



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA -
PPGDB

DIVERSIDADE FÚNGICA ASSOCIADA A ABELHAS SEM FERRÃO
(*Melipona* spp.) EM MELIPONÁRIOS NA CIDADE DE MANAUS E
IRANDUBA, AMAZONAS, BRASIL

JOÃO RAIMUNDO SILVA DE SOUZA

MANAUS-AM
2014

JOÃO RAIMUNDO SILVA DE SOUZA

DIVERSIDADE FÚNGICA ASSOCIADA A ABELHAS SEM FERRÃO
(*Melipona* spp.) EM MELIPONÁRIOS NA CIDADE DE MANAUS E
IRANDUBA, AMAZONAS, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas - UFAM como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Ivone Lopes da Silva

MANAUS-AM
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

S729d Souza, João Raimundo Silva de
Diversidade fúngica associada a abelhas sem ferrão (*Melipona* spp.) em Meliponários na cidade de Manaus e Iranduba, Amazonas, Brasil/ João Raimundo Silva de Souza, 2014
65 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Ivone Lopes da Silva
Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Fungos filamentosos. 2 abelhas sem ferrão. 3. Meliponários. 4. Amazonas. I. Silva, Maria Ivone Lopes da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

JOÃO RAIMUNDO SILVA DE SOUZA

DIVERSIDADE FÚNGICA ASSOCIADA A ABELHAS SEM FERRÃO
(*Melipona* spp.) EM CRIADOUROS ARTIFICIAIS NA CIDADE DE
MANAUS E IRANDUBA, AMAZONAS, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas - UFAM como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Data da defesa: 27 / 11 / 2014

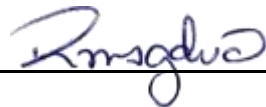
Resultado: APROVADO

Banca Examinadora

Maria Inez de Moura Sarquis,
Instituto Oswaldo Cruz – RJ

Prof^a. Dra. 

Rozana de Medeiros Souza Galvão,
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof^a. Dra. 

Pedro de Queiroz Costa Neto,
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. 

Dedico esta dissertação aos meus pais, Getúlio e Maria do Carmo, à minha irmã Ana por todo amor, carinho, apoio e atenção nessa etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciências Biológicas - ICB, pelo apoio concedido por meio de suas estruturas, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, pela oportunidade de realização do Curso.

Ao Laboratório de Genética de Microrganismos, LAGEM - UFAM e ao Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana, LPBOM - UFAM, pelo espaço cedido para realização dos experimentos.

Ao Laboratório de Genética do Instituto Oswaldo Cruz - RJ e ao Centro de Apoio Multidisciplinar - UFAM e colaboradores, pelo sequenciamento das amostras de DNA.

À Prof^a. Dra. Maria Ivone Lopes da Silva, pela orientação, confiança e apoio.

À Dra. Maria Inez de Moura Sarquis, pela colaboração e auxílio na identificação morfológica dos fungos.

Ao Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, pelo apoio nas extrações de DNA dos fungos e análise dos dados.

À Prof^a. Dra. Maria Cláudia Gross, pelo apoio e colaboração na análise genética.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação de Diversidade Biológica, pelos ensinamentos transmitidos e agradável convivência.

Ao acadêmico de Zootecnia Mozanil, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

Ao amigo André Gouvêa Belota, por ceder o transporte para realização das coletas de abelhas.

À amiga Janaína da Costa Nogueira, pelo apoio e por ceder material para realização dos microcultivos dos isolados.

À amiga Aldenora Lima de Queiroz, técnica Bióloga CBIO Coordenação de Pesquisa em Biodiversidade/INPA e criadora de abelhas/ACAM Associação de Criadores de Abelhas do Amazonas-Manaus, pela disponibilidade do espaço no

Meliponário Sucupira para as coletas de dados nas colmeias de abelhas sem ferrão Jandaíra *Melipona seminigra merrillae* e *M. interrupta manaosensis*.

À senhora Terezinha, por disponibilizar o espaço no Sítio dos Tucanos, Iranduba, pela disponibilidade do espaço no Meliponário para as coletas de dados nas colmeias de abelhas sem ferrão.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética, em especial a Natália Dayane Moura Carvalho, Francijara Araújo, Thais Lemos de Mattos e Vanessa Pinheiro pelo apoio e colaboração durante a realização das atividades.

Aos colegas e amigos de Curso, pelo convívio e apoio, em especial aos companheiros: Laerzio, Lucas, Rodrigo, Francijara, Paula, Rebeca, Joice, Ana Paula e Urania, meus votos de sucesso.

Aos amigos da graduação em Ciências Biológicas 2009/2 da ESBAM, em especial às eternas companheiras: Aldenora, Rosana, Karol, Dani e Paty, por torcerem e se alegrarem com minhas vitórias.

À minha família que me acompanhou durante esta etapa.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela concessão de bolsa de estudo no qual tornou possível a realização deste trabalho.

À todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a finalização desta etapa, agradeço.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Gêneros de fungos filamentosos identificados por morfologia clássica, isolados de abelhas sem ferrão coletadas no ano de 2013 no período chuvoso e de estiagem nos Municípios de Manaus (P1) e Iranduba (P2) 29
- Figura 02.** Gênero de fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão no período chuvoso do ano de 2013, nos Municípios de Manaus, Meliponário Sucupira (P1) e Iranduba, Meliponário dos Tucanos (P2) 30
- Figura 03.** Gênero de fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão no período de estiagem do ano de 2013, nos Municípios de Manaus, Meliponário Sucupira (P1) e Iranduba, Meliponário dos Tucanos (P2) 31
- Figura 04.** Morfologia do gênero *Penicillium* isolado de abelha sem ferrão no Município de Manaus (P 1), ano de 2013, período chuvoso, características macro (A) e microscópicas (B) 32
- Figura 05.** Morfologia do gênero *Fusarium* isolado de abelha sem ferrão no Município de Iranduba (P 2), ano de 2013, período chuvoso, características macro (A) e microscópicas (B) 33
- Figura 06.** Morfologia do gênero *Acremonium* isolado de abelha sem ferrão no Município de Iranduba (P 2), ano de 2013, período de estiagem, características macro (A) e microscópicas (B) 34
- Figura 07.** Morfologia do gênero *Cladosporium* isolado de abelha sem ferrão no Município de Manaus (P 1), ano de 2013, período de estiagem, características macro (A) e microscópicas (B, C e D) 35
- Figura 08.** Morfologia do gênero *Paecilomyces* isolado de abelha sem ferrão no Município de Manaus (P 1), ano de 2013, período chuvoso, características macro (A) e microscópicas (B) 36
- Figura 09.** Morfologia do gênero *Verticillium* isolado de abelha sem ferrão no Município de Iranduba (P 2), ano de 2013, período chuvoso, características macro (A) e microscópicas (B) 37
- Figura 10.** Morfologia do gênero *Moniliella* isolado de abelha sem ferrão no Município de Iranduba (P 2), ano de 2013, período de estiagem, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B) 38
- Figura 11.** Morfologia do gênero *Aspegillus* isolado de abelha sem ferrão no Município de Manaus (P 1), ano de 2013, período de estiagem, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B) 39

- Figura 12.** Morfologia do gênero *Rhizopus* isolado de abelha sem ferrão no Município de Iranduba (P 2), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B) 40
- Figura 13.** Morfologia do gênero *Rhinochlamydia* isolado de abelha sem ferrão no Município de Manaus (P 1), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B) 41
- Figura 14.** Morfologia do gênero *Tritirachium* isolado de abelha sem ferrão no Município de Manaus (P 1), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B) 42
- Figura 15.** Morfologia do gênero *Scedosporium* isolado de abelha sem ferrão no Município de Manaus (P 1), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B) 42
- Figura 16.** Morfologia do gênero *Mucor* isolado de abelha sem ferrão no Município de Manaus (P 1), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B) 43
- Figura 17.** Morfologia do gênero *Pestalotiopsis* isolado de abelha sem ferrão no Município de Iranduba (P 2), ano de 2013, período de estiagem, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B) 44
- Figura 18.** Morfologia do gênero *Torula* isolado de abelha sem ferrão no Município de Manaus (P 1), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B) 45
- Figura 19.** Morfologia do gênero *Alysidium* isolado de abelha sem ferrão no Município de Manaus (P 1), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B) 46
- Figura 20.** Gel de agarose com DNA dos fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão nos períodos chuvoso e de estiagem do ano de 2013, nos Municípios de Manaus e Iranduba 47
- Figura 21.** Gel de agarose com amplificação da região ITS do rDNA dos fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão (A), faixa de 250 a 10.000 pb do marcador molecular da Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder 1kb (B) 48
- Figura 22.** Árvore dos fungos associados a abelhas sem ferrão com base em rDNA. A análise das sequências (> 560 pb). Os números em cada ramo são os valores de bootstrap obtidos pela análise de MV / NJ de 1.000 conjuntos de dados reamostrados 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Identificação dos fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão após, isolados de abelhas sem ferrão no período chuvoso de estiagem do ano de 2013 nos Municípios de Manaus e Iranduba após alinhamento por <i>Blast</i>	49
---	----

RESUMO

As abelhas sem ferrão são responsáveis por até 90% da polinização das árvores nativas, grande é a variedade de organismos associados a elas, como insetos, ácaros, bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Estudos já realizados têm relatado a interação dos fungos com abelhas sem ferrão. Desta forma este trabalho teve como objetivo identificar a diversidade de fungos filamentosos associados a abelhas sem ferrão (*Melipona* spp.) em dois Meliponários de Manaus e Iranduba, Amazonas. Foram utilizadas 48 abelhas, coletadas no período chuvoso e de estiagem do ano de 2013. As abelhas foram coletadas ao adentrarem na colônia, transferidas para tubos estéreis, acondicionados sob refrigeração, levadas ao Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) da Universidade Federal do Amazonas, onde as abelhas mortas foram transferidas para tubos contendo solução salina e posteriormente plaqueadas em triplicata em meios BDA e SABOURAUD. Foram incubadas a 28 °C para desenvolvimento e isolamento das colônias. Após a visualização das estruturas fúngicas, foi realizada a identificação a partir do desenvolvimento das culturas em microcultivo sob lamínulas, depositadas sobre lâminas e coradas com azul de Lactofenol. Foram isoladas 482 colônias distribuídas em 16 gêneros. *Penicillium*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Paecilomyces* e *Verticillium* apresentando maior frequência, ultrapassando 50% das colônias, seguidos de *Aspergillus*, *Moniliella*, *Alysidium*, *Scedosporium*, *Rhinoctadiella*, *Tritirachium*, *Pestalotiopsis*, *Torula*, *Mucor*, e *Rhizopus*, além de várias *Mycelia sterilia*. Análise genética dos isolados confirmaram 16 gêneros e 12 espécies distintas. Assim, com o desenvolvimento da meliponicultura no Brasil nos últimos anos, principalmente em comunidades tradicionais do Norte e Nordeste, torna-se necessário o estudo aprofundado sobre a existência desses fungos na superfície corpórea de abelhas sem ferrão, onde esse estudo mostrou que a diversidade fúngica associada a esses organismos é elevado, e alguns desses fungos aqui descritos ainda não haviam sido relatados na superfície corpórea de abelhas sem ferrão.

Palavras chave: Fungos filamentosos, abelhas sem ferrão, meliponários e Amazonas.

