillus* parasites in honey bee larvae. *J Invertebr Pathol.* 111:68–73.
2892
- 2893 **Gilliam, M. 1979.** Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie* 10: 43–53.
2894

- 2895 **Gilliam, M., H.L. Morton, D.B. Prest, R.D. Martin & L.J. Wickerham. 1977.** The mycoflora of
2896 adult worker honeybees, *Apis mellifera*: effects of 2,4,5-T and caging of bee colonies. J
2897 Invertebr Pathol. 30:50-54.
2898
- 2899 **Gilliam, M. & D.B. Prest. 1972.** Fungi isolated from the intestinal contents of foraging worker
2900 honey bees *Apis mellifera*. J Invertebr Pathol. 20: 101–103.
2901
- 2902 **Gilliam, M., L.J. Wickerham, H.L. Morton & R.D. Martin. 1974.** Yeasts isolated from honey
2903 bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-D and antibiotics. J Invertebr Pathol. 24:349–356.
2904
- 2905 **Giongo, A., D.B. Crabb, A.G. Davis-Richardson, D. Chauliac, J.M. Mobberley, K.A. Gano,
2906 N. Mukherjee, G. Casella, L.F. Roesch, B. Walts, A. Riva, G. King & E.W. Triplett.
2907 2010.** PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. The ISME J. 4: 852–
2908 861.
2909
- 2910 **Gois, G.C., G.G. Carneiro, A.E. Rodrigues, E.O. Silva & F.S. Campos. 2010.** Qualidade
2911 microbiológica do mel de abelhas *Melipona scutellaris*. PUBVET 4: 769.
2912
- 2913 **Gonçalves, P., C. Gonçalves, P.H. Brito & J.P. Sampaio, 2020.** The *Wickerhamiella/Starmerella*
2914 clade—A treasure trove for the study of the evolution of yeast metabolism. Yeast 37: 313–
2915 320.
2916
- 2917 **Guégan, M., E. Martin & C. Valiente Moro. 2020a.** Comparative analysis of the bacterial and
2918 fungal communities in the gut and the crop of *Aedes albopictus* mosquitoes: A preliminary
2919 study. Pathogens 9: 1-10.
2920
- 2921 **Guégan, M., V. Tran Van, E. Martin, G. Minard, F.H. Tran, B. Fel, A.E. Hay, L. Simon, M.
2922 Barakat, P. Potier, F.Z. Haichar & C.V. 2020b.** Moro. Who is eating fructose within the
2923 *Aedes albopictus* gut microbiota? Environ. Microbiol. 22: 1193–1206.
2924
- 2925 **Gweon, H.S., A. Oliver, J. Taylor, T. Booth, M. Gibbs, D.S. Read, R.I. Griffiths & K.
2926 Schonrogge. 2015.** PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal
2927 transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. Methods Ecol Evol. 6:
2928 973–980.
2929
- 2930 **Harrison, J.G., D.M. Urruty & M.L. Forister. 2016.** An exploration of the fungal assemblage in
2931 each life history stage of the butterfly, *Lycaeides melissa* (Lycaenidae), as well as its host
2932 plant *Astragalus canadensis* (Fabaceae) Fungal Ecol. 22: 10-16.
2933
- 2934 **Hartman, A.L., S. Riddle, T. McPhillips, B. Ludascher & J.A. Eisen. 2010.** Introducing
2935 W.A.T.E.R.S.: a workflow for the alignment, taxonomy, and ecology of ribosomal
2936 sequences. BMC Bioinform. 211:317.
2937
- 2938 **Hebert, P., A. Cywinska, S. Ball & J. Dewaard. 2003.** Biological identifications through DNA
2939 barcodes. Proc. R. Soc. Lond. 270: 313–321.
2940