ABSTRACT

The stingless bees are responsible for even 90% of native tree pollination and variety of organism associated with them is big like as insects, mites, bacteria, yeasts and filamentous fungi. Studies have been related interaction between fungi and stingless bees and this study aimed to identify the diversity of filamentous fungi which are associated with stingless bees (*Melipona* spp.) in two meliponários from Manaus and Iranduba, both in Amazonas state. It has been used 48 bee collected in rainy and drought seasons on 2013. The bees were collected when they entered in the colony and transferred to sterile tubes and were carried to Microorganisms' Genetics Laboratory from Federal University of Amazonas (LAGEM), where bees were transferred to salty solution tubes and after that they were plated in triplicate on BDA and SABOURAUD media and incubated at 28 °C to their development and colonies isolation. After fungi structures visualized, the identification was realized from microcultivation culture development under cover slips and deposited under slides; they were stained by lactophenol blue. Were isolated 482 colonies allocated in 16 genus. *Penicillium*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Paecilomyces* and *Verticillium* were genus with high frequency exceeding 50% of isolates; following by *Aspergillus*, *Moneliella*, *Alysidium*, *Scedosporium*, *Rhinochlamydia*, *Tritirachium*, *Pestalotiopsis*, *Torula*, *Mucor* and *Rhizopus* beyond a lot of *Mycelia sterilia* colony. Genetics analysis of isolates confirmed 16 genus and 12 distinct species. Therefore, in Brazil, with meliponicultivation development in last years, mainly in traditional communities from North and Northeast, is indispensable more and depth studies about existence of these fungi in the surface body of stingless bees, because this study showed the diversity of fungi which are associated with stingless bees is highest and most of this fungi wa not related yet in surface of these insects.

Keywords: Filamentous fungi, stingless bees, meliponários and Amazonas state.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3 OBJETIVOS	21
3.1 GERAL	21
3.2 ESPECÍFICOS	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E ISOLAMENTO FÚNGICO	22
4.2 TÉCNICA DE PURIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS MICROBIANAS ISOLADAS	23
4.3 TÉCNICA DE MICROCULTIVO EM LÂMINA	23
4.4 TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA DOS FUNGOS FILAMENTOSOS	24
4.5 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	25
4.6 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	26
4.6.1 Reação de Sequenciamento	26
4.6.2 Precipitação da Reação de Sequenciamento	28
5 RESULTADOS	29
5.1 FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE ABELHAS SEM FERRÃO	29
5.2 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROMORFOLÓGICA DOS FUNGOS	31
5.2.1 <i>Penicillium</i>	31
5.2.2 <i>Fusarium</i>	32
5.2.3 <i>Acremonium</i>	33
5.2.4 <i>Cladosporium</i>	34
5.2.5 <i>Paecilomyces</i>	35
5.2.6 <i>Verticillium</i>	36
5.2.7 <i>Moniliella</i>	37

5.2.8 <i>Aspergillus</i>	38
5.2.9 <i>Rhizopus</i>	39
5.2.10 <i>Rhinocladiella</i>	40
5.2.11 <i>Tritirachium</i>	41
5.2.12 <i>Scedosporium</i>	42
5.2.13 <i>Mucor</i>	43
5.2.14 <i>Pestalotiopsis</i>	43
5.2.15 <i>Torula</i>	44
5.2.16 <i>Alysidium</i>	45
5.3 ISOLADOS IDENTIFICADOS APÓS SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS DO rDNA	46
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES	57
8 REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão têm 50 vezes mais espécies do que *Apis mellifera*, e ambas são distintas e diversas (ROUBIK, 2006). Já foram descritas 391 espécies de meliponíneos na Região Neotropical (CAMARGO e PEDRO, 2003). As espécies de *Melipona* ocorrem exclusivamente do Sul da América do Sul até as montanhas do Norte do México, na América Central (SOUZA et al., 2009b). Contudo, ainda há muitas outras espécies a serem descritas. Dessa vasta diversidade de espécies, muitas podem produzir mel em quantidade suficiente para ser explorado comercialmente, porém poucas são criadas com objetivos financeiros (VENTURIERI, 2008b).

O desenvolvimento da criação racional das colônias dessas abelhas possibilita a exploração econômica de seus produtos (Meliponicultura), que serve de suporte econômico para muitas pessoas proporcionando-lhes uma fonte alternativa de renda (SOUZA et al., 2009b). Os ecossistemas brasileiros, em especial o amazônico, possuem muitas condições que favorecem a criação de abelhas sem ferrão. Dentre elas, podemos citar: clima quente, flora rica em espécies fornecedoras de néctar, pólen e resina; floração mais distribuída ao longo do ano; diferentes espécies de abelhas produtoras de mel e um grande mercado com boa cotação para esse produto (VENTURIERI, 2008a).

Apesar da importância das abelhas para a manutenção da estrutura da fauna e da flora tropical (são responsáveis por 40 a 90% da polinização da flora nativa, conforme o ecossistema), as espécies de abelhas sem ferrão têm diminuído em grande velocidade, devido a uma influência negativa do homem sobre o meio onde elas habitam. A fragmentação desse ambiente gera, como consequências diretas, a diminuição na oferta dos locais para abrigo e alimentação, a destruição de colônias e uma acentuada redução na capacidade de suporte das áreas de reserva florestal (KERR, 1997).

Embora a produção de mel das abelhas sem ferrão seja inferior às da abelha *A. mellifera*, os meliponíneos possuem vantagens muito importantes em relação às outras espécies, especialmente pelo fato delas estarem muito mais adaptadas à

polinização das árvores de nossa floresta e à nossa cultura e realidade (VENTURIERI, 2008a).

Os fungos podem ser encontrados em todos os lugares, no ar, na água, no solo, na superfície ou no interior de organismos, tanto vertebrados como invertebrados (ALVES, 1998).

Nem todos os insetos e artrópodes são fortemente associados a fungos, mas mesmo as estimativas revisadas indicam que o número de espécies de fungos associados a insetos é muito elevado (ODEGAARD, 2000). Há uma necessidade de mais informações sobre artrópodes e associações inseto-fungos, e, estimativas mundiais da diversidade fúngica geralmente omitem insetos e espécies associadas, pois essas associações são pouco conhecidas (MUELLER e SCHMIT, 2007; SCHMIT e MUELLER, 2007).

As regiões tropicais são consideradas como tendo a maior diversidade para a maioria dos grupos de organismos e este fato é corroborado para os fungos também (ARNOLD e LUTZONI, 2007).

Todas as espécies de insetos conhecidos abrigam uma comunidade rica e complexa de microrganismos. Esta microbiota participa em muitos tipos de interações que vão desde a patogênese ao mutualismo obrigatório (DILLON e DILLON, 2004). Sabe-se que cerca de 400 espécies de fungos atacam insetos e ácaros, o que estimula estudos voltados para utilização destes organismos (WAINWRIGHT, 1992).

As abelhas enfrentam inúmeras pragas e patógenos (CORNMAN et al., 2012), que vão desde fungos, ácaros, bactérias e insetos (GILLIAM, 1997). Perdas recentes de colônias de abelhas levaram ao aumento do interesse nas comunidades microbianas associadas a estes importantes polinizadores (MATTILA et al., 2012).

A maioria das espécies de abelhas nativas sem ferrão carece de informações sobre seu comportamento, reprodução e sanidade. Um dos aspectos importantes sobre a biologia desses insetos é o conhecimento da microbiota fúngica, a qual pode causar enfermidade a esses organismos. Há poucos relatos sobre a relação de fungos com abelhas sem ferrão (FERRAZ et al., 2008).

Em virtude da grande importância ecológica, cultural e financeira das abelhas sem ferrão há uma grande necessidade de estudos voltados para identificar organismos

associados a essas abelhas, procurando entender essas associações e tentar evitar catástrofes como ocorridas nos EUA. Os fungos têm grandes importâncias no ecossistema, mas podem acarretar enormes problemas se não catalogados e estudados previamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os fungos, também chamados de mofos, bolores ou cogumelos, estão interferindo constantemente em nossas atividades diárias. Eles são tão importantes que hoje constituem um reino à parte, lado a lado com os reinos vegetal e animal (AZEVEDO, 1997).

São organismos quimioheterotróficos, importantes na ciclagem de nutrientes, simbiontes, mutualistas e patógenos de organismos. Eles também têm um papel nos ciclos biogeoquímicos, nos processos geológicos, incluindo a alteração e desgaste de rochas e minerais, no acúmulo de metais e na manutenção da estrutura do solo, devido possuir o hábito de crescimento filamentoso ramificado (BURFORD et al., 2003).

O uso industrial de fungos têm sido amplamente utilizado devido as suas vantagens, tais como a eficácia de custo, consistência, menor tempo e espaço necessário para a produção, facilidade de modificação e otimização de processos (SUNITHA et al., 2012). Os fungos estão entre os organismos mais importantes do mundo, desempenhando um papel vital em funções do ecossistema e tem efeitos de grande alcance, tanto positivo quanto negativo, sobre os seres humanos e nas atividades relacionadas com o homem (MUELLER et al., 2004).

Levantamentos estimativos na década de 1990 propuseram que apenas 5% da diversidade de fungos eram conhecidos, com aproximadamente 69 mil espécies descritas na literatura. Visto que representam um dos grupos microbianos com o maior número de espécies na natureza, estimando-se 1,5 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 2001). Se entre esses 5%, já existam muitas de importância, como as que entram na fabricação de alimentos, incluindo bebidas, de ácidos orgânicos, de fármacos e inúmeros outros produtos, pode-se imaginar o que se espera com a descoberta de novas espécies com distintas propriedades potencialmente de valor biotecnológico (AZEVEDO, 1997).

Nos últimos 20 anos métodos moleculares aumentaram o conhecimento da diversidade desses organismos, estudos tentam comprovar a existência de um reino monofilético com aumento da diversidade entre linhagens divergentes. Ainda,

estimativas recentes elevaram o número de 1,5 para 5,1 milhões de espécies de fungos existentes e aproximadamente 100 mil espécies descritas (BLACKWELL, 2011).

Os fungos podem ser encontrados em uma grande diversidade de ambientes sobre diferentes condições, as quais alguns se adaptam a esses ambientes. Dentre estes habitats existem os gerais e alguns mais específicos como os que convivem ou atacam insetos (ALVES, 1998), como por exemplo as abelhas (FERRAZ et al., 2008).

Todas as espécies de insetos conhecidos abrigam uma comunidade rica e complexa de microrganismos em suas entranhas e outras regiões do corpo. Esta microbiota participa em muitos tipos de interações que vão desde a patogênese ao mutualismo obrigatório (DILLON e DILLON, 2004).

Existem cerca de 20 mil espécies de abelhas, as quais são distribuídas em dois grupos: as abelhas formadoras de colônias e as não formadoras, conhecidas como abelhas solitárias. As abelhas formadoras de colônias possuem de 300 a 400 espécies que não possuem ferrão e estão reunidas num grupo chamado Meliponíneos (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Estima-se que 200 espécies de abelhas sem ferrão vivem no Brasil, especialmente na região Amazônica, sendo conhecida como berço mundial das abelhas sem ferrão (IDAM, 2012).

Melíponas são abelhas grandes, que chegam a medir um centímetro e meio. Fazem a entrada dos seus ninhos usando barro e própolis. As mais conhecidas entre elas são a jupará, a uruçú, a jandaíra e a mel-de-pau. Os nomes populares muitas vezes não indicam com precisão a verdadeira identidade da abelha (NOGUEIRA-NETO, 1997). Embora não possuam ferrão desenvolvido, as melíponas são capazes de defender suas colônias de forma passiva, construindo seus ninhos em locais de difícil acesso, como troncos com paredes grossas, cavidades profundas no solo, dentro do ninho de insetos agressivos, por exemplo, formigas (CAMPOS e PERUQUETTI, 1999).

Todas as espécies de Meliponinae são sociais, isto é, vivem em colônias constituídas por muitas operárias, que realizam as tarefas de construção e manutenção da estrutura física da colônia, da coleta e do processamento do alimento, e uma rainha, responsável pela postura de ovos, os quais originam as fêmeas (rainhas e operárias) e a, pelo menos, parte dos machos (NOGUEIRA-NETO, 1997).