- 2941 **Hedtke, S.M., E.J. Blitzer, G.A. Montgomery & B.N. Danforth. 2015.** Introduction of non-
 2942 native pollinators can lead to trans-continental movement of bee-associated fungi. PLoS
 2943 ONE 10:e0130560.
 2944
- 2945 **Hroncova, Z., J. Havlik, J. Killer, I. Dostkocil, J. Tyl, M. Kamler, D. Titera, J. Hakl, J. Mrazek,**
 2946 **V. Bunesova & V. Rada. 2015.** Variation in honey bee gut microbial diversity affected by
 2947 ontogenetic stage, age and geographic location. PloS ONE. 10: e0118707.
 2948
- 2949 **IBGE. 2012.** Manual Técnico da Vegetação Brasileira. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de
 2950 Geografia e Estatística, 272p. (Manual Técnico)
 2951
- 2952 **Kakumanu, M.L., A.M. Reeves, T.D. Anderson, R.R. Rodrigues & M.A. Williams. 2016.**
 2953 Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. Front. Microbiol. 7: 1-
 2954 11.
 2955
- 2956 **Koch, H., D.P. Abrol, J. Li & P. Schmid-Hempel. 2013.**Diversity and evolutionary patterns of
 2957 bacterial gut associates of corbiculate bees. Mol Ecol. 22: 2028–2044.
 2958
- 2959 **Koch, H. & P. Schmid-Hempel. 2011.** Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees
 2960 against an intestinal parasite. PNAS 108: 19288–19292.
 2961
- 2962 **Kõljalg, U., R.H. Nilsson, K. Abarenkov, L. Tedersoo, A.F.S Taylor, M. Bahram, S.T. Bates,**
 2963 **T.D. Bruns, J. Bengtsson-Palme, T.M. Callaghan, B. Douglas, T. Drenkhan, U.**
 2964 **Eberhardt, M. Dueñas, T. Grebenc, G.W. Griffith, M. Hartmann, P.M. Kirk, P.**
 2965 **Kohout, E. Larsson, B.D. Lindahl, R. Lücking, M.P. Martín, P.B. Matheny, N.H.**
 2966 **Nguyen, T. Niskanen, J. Oja, K.G. Peay, U. Peintner, M. Peterson, K. Põldmaa, L.**
 2967 **Saag, I. Saar, A. Schüßler, J.A. Scott, C. Senés, M.E. Smith, A. Suija, D.L. Taylor,**
 2968 **M.T. Telleria, M. Weiss & K-H. Larsson. 2013.** Towards a unified paradigm for
 2969 sequence-based identification of fungi. Mol Ecol. 22: 5271-5277.
 2970
- 2971 **Kurtzman, C.P., N.P. Price, K.J. Ray & T-M. Kuo. 2010.** Production of sophorolipid
 2972 biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade.
 2973 FEMS Microbiol. Lett. 311: 140–146.
 2974
- 2975 **Kwong, W.K., A.L. Mancenido & N.A. Moran. 2017.** Immune system stimulation by the native
 2976 gut microbiota of honey bees. R. Soc. Open Sci. 4: 170003.
 2977
- 2978 **Lee, F.J. K.I. Miller, J.B. McKinlay & I.L.G. Newton. 2018.** Differential carbohydrate utilization
 2979 and organic acid production by honey bee symbionts. FEMS Microbiol Ecol. 94: 1-10.
 2980
- 2981 **Leonhardt, S.D. & M. Kaltenpoth. 2014.** Microbial communities of three sympatric australian
 2982 stingless bee species. PLoS ONE 9: e105718.
 2983
- 2984 **Li, J., H. Qin, J. Wu, B.M. Sadd, X. Wang, D.E. Jay, W. Peng1 & Y. Chen. 2012.** The
 2985 prevalence of parasites and pathogens in asian honeybees *Apis cerana* in China. PLoS ONE
 2986 7: e47955.
 2987

- 2988 **Lücking, R., M.C. Aime, B. Robbertse, A.N. Miller, H.A. Ariyawansa, T. Aoki, G. Cardinali,**
2989 **P.W. Crous, I.S. Druzhinina, D.M. Geiser, D.L. Hawksworth, K.D. Hyde, L. Irinyi, R.**
2990 **Jeewon, P.R. Johnston, P.M. Kirk, E. Malosso, T.W. May, W. Meyer, M. Öpik, V.**
2991 **Robert, M. Stadler, M. Thines, D. Vu, A.M. Yurkov, N. Zhang & C.L. Schoch. 2020.**
2992 **Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is**
2993 **fungal DNA barcoding?. IMA Fungus 11:14.**
2994
- 2995 **Ludvigsen, J., Å. Andersen, L. Hjeljord & K. Rudi. 2020.** The honeybee gut mycobiota cluster
2996 **by season versus the microbiota which cluster by gut segment. Veterinary sciences 8: 4.**
2997
- 2998 **Lumbsch, H.T. & S.D. Leavitt. 2011.** Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation
2999 **of species in lichenized fungi. Fungal Divers. 50:59–72.**
3000
- 3001 **Malacrinò, A., L. Schena, O.Campolo, F. Laudani, S. Mosca, G. Giunti, C.P. Strano & V.**
3002 **Palmeri. 2017.** A metabarcoding survey on the fungal microbiota associated to the Olive
3003 **Fruit Fly. Microb Ecol. 73, 677–684.**
3004
- 3005 **Malassigné, S., G. Minard, L. Vallon, E. Martin, C. Valiente Moro & P. Luis. 2021.** Diversity
3006 **and functions of yeast communities associated with insects. Microorganisms 9: 1552.**
3007
- 3008 **Martin, D. & E. Rybicki. 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned**
3009 **sequences. Bioinformatics. 16: 562-563.**
3010
- 3011 **McFrederick, Q.S., U.G. Mueller & R.R. James. 2014.** Interactions between fungi and bacteria
3012 **influence microbial community structure in the *Megachile rotundata* larval gut. P Roy Soc**
3013 **Lond B Bio. 281: 20132653.**
3014
- 3015 **McFrederick, Q.S. & S.M. Rehan. 2019.** Wild bee pollen usage and microbial communities co-
3016 **vary across landscapes. Microb Ecol. 77, 513–522.**
3017
- 3018 **McMurdie, P.J. & S. Holmes. 2013.** Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis
3019 **and graphics of microbiome census data. PLoS ONE 8: e61217**
3020
- 3021 **Menezes, C., A. Vollet-Neto, A.J. Marsaioli, D. Zampieri, I.C. Fontoura, A.D. Luchessi & V.L.**
3022 **Imperatriz-Fonseca. 2015.** A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Curr.*
3023 **Biol. 25: 2851–2855.**
3024
- 3025 **Nunes-Silva P., N. Piot, I. Meeus, B. Blochtein & G. Smagghe. 2016.** Absence of Leishmaniinae
3026 **and Nosematidae in stingless bees. Sci Rep. 6:3254**
3027
- 3028 **Pacini, E. & M. Hesse. 2005.** Pollenkitt—its composition, forms and functions. *Flora Morphol.*
3029 **Distrib. Funct. Ecol. Plants 200: 399–415.**
3030
- 3031 **Paludo, C.R., C. Menezes, E.A. Silva-Junior, A. Vollet-Neto, A. Andrade-Dominguez, G.**
3032 **Pishchany, L. Khadempour, F.S. do Nascimento, C.R. Currie, R. Kolter, J. Clardy &**
3033 **M.T. Pupo. 2018.** Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. *Sci Rep. 8: 1122.*