As melíponas são ainda pouco exploradas para a produção comercial de mel, mas possuem um papel muito importante na polinização de diversas espécies de plantas nativas de nosso continente e conforme o local onde vivem, as abelhas sem ferrão são responsáveis por 40 a 90% da polinização das árvores nativas (HEARD, 1999) e, em especial, na Amazônia, onde existem cerca de 129 espécies descritas destas abelhas (ALMEIDA, 2002). As melíponas estão mais aptas à polinização das árvores da nossa floresta e à cultura e realidade dos agricultores amazônicos (VENTURIERI, 2008b).

A produção de mel das abelhas sem ferrão é inferior à da abelha africanizada, mas possui melhor preço no mercado devido ser um produto especial, orgânico, mais raro e com particularidades de sabor e aroma, os quais dependem da flora e espécie que o originou (VENTURIERI, 2008a). Porém, a grande vantagem dos meliponíneos brasileiros não é a produção de mel e pólen, mas sim a polinização de nossas fanerógamas (KERR, 1997). A meliponicultura tem se desenvolvido com mais intensidade em diversas regiões do Brasil, especialmente no Norte e Nordeste, onde as espécies chamadas vulgarmente de urucu são mais produtivas (SILVA, 2006).

Com relação aos fungos sabe-se que cerca de 400 espécies de fungos atacam insetos e ácaros, o que estimula estudos voltados para utilização destes fungos como micofungicidas ou micoInseticidas (WAINWRIGHT, 1992). Segundo Azevedo (1997) fungos que atacam insetos, quando usados convenientemente, podem ser empregados no controle de insetos-pragas de plantas cultivadas ou mesmo de insetos vetores de doenças.

Os fungos vêm sendo muito estudados como entomopatógenos, particularmente de larvas (RABINOVITCH et al., 1998). Cassa-Barbosa (2001) e Souza (2001) relatam o potencial e aplicabilidade desses organismos na Amazônia. Apesar do Brasil ocupar uma posição privilegiada tanto em termos de biodiversidade quanto a sua capacidade de gerar recursos renováveis em grande escala, possui uma parcela pouco representativa do mercado mundial na produção desses fungos (LEMOS, 2006).

O fungo *Ascosphaera apis* caracteriza-se por causar mortalidade nas crias de abelha da espécie *A. mellifera*, conhecido como causador da doença “cria giz”, ocorre amplamente em regiões temperadas do Hemisfério Norte, mas tem se disseminado

para outros países, considerada a doença infecciosa mais difundida entre as abelhas *A. mellifera* (CASTAGNINO et al., 2006).

Durante o inverno de 2006-2007 os EUA sofreu perdas inexplicáveis em grande escala de colônias e mel de abelha (*A. mellifera*). Estudos identificaram um conjunto de sintomas que foram denominados **Colony Collapse Disorder (CCD)** e um único fator não é o único responsável pela doença, as abelhas foram expostas a uma ampla gama de pesticidas e pragas como vírus, ácaros e fungos (USDA, 2010). Segundo Bromenshenk et al. (2010), em 2010 o CCD, novamente devastou colônias de abelhas nos EUA, estudos identificaram vírus (IIV) (Iridoviridae), ácaros e fungos do gênero *Nosema*. Bromenshenk et al. (2010) citaram que a provável causa de perdas de abelhas nos EUA, Europa e Ásia seja a co-infecção por vírus IIV, *Nosema* e interação com ácaros.

As abelhas sem ferrão apresentam grande variedade de organismos associados a elas, como bactérias (CRUZ-LANDIM, 1996), fungos filamentosos e leveduras - muitas vezes são de ocorrência natural, e muitos destes microrganismos naturalmente associados às abelhas (GILLIAM et al., 1990; GILLIAM, 1997), sendo muitos ainda desconhecidos (ELTZ et al., 2002).

Relatos sobre a fauna associada às colônias de abelhas sem ferrão na Amazônia é escasso (SILVA et al., 2011). Apesar de estudos relatarem a microbiota de colmeias (CRUZ-LANDIM, 1996; TEIXEIRA et al., 2003; SANTOS, 2007; MORAIS et al., 2013) e méis de abelhas sem ferrão no Brasil (SOUZA et al., 2009a; ATOS et al., 2011) poucos estudos têm examinado diretamente a superfície do corpo desses organismos da região Amazônica (FERRAZ et al., 2008; SILVA et al., 2011).

A maioria das espécies de abelhas nativas sem ferrão carece de informações sobre seu comportamento, reprodução e sanidade. Ainda, um dos aspectos importantes sobre a biologia desses insetos é o conhecimento da microbiota fúngica, a qual pode causar enfermidade quando a imunidades destes insetos está deficiente (FERRAZ et al., 2008).

3 OBJETIVOS

GERAL

- Identificar a diversidade de fungos filamentosos associados a abelhas sem ferrão (*Melipona* spp.) em meliponários de Manaus e Iranduba, AM.

ESPECÍFICOS

- Identificar os fungos associados às abelhas sem ferrão;
- Verificar a variação sazonal período chuvoso e de estiagem sobre o nível de contaminação fúngica nas abelhas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E ISOLAMENTO FÚNGICO

Foram realizadas duas coletas de abelhas, uma no período de pico de chuva, no mês de março e outra no período de estiagem, no mês de setembro do ano de 2013 em criadouros artificiais de meliponicultores dos Municípios de Manaus (Meliponário Sucupira 30°04'17.15"S 59°53'10.27"W) (P1) e Iranduba (Sítio dos Tucanos 30°13'02.00"S 60°13'29.24"W) (P2), Amazonas.

Cada município teve um ponto de coleta, demarcado previamente, e em cada ponto quatro criadouros foram utilizados para o estudo. Foram coletadas seis abelhas por criadouro. As abelhas foram coletadas vivas com auxílio de pinças e transferidas para tubos individuais, esterilizados; o material foi acondicionado em caixa térmica sob refrigeração para morte e preservação das abelhas e conduzido ao Laboratório de Genética de Microrganismos - LAGEM, do Instituto de Ciências Biológicas - ICB da Universidade Federal do Amazonas - UFAM para posterior análises.

Em relação ao isolamento dos fungos a partir das amostras, foi seguido a metodologia segundo King et al. (1979), modificado, onde as abelhas mortas foram distribuídas em tubos contendo 10 mL de solução NaCl 0,9%, agitado e posteriormente foram retirados 100 µL da solução e transferidos para placas de Petri contendo Ágar Sabouraud e Ágar Batata Dextrose (BDA) com solução de antibiótico Amoxicilina 100 mg/L, em triplicata. O pH do meio de cultura foi aferido em 6.8. As placas foram mantidas em estufa de incubação BOD à temperatura de 28 °C por até 30 dias. Após o desenvolvimento da cultura, foram avaliados a presença de fungos a partir do isolamento realizado, bem como o índice de frequência de isolampelento.

TÉCNICA DE PURIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS MICROBIANAS ISOLADAS

A técnica da cultura monospórica foi utilizada para purificação das amostras de fungos. Com o auxílio de uma alça de platina foi retirado um pequeno fragmento de inóculo, e transferido para tubo contendo 1,0 mL de solução Tween 80, agitando em vórtex (SÃO JOSÉ et al., 1994).

A diluição foi feita em série, retirando-se 100 µL da suspensão da amostra, transferindo-a para um tubo contendo 900 µL de concentração de solução salina estéril (diluição 10^{-1}), a diluição foi então homogeneizada e a operação repetida em diluições sucessivas até a diluição de 10^{-3} .

Ao final da série de diluições, foi inoculada 100 µL das diluições 10^{-3} , em triplicata, nas placas contendo meio de cultura Ágar Sabouraud e Ágar Batata Dextrose (BDA), pH 6.8. As placas foram identificadas e incubadas em estufa BOD, à temperatura de 28 °C por um período de 48 horas. Após este período, iniciou-se a separação das colônias para tubos identificados contendo os mesmos meios de isolamento e incubados em estufa BOD por oito dias. As amostras puras foram repicadas em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud e BDA com pH 6.8, após cultivo por oito dias para posterior identificação.

TÉCNICA DE MICROCULTIVO EM LÂMINA

Foi utilizada a técnica de microcultivo em lâmina, segundo Riddell (1950), modificada, colocando-se inicialmente um pedaço circular de papel filtro sobre o fundo de uma placa de Petri, a qual recebeu o depósito sobre o papel de um par de lamínulas e uma lâmina 76 x 26 mm esterilizadas.

Dois blocos de BDA e ou Ágar Malte foram transferidos com uma espátula para a superfície central de uma lâmina estéril, depositada sobre papel filtro em placa de Petri estéril, nas quatro extremidades do bloco de ágar foi inoculado uma porção da colônia, com uma alça de inoculação, esterilizada em bico de Bunsen. Duas lamínulas

estéreis foram depositadas sobre a superfície do bloco de ágar com auxílio de uma pinça. Com uma pipeta, uma pequena quantidade de água destilada esterilizada foi depositada no fundo da placa, suficiente para cinco a sete dias.

Após o crescimento fúngico mostrar-se visualmente suficiente, as lamínulas foram cuidadosamente removidas para que não se rompesse mais do que o suficiente o micélio aderido na face inferior da lamínula. Colônias que não desenvolveram estruturas reprodutivas foram reinoculadas e submetidas à variação na temperatura, pH, luz e nutrientes para estimular o desenvolvimento reprodutivo.

As lamínulas então foram dispostas sobre uma gota do corante azul-de-lactofenol na superfície de uma lâmina de 76 x 26 mm e analisadas em microscopia óptica (ONIONS et al., 1981) para identificação de suas estruturas sexuais e/ou assexuais (ELLIS, 1971; BARNETT e HUNTER, 1972; ARX, 1974). De cada um dos isolados foram armazenadas duplicatas da colônia matriz e de duas monospóricas conforme o método Castellani (ARAÚJO et al., 2002) e mantidos em temperatura ambiente.

TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

A extração do DNA dos fungos filamentosos foi realizada com o Kit Plant/Fungi DNA Isolation da Norgen Biotek Corporation. O procedimento de extração foi seguido conforme o protocolo do fabricante, sendo transferido 50 mg de micélio para um gral e macerado com 500 µL de Lysis Solution.

O macerado foi transferido para microtubo de plástico de 2,0 mL adicionando-se 100 µL de Lysis Additive e incubando a 65 °C por dez minutos. Ao término deste processo foi adicionado 100 µL de Binding Solution e incubado a - 4 °C por dez minutos.

O material posteriormente foi centrifugado a 14 mil rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado igual volume de etanol 70%, onde 600 µL dessa solução foi transferida para uma "Binding Column" e centrifugada a 14 mil rpm por um minuto, a solução depositada no tubo sob a coluna foi

descartada e adicionado sobre a coluna 500 μL "Wash Solution" e levado a centrifuga a 14 mil rpm por um minuto (procedimento realizado por duas vezes).

Após lavagem a coluna foi centrifugada a 14 mil rpm por dois minutos para retirar o restante de solução, ao término foi adicionado 50 μL de "Elution Buffer" à coluna e centrifugado a 2 mil rpm por dois minutos e posteriormente a 14 mil rpm por um minuto.

O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose-TEB (0,8%) 1X e corado com brometo de etídio (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O gel foi submetido a uma corrente de 80V por 45 minutos, e após a corrida, as bandas foram visualizado em detector de luz ultravioleta e fotografado no equipamento U.V. (Major Science Compact 2.0 MP CCD Image System).

AMPLIFICAÇÃO DO rDNA DA REGIÃO ITS PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O DNA dos isolados foi submetido à amplificação das regiões ITS do rDNA (ITS1-5.8S-ITS2), utilizando-se os oligonucleotídeos ITS1 (5'-TTCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), conforme Anderson e Cairney (2004).