3034
3035 **Paludo, C.R., G. Pishchany, A. Andrade-Dominguez, E.A. Silva-Junior, C. Menezes, F.S.**
3036 **Nascimento, C.R. Currie, R. Kolter, J. Clardy & M.T. Pupo. 2019.** Microbial
3037 community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee
3038 metamorphosis. *PLoS ONE*, 14: e0219696.
3039
3040 **Pimentel, M.R.C., Y. Antonini, R.P. Martins, M-A. Lachance & C.A. Rosa. 2005.** *Candida*
3041 *riodocensis* and *Candida cellae*, two new yeast species from the *Starmerella* clade
3042 associated with solitary bees in the Atlantic rain forest of Brazil. *FEMS Yeast Res.*
3043 5: 875-879.
3044
3045 **Porrini, M.P., L.P. Porrini, P.M. Garrido, C.M. Silva Neto, D.P. Porrini, F. Muller, L.A.**
3046 **Nuñez, L. Alvarez, P.F. Iriarte & M.J. Egúaras. 2017.** *Nosema ceranae* in south american
3047 native stingless bees and social wasp. *Microb Ecol.* 74: 761–764.
3048
3049 **Ptaszynska, A.A., J. Paleolog & G. Borsuk. 2016.** *Nosema ceranae* infection promotes
3050 proliferation of yeasts in honey bee intestines. *PLoS ONE* 11: e0164477.
3051
3052 **Qian, X., X. Li, H. Li & D. Zhang. 2021.** Floral fungal-bacterial community structure and co-
3053 occurrence patterns in four sympatric island plant species *Fungal Biol.* 125: 49-61.
3054
3055 **Raymann, K. & N.A. Moran. 2018.** The role of the gut microbiome in health and disease of adult
3056 honey bee workers. *Curr Opin Insect Sci.* 26: 97–104.
3057
3058 **Rosa, C.A. & M-A. Lachance. 1998.** The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella*
3059 *bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock)
3060 Meyer & Yarrow. *Int J Syst Bacteriol.* 4:1413-1417
3061
3062 **Rosa, C.A. & M-A. Lachance. 2005.** *Zygosaccharomyces machadoi* sp. n., a yeast species isolated
3063 from a nest of the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Lundiana* 6: 27–29.
3064
3065 **Rosa, C.A., M-A Lachance, J.O.C. Silva, A.C.P. Teixeira, M.M. Marini, Y. Antonini & R.P.**
3066 **Martins. 2003.** Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Res.* 4: 271-
3067 275.
3068
3069 **Rosa, C.A., R.P. Martins, Y. Antonini & M-A. Lachance. 1999.** *Candida batistae*, a new yeast
3070 species associated with solitary digger nesting bees in Brazil. *Mycologia*, 9: 428-433.
3071
3072 **Rothman, J.A., C. Andrikopoulos, D. Cox-Foster & Q.S. McFrederick. 2019.** floral and foliar
3073 source affect the bee nest microbial community. *Microb Ecol.* 78: 506–516.
3074
3075 **Rouzé, R., A. Moné, F. Delbac, L. Belzunces & N. Blot. 2019.** The honeybee gut microbiota is
3076 altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema*
3077 *ceranae*. *Microbes and environments* 34: 226–233.
3078
3079 **Santos, A.R.O., M.P. Leon, K.O. Barros, L.F.D. Freitas, A.F.S. Hughes, P.B. Morais, M-A.**
3080 **Lachance & C. Rosa. 2018.** *Starmerella camargoii* f.a., sp. nov., *Starmerella ilheusensis*

3081 f.a., sp. nov., *Starmerella litoralis* f.a., sp. nov., *Starmerella opuntiae* f.a., sp. nov.,
3082 *Starmerella roubikii* f.a., sp. nov. and *Starmerella vitae* f.a., sp. nov., isolated from flowers
3083 and bees, and transfer of related *Candida* species to the genus *Starmerella* as new
3084 combinations. Int J Syst Evol Microbiol. 68: 1333-1343.
3085

3086 **Saksinchai, S., Suzuki, M., Chantawannakul, P., Ohkuma, M., Lumyong, S., 2012.** A novel
3087 ascosporeogenous yeast species, *Zygosaccharomyces siamensis*, and the sugar tolerant yeasts
3088 associated with raw honey collected in Thailand. Fungal Divers. 52: 123-139.
3089

3090 **Schoch, C.L., K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J.L. Spouge, C.A. Levesque, W. Chen &**
3091 **Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List 2012.**
3092 Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode
3093 marker for Fungi. PANAS. 109: 6241–6246.
3094

3095 **Silva De Souza, J.R., M. Oliveira Costa, M.I. Lopes Da Silva & C.G. Nunes Da Silva. 2020.**
3096 Ocorrência de fungos associados ao trato digestivo de abelhas sem ferrão *Melipona*
3097 *seminigra* Merrillae Cockerell, 1919, p. 114-121. In Silva Neto, B.R. (eds.), Micologia:
3098 Fungos e/ou seus Metabólitos como Objeto de Estudo. Ponta Grossa, Atena, 174p.
3099

3100 **Souza, J.R.S., M.I.M. Sarquis, M.C. Pantoja, P.Q. Costa Neto, J.O. Pereira, R.M. Sousa**
3101 **Galvão, M.I. Lopes da Silva. 2018.** Occurrence of filamentous fungi associated with
3102 stingless bees *Melipona* in *Meliponaries* at the metropolitan region of Manaus, Amazonas.
3103 Revista da Biologia 18: 1-5.
3104

3105 **Stuart, R.M., C. Lamas & I.C. Pimentel. 2004.** *Trigona* sp. como visitante floral e vetor de
3106 esporos fúngicos para goiabeira (*Psidium guajava* L.–Myrtaceae). Revista Estudos de
3107 Biologia 26: 19-23.
3108

3109 **Taberlet, P., E. Coissac, F. Pompanon, C. Brochmann & E. Willerslev. 2012.** Towards next-
3110 generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. Mol Ecol. 21: 2045-2050.
3111

3112 **Teixeira, A.C.P., M.M. Marini, J.R. Nicoli, Y. Antonini, R.P. Martins, M-A. Lachance & C.A.**
3113 **Rosa 2003.** *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species
3114 associated with stingless bees. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 339-343.
3115

3116 **Vásquez, A., E. Forsgren, I. Fries, R.J. Paxton, E. Flaberg, L. Szekely & T.C. Olofsson. 2012.**
3117 Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. PLoS
3118 ONE. 7: e33188.
3119

3120 **Vega, F.E. & P.F. Dowd. 2005.** The role of yeasts as insect endosymbionts, p. 211-243. In. Veja,
3121 F.E & B. Meredith (eds.), Insect fungal associations: ecology and evolution. Oxford, Oxford
3122 University Press, 333p.
3123

3124 **Vetrovský, T., P. Baldrian, D. Morais & B. Berger. 2018.** SEED 2: a user-friendly platform for
3125 amplicon high-throughput sequencing data analyses. Bioinform. 1: 3.
3126

3127 **Vojvodic, S., A.B. Jensen, R.R. James, J.J. Boomsma & J. Eilenberg. 2011.** Temperature
3128 dependent virulence of obligate and facultative fungal pathogens of honeybee brood. *Vet*
3129 *Mic.* 149: 200–205.
3130
3131 **Wirta, H., N. Abrego, K. Miller, T. Roslin & E. Vesterinen. 2021.** DNA traces the origin of
3132 honey by identifying plants, bacteria and fungi. *Sci Rep.* 11: 4798.
3133
3134 **Yun, J-H., M-J. Jung, P.S. Kim & J-W. Bae. 2018.** Social status shapes the bacterial and fungal
3135 gut communities of the honey bee. *Sci Rep.*, 8: 2019.
3136
3137 **Zheng, H., A. Nishida, W.K. Kwong, H. Koch, P. Engel, M.I. Steele & N.A. Moran. 2016.**
3138 Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. *mBio* 7:
3139 e01326-16.
3140
3141
3142
3143
3144
3145
3146
3147
3148
3149
3150
3151
3152
3153
3154
3155
3156
3157
3158
3159
3160
3161
3162
3163
3164
3165
3166
3167
3168
3169
3170
3171

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

3174
3175
3176 Tabela 2. Fungos identificados a nível de espécie pelo Blast, com correspondência de 97% de
3177 similaridade.

3178

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>Arthriniium</i>	<i>Arthriniium 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*.

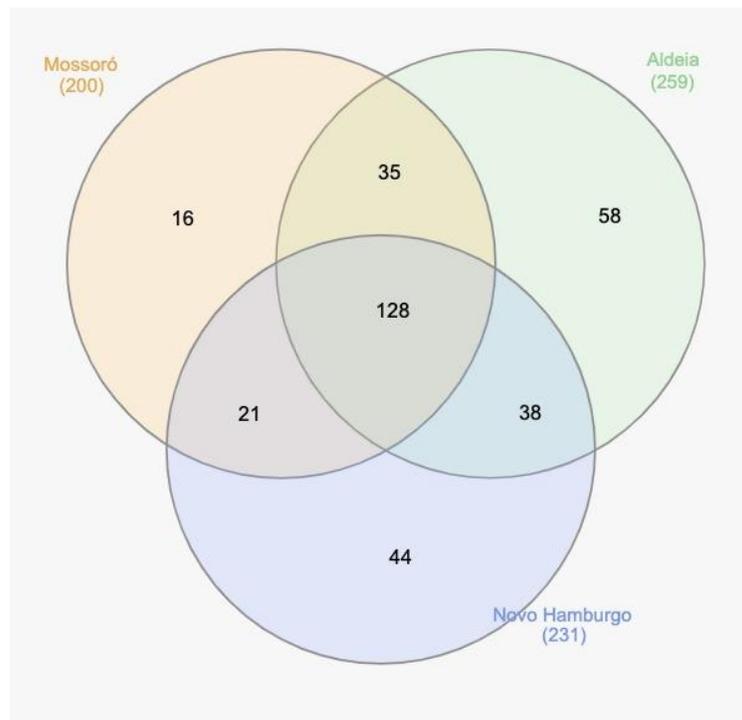
3188 Cidade de Mossoró no estado do Rio Grande do Norte, Camaragibe no estado de Pernambuco e a