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 μL , contendo 13,2 de H_2O Milli-Q, 1,0 μL de cada um dos oligonucleotídeos (ITS1 e ITS4), 2,5 μL de MgCl_2 (25 mM), 2,5 μL de dNTP (5 mM), 2,5 μL de tampão da Taq 10X, 0,3 μL de Taq DNA Polimerase e 2,0 μL de DNA.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador BIONNER programado da seguinte forma: um ciclo a 95 °C durante dois minutos, seguido de 34 ciclos de 40 segundos a 94 °C (desnaturação), um minuto a 58 °C (anelamento) e um minuto a 72 °C (extensão), e uma extensão final por dois minutos a 72 °C.

Os produtos da reação de amplificação foram detectados utilizando eletroforese em gel de agarose-TEB (1%) 1X, juntamente com o marcador GeneRuler 1Kb DNA Ladder da Thermo Scientific e corado com brometo de etídio (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o gel foi

submetido a uma corrente de 80V por uma hora e 45 minutos, e após a corrida, as bandas foram visualizadas em detector de luz ultravioleta e fotografado no equipamento U.V. (Major Science Compact 2.0 MP CCD Image System), o qual apresentou bandas acima de 500pb (**Figura 21 A**).

SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Os produtos de PCR foram tratados com solução PEG (20% w/v de PEG, 2,5 M NaCl).

Solução PEG	10,0 g de polietileno glicol
	7,3 g de NaCl
	ddH ₂ O até 45 mL

Foram adicionados 10 µL da PCR e igual volume de PEG em microtubo de plástico de 0,5 mL e incubado a 37 °C durante 15 minutos, sendo posteriormente centrifugado (~ 2500 x rcf) durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 125 µL de etanol 80% frio e centrifugado (~ 1450 x rcf) durante dois minutos, posteriormente o etanol foi descartado e o tubo foi colocado para secar e remover qualquer vestígio de etanol, após esse procedimento o tubo foi incubado a 37 °C durante quinze minutos e adicionado posteriormente 14 µL de H₂O Milli-Q para resuspende o material genético.

Reação de Sequenciamento

Para preparar o mix de reagentes foram utilizados:

Big Dye Terminator (v3.1) - 2 µL

Tampão 5x replacement buffer - 2 µL

H₂O Milli-Q - 4 µL

Oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 (5,0 pmol/ µL) - 1 µL

DNA - 1 μ L

Volume final - 10 μ L

As amostras foram transferidas para microplacas e submetidas a condições específicas de PCR para reação de sequenciamento:

Etapa 1

- 96 °C - 1 minuto
- Ciclos = 1

Etapa 2

- 96 °C – 10 segundos
- 50 °C – 15 segundos
- 60 °C – 1 minuto e 15 segundos
- Ciclos = 15

Etapa 3

- 96 °C – 10 segundos
- 50 °C – 15 segundos
- 60 °C – 1 minuto e 30 segundos
- Ciclos = 5

Etapa 4

- 96 °C – 10 segundos
- 50 °C – 15 segundos
- 60 °C – 2 minutos
- Ciclos = 5

Etapa 5

- 15 °C – forever

Precipitação da Reação de Sequenciamento

Para 10,0 μL da reação usou-se 1,0 μL de acetato de amônia e 27,5 μL de etanol absoluto. O acetato de amônia faz parte do kit de sequenciamento do fabricante do sequenciador.

Após a adição do acetato de amônia e do etanol absoluto a placa foi selada e levada ao vórtex por um minuto e incubada a temperatura ambiente por vinte minutos e protegida de luz, e posterior centrifugada por 40 minutos a 4000 g a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e adicionado 120 μL de etanol 70%, a placa foi levada ao vórtex e centrifugada por dez minutos a 4000 g a 4 °C, o etanol foi descartado e a placa centrifugada invertida por alguns segundos a 700 g a 4 °C, ao término aguardou-se a placa secar até evaporar o etanol para adicionar 10 μL de loading buffer e homogeneizou-se a solução.

Os procedimentos para reação de sequenciamento foram seguidos conforme especificação do fabricante do sequenciador ABI 3500xL Genetic Analyzer, um sistema de análise de DNA de 24 capilares com a tecnologia Applied Biosystems (Life Technologies). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As corridas foram realizadas em capilares de 50 cm utilizando polímero POP7. As sequências foram analisadas pelo Software Sequencing Analysis versão 5.4, Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers.

5 RESULTADOS

FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE ABELHAS SEM FERRÃO

Foram isoladas 482 colônias fúngicas das quatro coletas de abelhas realizadas no presente trabalho, onde 16 gêneros foram identificados. Dentre o total de isolados, 65 colônias não foram identificadas (*Incertae sedis*) através das estruturas morfológicas, ressaltando que esses isolados necessitam de mais estudos para determinar suas identidades. Ainda, 120 colônias foram consideradas *Mycelia sterilia*, e apesar das técnicas utilizadas essas colônias não desenvolveram estruturas reprodutivas no ambiente laboratorial.

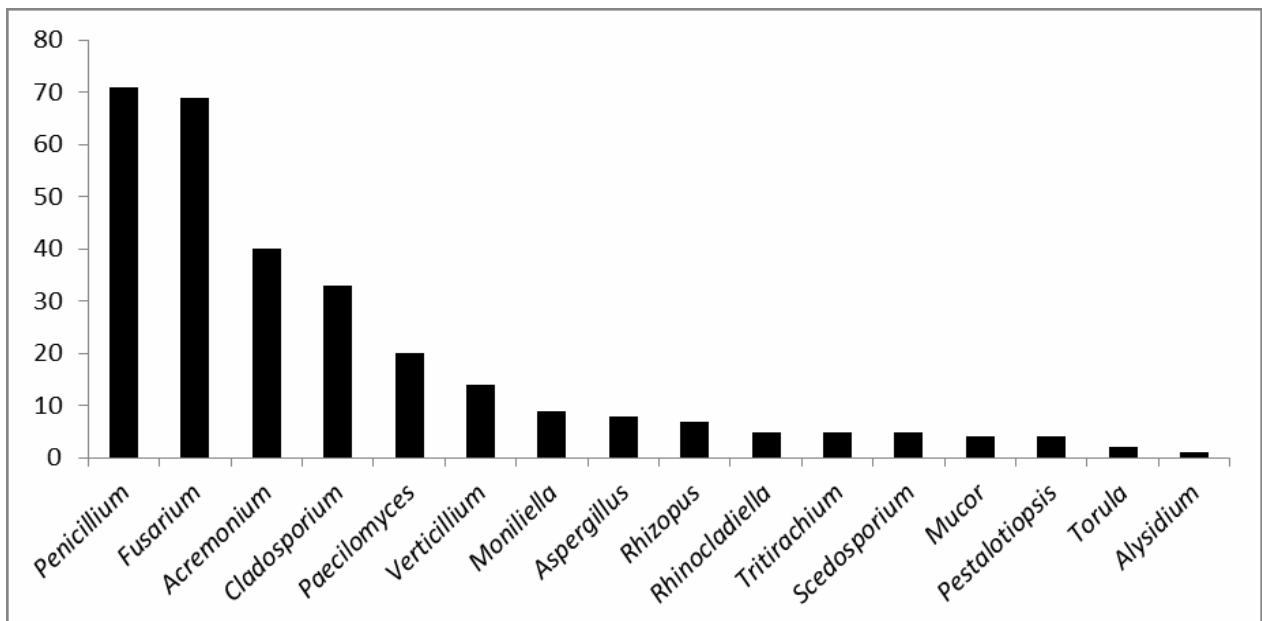


Figura 01. Gêneros de fungos filamentosos identificados por morfologia clássica, isolados da superfície corpórea de abelhas sem ferrão coletadas no ano de 2013, nos períodos chuvoso e de estiagem, nos municípios de Manaus e Iranduba

Das colônias obtidas 297 foram identificadas morfologicamente em nível de gênero, *Penicillium* (71), *Fusarium* (69), *Acremonium* (40) e *Cladosporium* (33) onde os mesmos foram os mais predominantes (**Figura 01**), totalizando 72% dos identificados, sendo estes isolados em todas as abelhas estudadas. Na outra vertente os gêneros *Pestalotiopsis*, *Torula* e *Alysidium* foram os isolados menos predominantes sendo

encontrados em apenas um ponto de coleta no período chuvoso no município de Manaus (P1) (**Figura 02**).

Ao se comparar o período chuvoso com o de estiagem, verificou-se que o total de identificados no período chuvoso foi de 162 colônias com percentual de 54% distribuídas em 16 gêneros, seguido de 135 colônias no período de estiagem, 46% com 14 gêneros identificados. Já, no período chuvoso apresentou maior diversidade e número de cepas identificadas em destaque para os gêneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Acremonium*, que apresentaram valores bem superiores aos demais. No período de estiagem os gêneros *Penicillium* e *Fusarium* mantiveram resultados elevados, sendo que o gênero *Cladosporium* apresentou valor significativo quando comparado com o período chuvoso (**Figuras 02 e 03**).

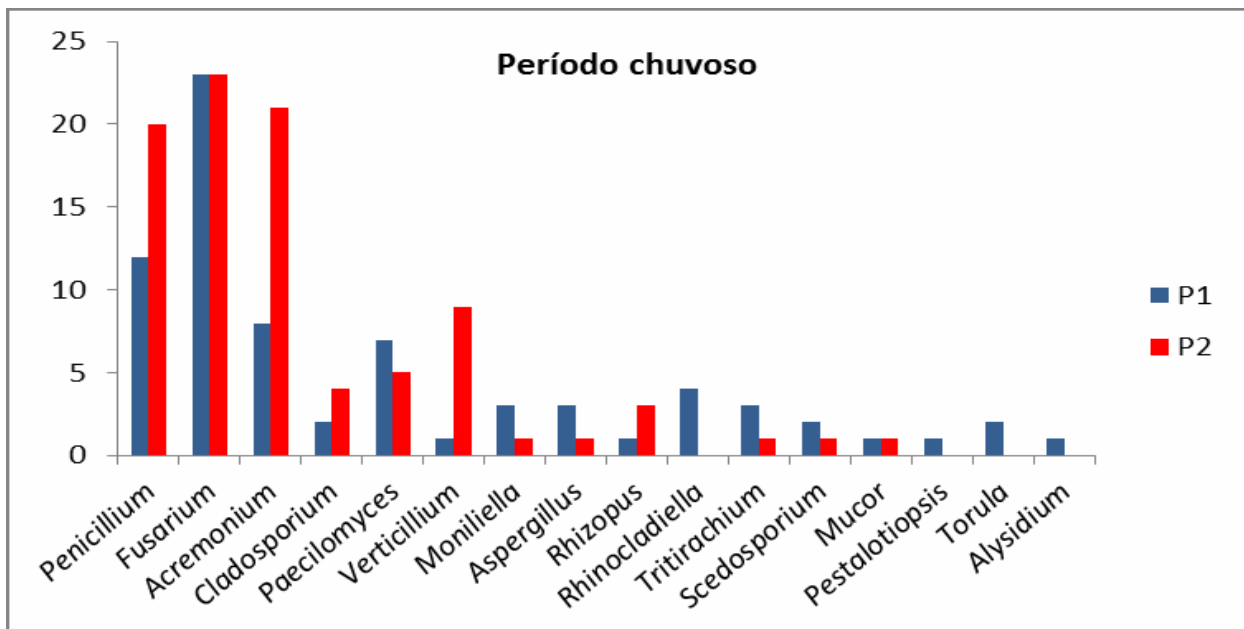


Figura 02. Gênero de fungos filamentosos isolados da superfície corpórea de abelhas sem ferrão no período chuvoso do ano de 2013, nos municípios de Manaus, Meliponário Sucupira (P1) e Iranduba, Meliponário dos Tucanos (P2)

Trinta e dois isolados do período chuvoso e 33 do período de estiagem não foram identificados (*Incertae sedis*), apesar de apresentarem características reprodutivas, demonstrando que o número de gêneros identificados poderia ser superior aos resultados apresentados.