3189 cidade de Novo Hamburgo localizado no estado do Rio Grande do Sul.

3190

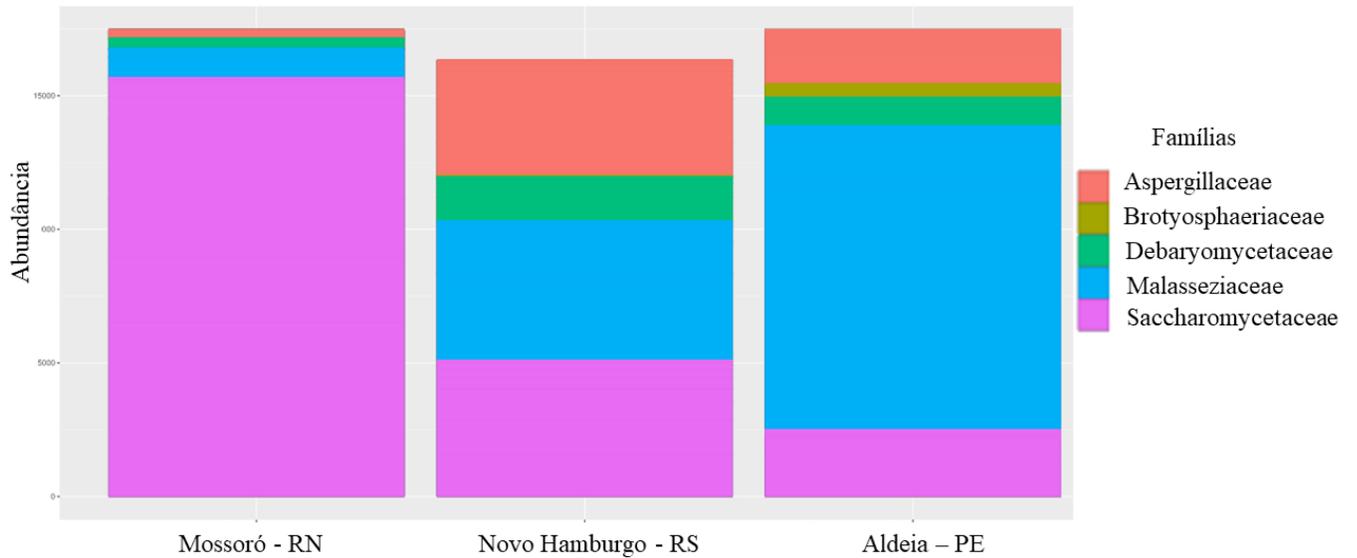
3191

3192



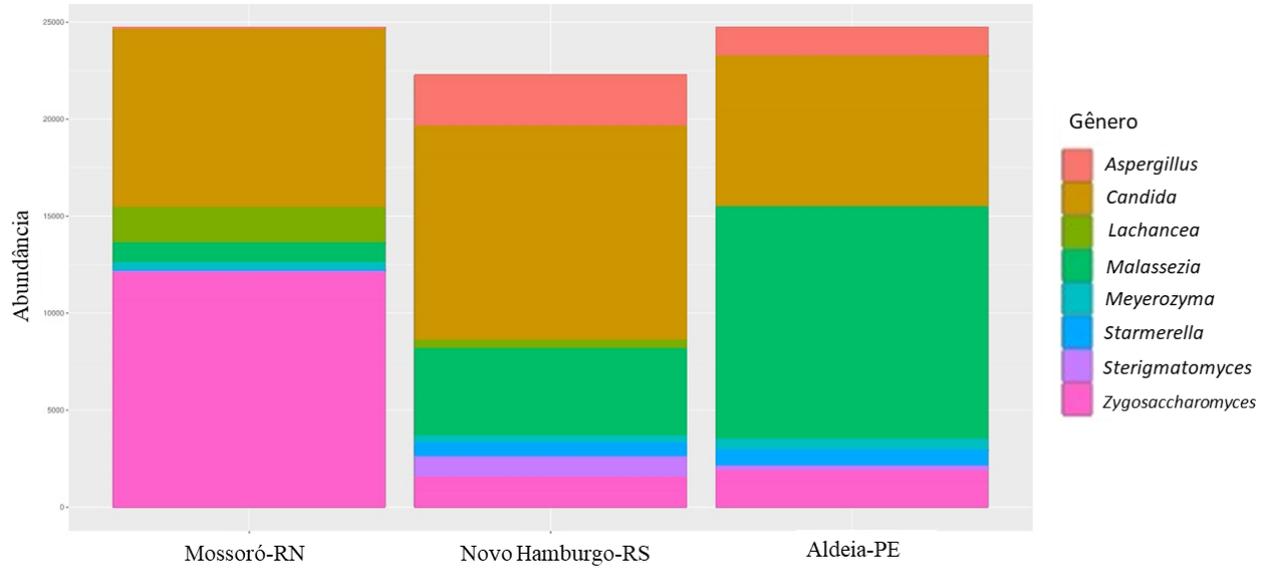
3193 Figura 2. Diagrama de Venn mostrando as quantidades de unidades taxonômicas operacionais