Todos os isolados foram purificados, classificados e armazenados em tubos criogênicos contendo água destilada esterilizada. Os estoques foram mantidos em temperatura ambiente na micoteca do LAGEM UFAM.

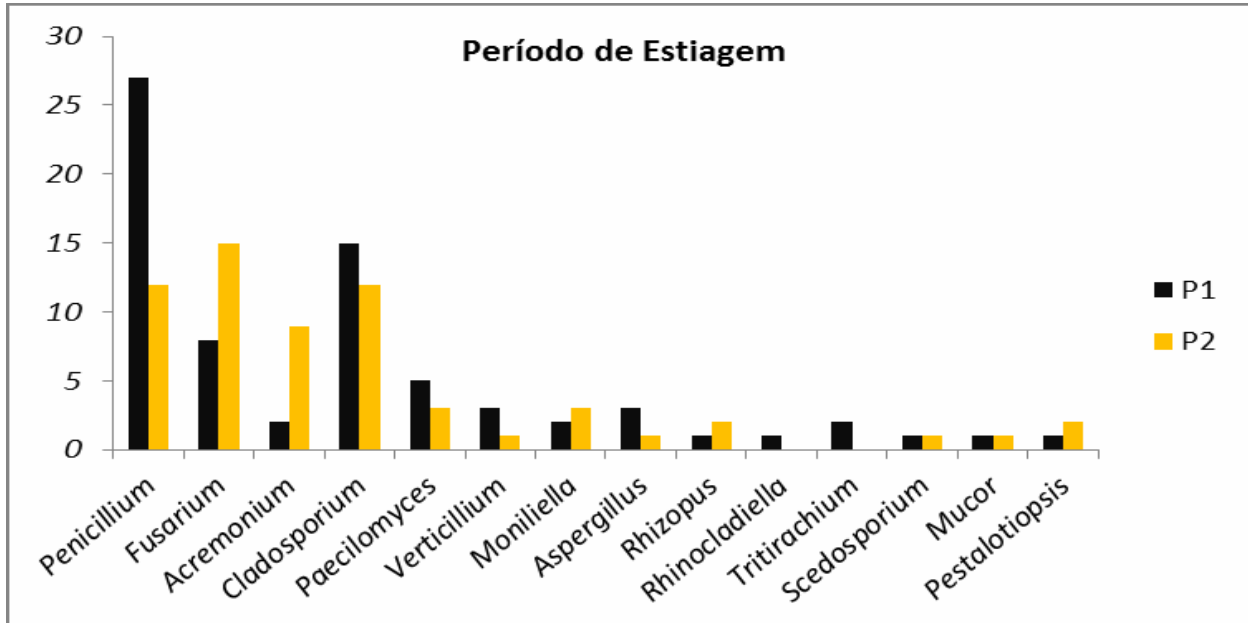


Figura 03. Gênero de fungos filamentosos isolados da superfície corpórea de abelhas sem ferrão no período de estiagem do ano de 2013, nos municípios de Manaus, Meliponário Sucupira (P1) e Iranduba, Meliponário dos Tucanos (P2)

CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROMORFOLÓGICA DOS FUNGOS

Penicillium

Colônias apresentando crescimento lento, textura aveludada, coloração verde escuro, com bordas regulares. Conidióforos longos hialinos, eretos, as fiálides são agregadas, compactas, afinando gradualmente ou cilíndricas com extremidades pontiagudas, compostas por cadeias de massas conidiais. Conídios fialósporos, catenulados, hialinos ou castanho-amarelado, produzidos em massa, possuem forma esférica, elíptica ou oval, são unicelulares, lisos ou de superfície equinulada (WATANABE, 2002) (**Figura 04**).

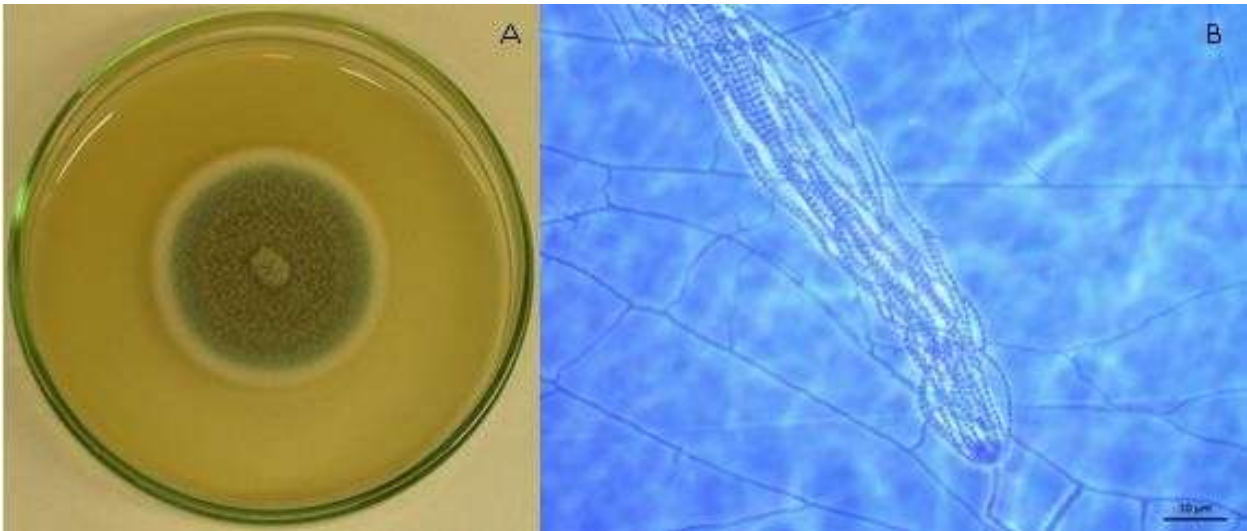


Figura 04. Morfologia do gênero *Penicillium* isolado de abelha sem ferrão no município de Manaus (P1), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Fusarium

Colônias apresentando crescimento lento, textura cotonosa, coloração variando de branca a vermelha, de amarela a lilás com bordas regulares. Micélio denso. Forma hifas ramificadas, septadas; dois tipos de conídios; macro e microconídios e estruturas assexuadas de resistências, clamidósporos. Quando presentes os clamidósporos podem ser terminais, intercalados, isolados ou em cadeias (LACAZ et al., 1998) (**Figura 05**).

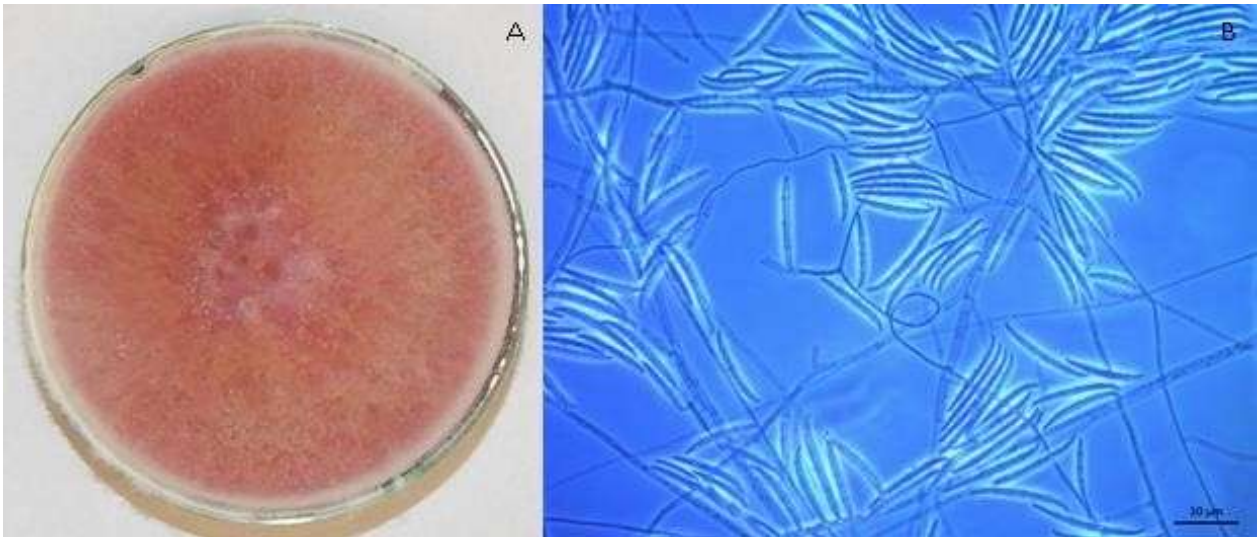


Figura 05. Morfologia do gênero *Fusarium* isolado de abelha sem ferrão no município de Iranduba (P2), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Acremonium

Colônias geralmente apresentando crescimento lento, textura lisa, parafinada ou aveludada, podendo tornar-se algodosa, de coloração branca a cinza. Hifas septadas hialina, muitas vezes, compactas e unidas no início, de coloração camurça e podendo ser branca, cinza, rosa ou alaranjada. Conídios são geralmente unicelulares, hialinos ou pigmentados, globosos a cilíndrico, e principalmente agregados na extremidade da fiálide (FISHER e COOK, 2001) (**Figura 06**).

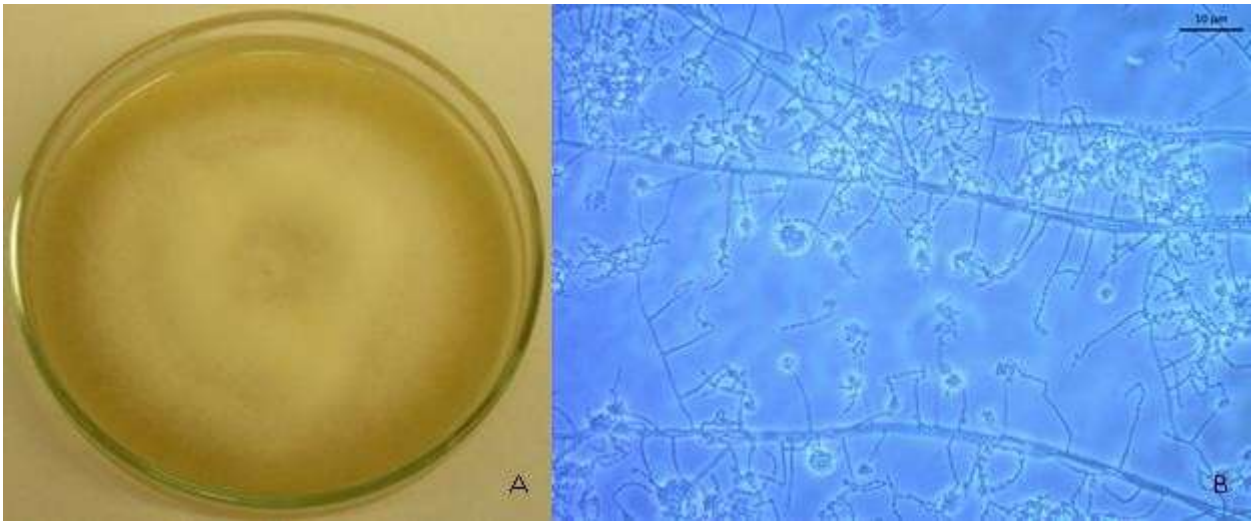


Figura 06. Morfologia do gênero *Acremonium* isolado de abelha sem ferrão no município de Iranduba (P2), ano de 2013, período de estiagem, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Cladosporium

Colônias geralmente apresentando crescimento lento, textura efusa ou ocasionalmente puntiformes de coloração muitas vezes olivácea podendo ser também acinzentadas à marrom escuro. A superfície desse fungo pode ter aparência de pelos ou flocosas. Hifas septadas de coloração demácia. Conidióforos macronematosos, semi-macronematosos ou micronematosos. Conídios poliblasticos usualmente integrados, terminais, simpodiais de formato cilíndrico, ovóides, doliformes, fusiformes, elipsóides, esféricos ou sub-esféricos, podendo ser produzidos em cadeias, solitários em algumas espécies, conídios mais largos e algumas vezes são ramificados em cadeia acropleurógena. Possuem coloração marrom olivácea escuro ou marrom, a superfície do conídio pode ser lisa, verrugosa ou equinulada (ELLIS, 1971) (**Figura 07**).

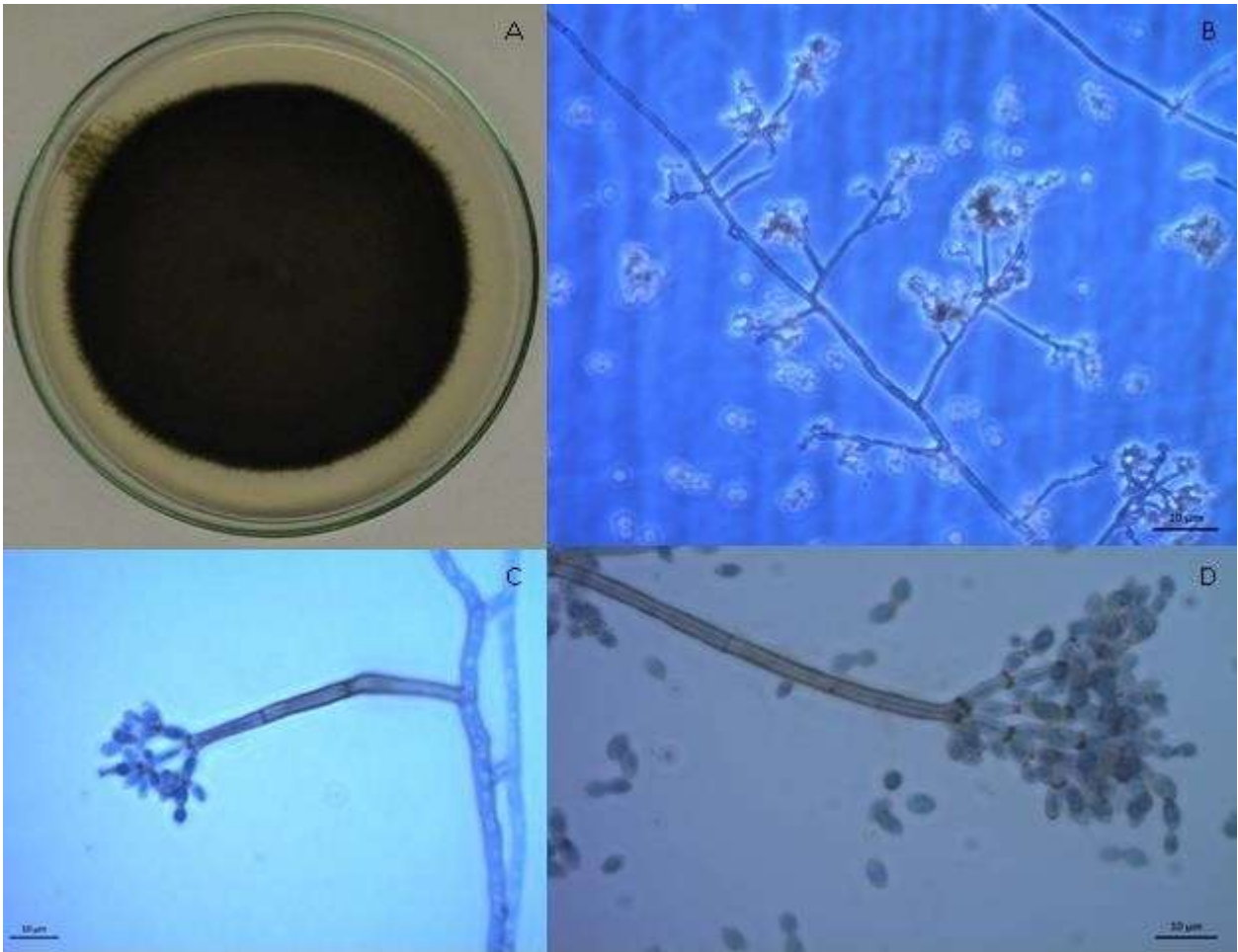


Figura 07. Morfologia do gênero *Cladosporium* isolado de abelha sem ferrão no município de Manaus (P1), ano de 2013, período de estiagem, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B, C e D)

Paecilomyces

Colônias apresentando crescimento lento, textura pulverulenta ou aveludada de coloração amarelada, lilás, cinza ou bronze. Hifas septadas de coloração hialina. As estruturas lembram as de um *Penicillium*, apresenta conidióforos simples e fiáldes mais alongadas que este. Os conídios são elípticos ou oblongos, hialinos ou pigmentados, ocorrendo em grandes cadeias lineares (PIZZIRANI-KLEINER et al., 2010) (**Figura 08**).



Figura 08. Morfologia do gênero *Paecilomyces* isolado de abelha sem ferrão no município de Manaus (P1), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Verticillium

Colônias apresentando crescimento lento, textura aveludada ou cotonosa de coloração branca a amarelada, tornando-se acinzentada, vermelha, verde e amarelada. Possuem micélio septado hialino, formando alguns dos ramos verticilado. Conidióforos lisos, ramificados, conídios ovóides a elipsóides, hialinos, unicelulares, produzidos individualmente ou em pequenos grupos apicalmente, úmidos (BARNETT e HUNTER, 1972) (**Figura 09**).

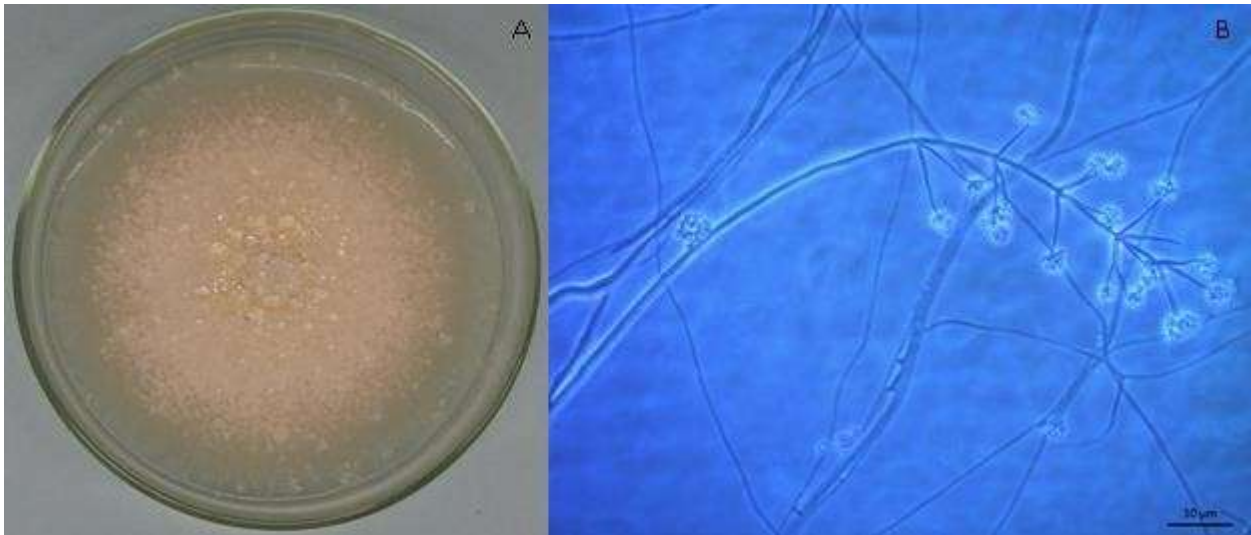


Figura 09. Morfologia do gênero *Verticillium* isolado de abelha sem ferrão no município de Iranduba (P2), ano de 2013 período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Moniliella

Colônias geralmente apresentando crescimento lento, textura suave, cerebriforme ou aveludada de coloração inicialmente creme, muitas vezes tornando-se logo oliváceas; variando do oliváceo pálido ao castanho-escuro. Células em brotamento muitas vezes presentes, elipsoidais para subcilíndricas, muitas vezes compondo um pseudomicélio. Hifas hialinas, de paredes espessas, quase asseptadas ou hifas marrons que podem ser ramificadas na região apical ou podem formar conídios de paredes espessas de um ápice inflado. Os conídios geralmente unicelulares, surgindo em cadeias acrópetas de hifas indiferenciadas, muitas vezes formando por desarticulação de hifas de apoio, grandes e após o desprendimento, muitas vezes tornando-se marrom e paredes grossas. Clamidósporos ocasionalmente presentes, unicelulares, de paredes espessas, marrom escuro, subglobosos (STOLK e DAKIN, 1966) (**Figura 10**).

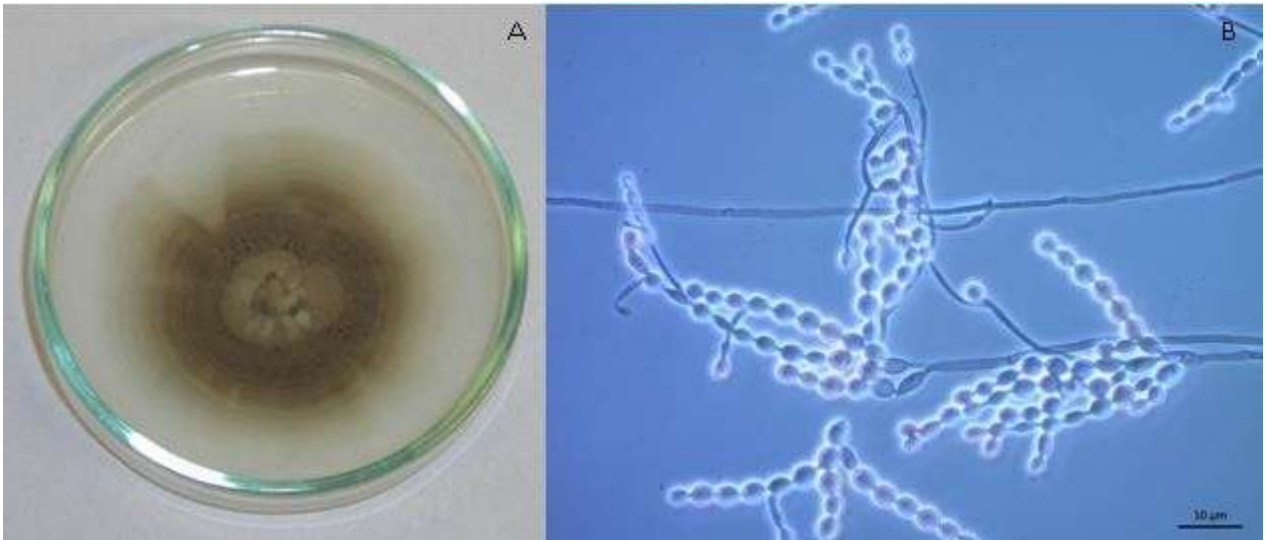


Figura 10. Morfologia do gênero *Moniliella* isolado de abelha sem ferrão no município de Iranduba (P2), ano de 2013, período de estiagem, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Aspergillus

Colônias apresentando crescimento lento, textura aveludada a cotonosa, pulverulenta de coloração inicialmente branca, tornando-se amarela, verde, marrom ou preta, dependendo da espécie. Conidióforos eretos sem ramificações, originados em uma célula pé e terminado em uma vesícula globosa da qual surgem fiálides em formas de ampolas. As fiálides produzem uma cadeia de conídios globosos unicelulares em cadeia (PIZZIRANI-KLEINER et al., 2010) (**Figura 11**).