3194 (OTUs) (OTUs; 97% de identidade) fúngicas compartilhadas e únicas entre Mossoró-RN, Aldeia-
3195 PE e Novo Hamburgo-RS.

3196



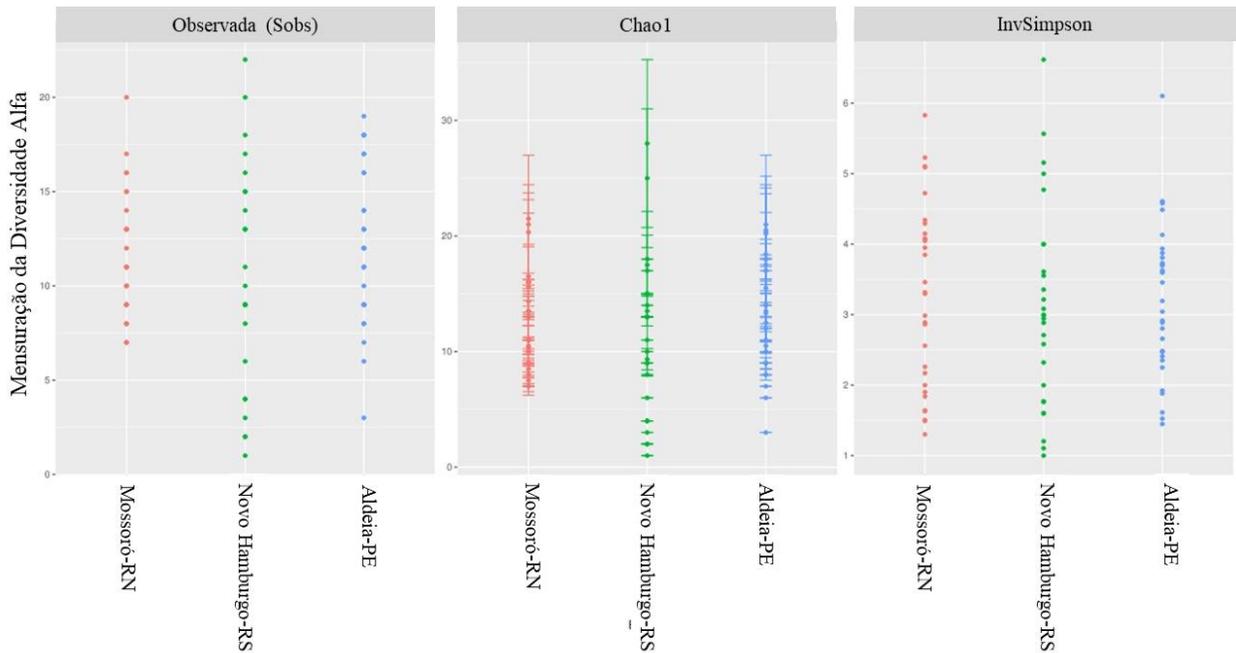
3197 Figura 3. Gráfico de barras com as oito OTUs mais abundantes a nível de nível de família para
3198 Mossoró-RN, Novo Hamburgo-RS e Aldeia-PE.