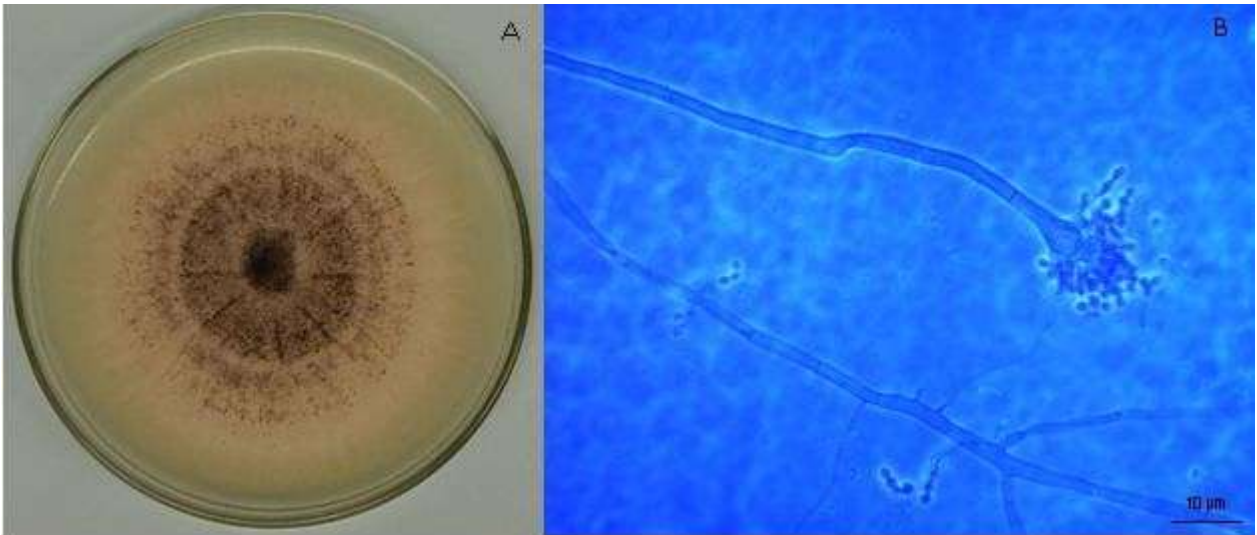


Figura 11. Morfologia do gênero *Aspegillus* isolado de abelha sem ferrão no município de Manaus (P1), ano de 2013, período de estiagem, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Rhizopus

Colônias deste gênero apresentam crescimento rápido, textura flocosa ou lanosa de coloração inicialmente branca tornando-se marrom-acinzentado. Micélio bem desenvolvido com hifas cenocíticas. Apresentam rizóides submersos no meio de cultura e apresenta duas a três ramificações de esporangióforo. Esporângios escuros, globosos e no seu interior contém esporangiósporos esféricos a ovais, limoniformes, elípticos e amerosseptados e de coloração castanha (FISHER e COOK, 2001) (**Figura 12**).

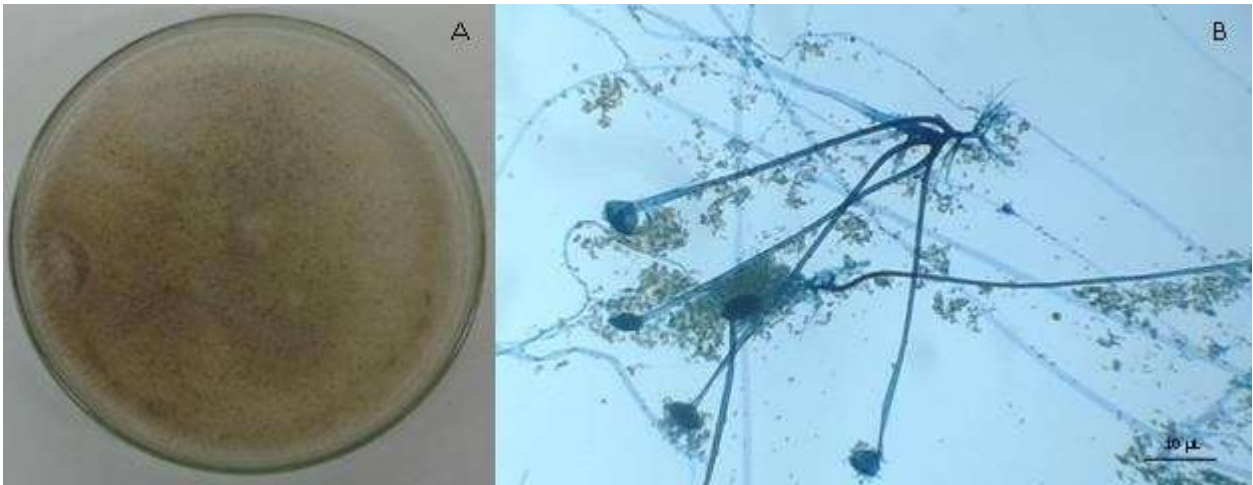


Figura 12. Morfologia do gênero *Rhizopus* isolado de abelha sem ferrão no município de Iranduba (P2), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Rhinocladiella

Colônias apresentam crescimento lento, textura aveludada a cotonosa de coloração inicialmente branca, cinza a marrom. Conidióforos simples ou ramificados em algumas espécies, marrom, parte superior do esporo é alongado pelo crescimento simpodial. Conídios apicais em novos pontos de crescimento, sub-hialina a escuro, geralmente unicelular, ovóide a oblongo elipsóide (BARNETT e HUNTER, 1972) (**Figura 13**).

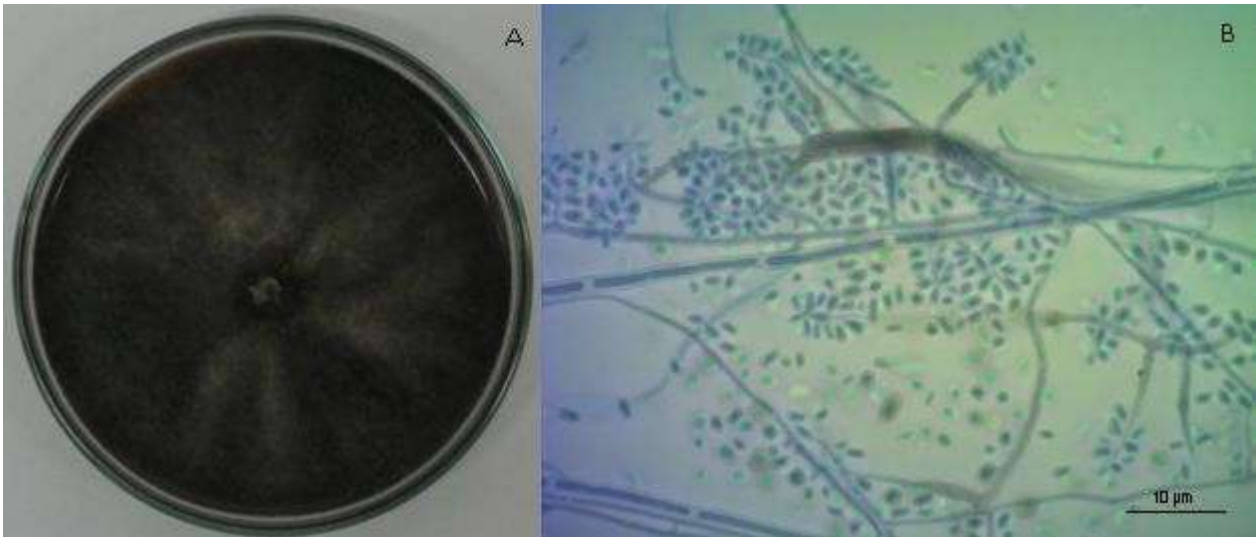


Figura 13. Morfologia do gênero *Rhinocladiella* isolado de abelha sem ferrão no município de Manaus (P1), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Tritirachium

Colônias apresentam crescimento lento, textura aveludada a cotonosa de coloração branca. Micélio hialino, ramificado, septado, sinuoso, delgado. Conidióforos longos, eretos ou deitados, septados, verticilados ramificados, às vezes biverticilados ou triverticilados. Conídios apicais em novo ponto de crescimento; hialina, unicelular, globosa ou ovóide (BARNETT e HUNTER, 1972) (**Figura 14**).

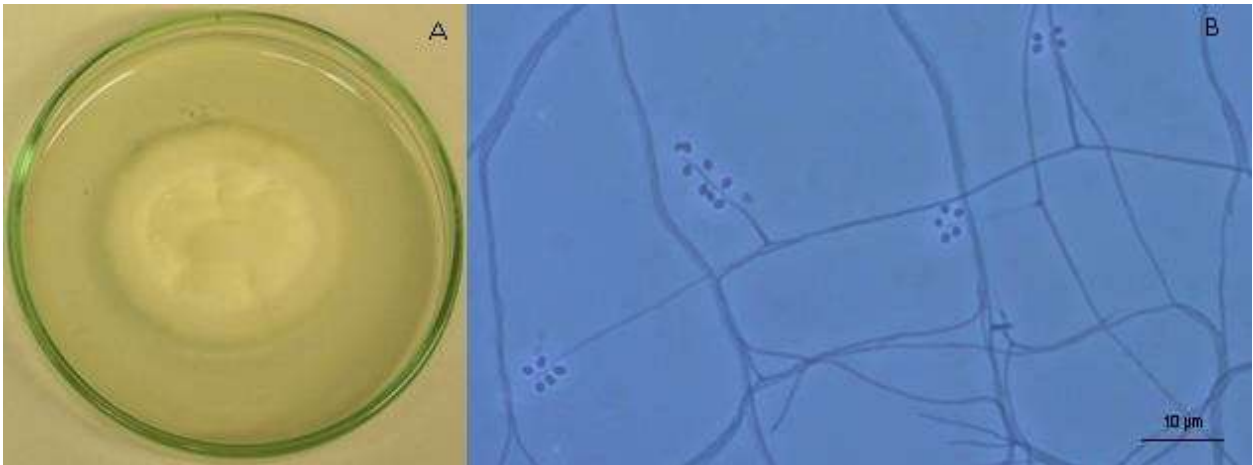


Figura 14. Morfologia do gênero *Tritirachium* isolado de abelha sem ferrão no município de Manaus (P1), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Scedosporium

Colônias apresentam crescimento lento, textura aveludada de coloração clara a oliva-cinza a quase negra. Hifas hialinas, septadas, ramificadas. Conídios unicelulares e piriformes, clavados ou ovóides, lisos, oliváceos a marrom-claro, com base truncada (FISHER e COOK, 2001) (**Figura 15**).