3199



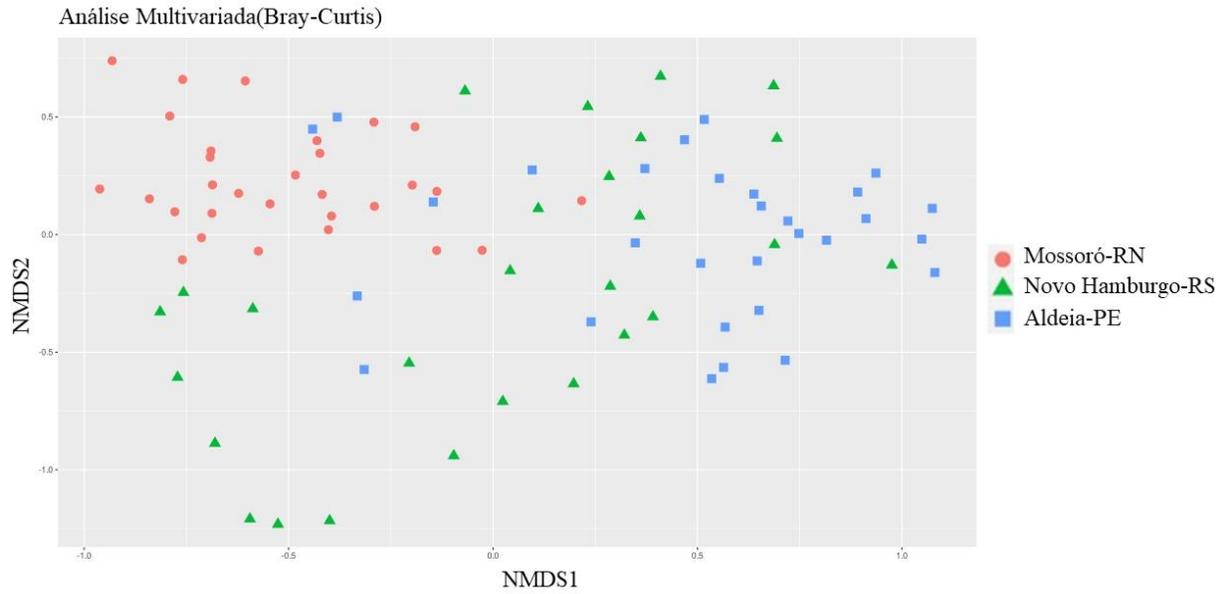
3200 Figura 4. Gráfico de barras com as oito OTUs mais abundantes a nível de gênero e sua distribuição
3201 por abundância para Mossoró-RN, Novo Hamburgo-RS e Aldeia-PE;

3202



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

3205



3206 Figura 6. Análise Multivariada (NMDS) utilizando como matriz a distância de dissimilaridade de
3207 Bray-Curtis para as amostras de Mossoró-RN (círculo rosa), Novo Hamburgo-RS (triângulo verde)
3208 e Aldeia-PE (quadrado azul), valor de Stress= 0.1770066.

3209

3210

3211

3212

3213

3214

3215

3216

3217

3218

3219

3220

3221 CONSIDERAÇÕES FINAIS

3222 O presente trabalho trouxe novas informações sobre a microbiota fúngica e bacteriana de
3223 *Melipona scutellaris*. Porém, mais estudos são necessários para essa espécie e outras abelhas sem
3224 ferrão, para que fique claro quais fungos e bactérias fazem parte de um núcleo central e quais vão
3225 variar conforme a situação que a colmeia se encontra, como esses microrganismos se comportam
3226 diante de diferentes situações e suas funções. Informações como essas servem como base para
3227 novos estudos, e auxiliam na preservação e no cuidado do manejo de *M. scutellaris*, o que é de
3228 grande valia devido sua importância tanto no campo socioeconômico, quanto para a conservação
3229 da biodiversidade.