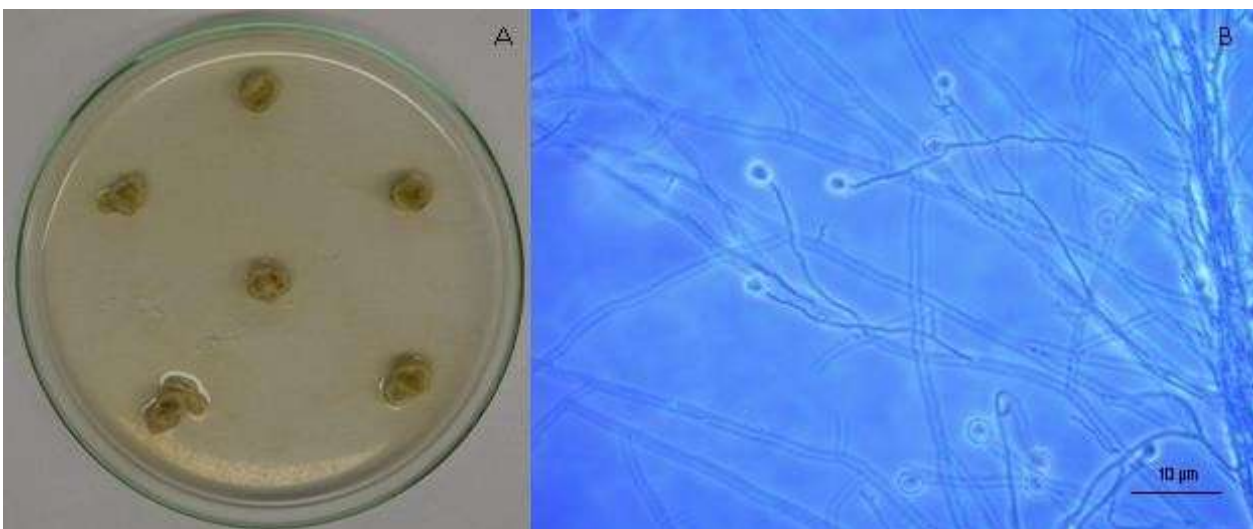


Figura 15. Morfologia do gênero *Scedosporium* isolado de abelha sem ferrão no município de Manaus (P1), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Mucor

Colônias deste gênero apresentam crescimento rápido, textura algodonosa ou lanosa de coloração inicialmente branca tornando-se cinza ou amarelada. Micélio aéreo abundante e entrelaçado. Hifas hialinas predominantemente asseptadas ou esparsamente septadas e largas, ausência de estolões e rizóides. Esporangióforos irregulares, longos, retos ou curtos, ramificações irregulares ocorrem frequentemente, formações unicelulares, ovóides a elípticos, amarelos, castanhos, marrons a negros com a idade, esporângios terminais esféricos, grandes e hialinos ou coloridos. Columelas em geral hemisféricas e colaretes nas porções basais dos esporângios. Esporos endógenos elipsóides ou globosos, hialinos ou coloridos (FISHER e COOK, 2001) (**Figura 16**).



Figura 16. Morfologia do gênero *Mucor* isolado de abelha sem ferrão no município de Iranduba (P2), ano de 2013, período de estiagem, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Pestalotiopsis

Colônias apresentam crescimento lento, textura aveludada a algodonosa de coloração branca a cinza. Micélio imerso, ramificado, septado, hialino a marrom pálido.

Conidiomas acervular, epidérmico a subepidérmico, separados ou confluentes, textura de paredes finas. Conidióforos hialinos, ramificados e septados na base e acima, cilíndricos ou limoniformes, formado a partir das células superiores do pseudoparênquima. Células conidiogênicas holoblásticas, anelídicas, indeterminadas, integradas, cilíndricas, hialinas, lisas, com várias proliferações percurrentes. Conídios fusiformes, reto ou ligeiramente curvo; quatro septos, células basais hialinas, truncadas, com um apêndice endógeno, simples ou raramente ramificado; célula apical cônica, hialina, com dois ou mais apêndices apicais, simples ou ramificados; células medianas, marrons, às vezes versicolor, com paredes mais espessas, lisas ou verruculosas (SUTTON, 1980) (**Figura 17**).

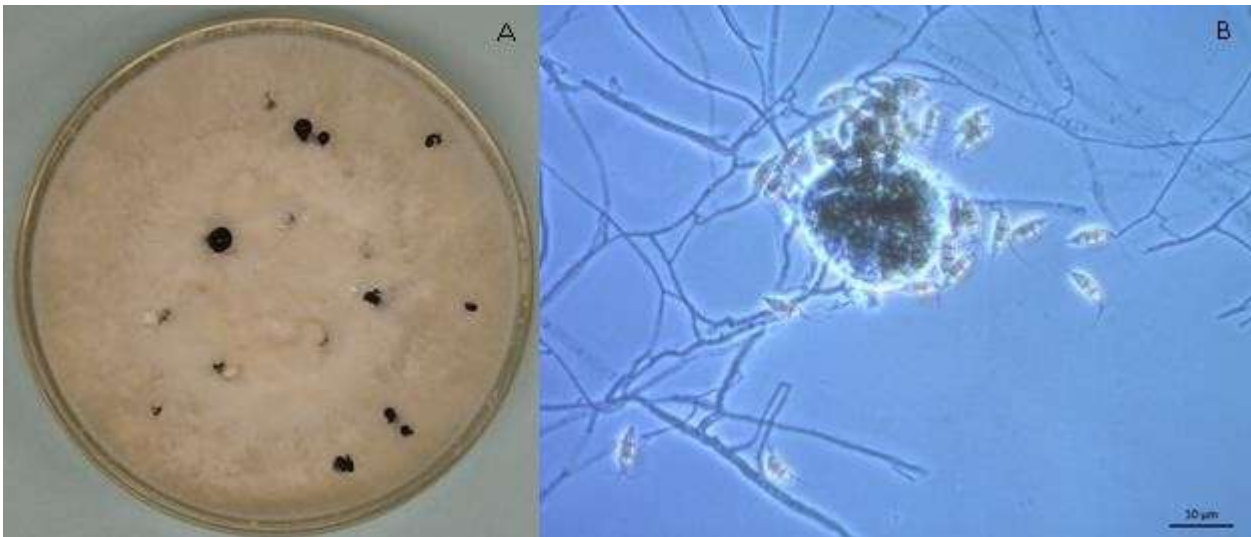


Figura 17. Morfologia do gênero *Pestalotiopsis* isolado de abelha sem ferrão no município de Iranduba (P2), ano de 2013, período de estiagem, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Torula

Colônias apresentam crescimento lento, textura pulverulenta ou aveludada de coloração cinza, tornando-se verde. Micélio septado, marrom. Conidióforo curto ou inexistente, ramos inteiros desenvolvimento em cadeias curtas ou longas, conídios

globosos ou subglobosos, verrugosos, escuros, lisos ou equinulados, em cadeias acrópetas, simples ou ramificadas (BARNETT e HUNTER, 1972) (**Figura 18**).

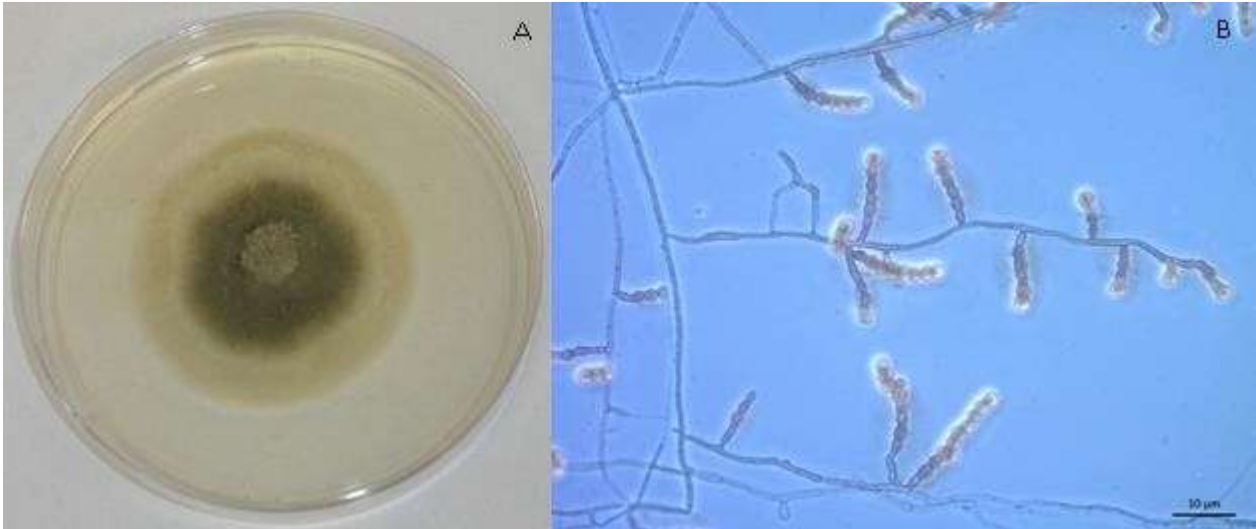


Figura 18. Morfologia do gênero *Torula* isolado de abelha sem ferrão no município de Manaus (P1), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

Alysidium

Colônias apresentam crescimento, textura aveludada ou algodonosa de coloração branca. Micélio septado em parte superficial, parcialmente imerso, cerdas ausentes, hifopodia ausente. Hifas ramificadas, pálidas ou escuras. Conidióforos semi-macronematous. Células conidiogênicas monoblásticas e poliblásticas. Os conídios muitas vezes em cadeias ramificados, esféricos, ovais, limoniformes, elipsóides ou oblongos, lisos, pálidos ou de cor escura (ELLIS, 1971) (**Figura 19**).

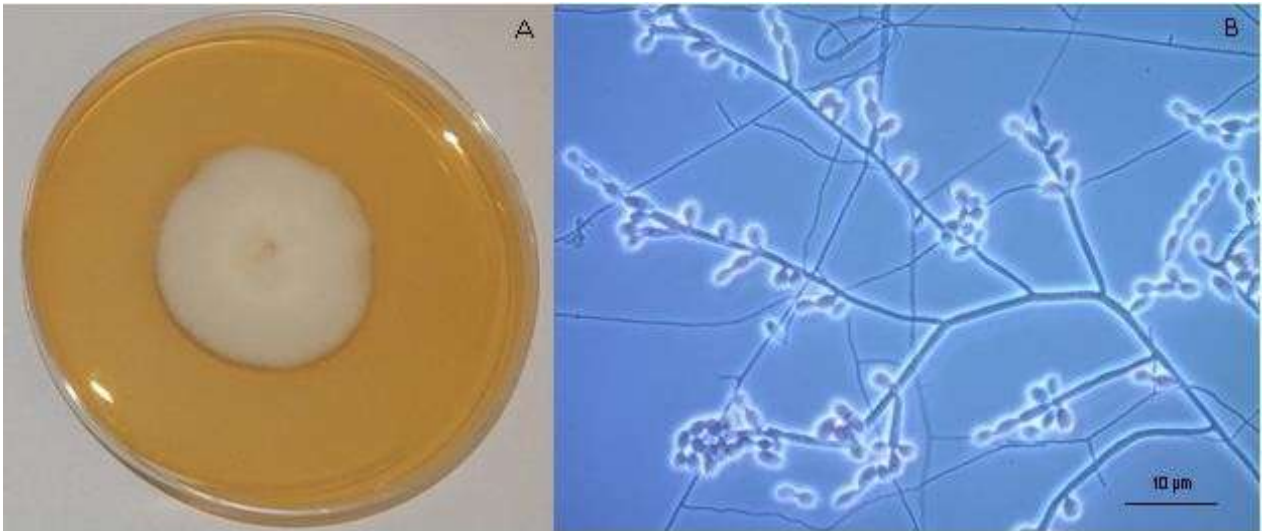


Figura 19. Morfologia do gênero *Alysidium* isolado de abelha sem ferrão no município de Manaus (P1), ano de 2013, período chuvoso, características morfológicas macro (A) e microscópicas (B)

5.3 ISOLADOS IDENTIFICADOS APÓS SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS DO rDNA

Das 482 colônias fúngicas isoladas 297 foram identificadas a nível de gênero por meio de análises das estruturas morfológicas e 65 foram considerados *Incertae sedis*. As 297 colônias identificadas e as 65 *Incertae sedis* foram separadas em grupos morfológicos para análise genética. Foram sequenciadas 73 colônias dentre os dezesseis gêneros identificados na morfologia e 15 *Incertae sedis*.

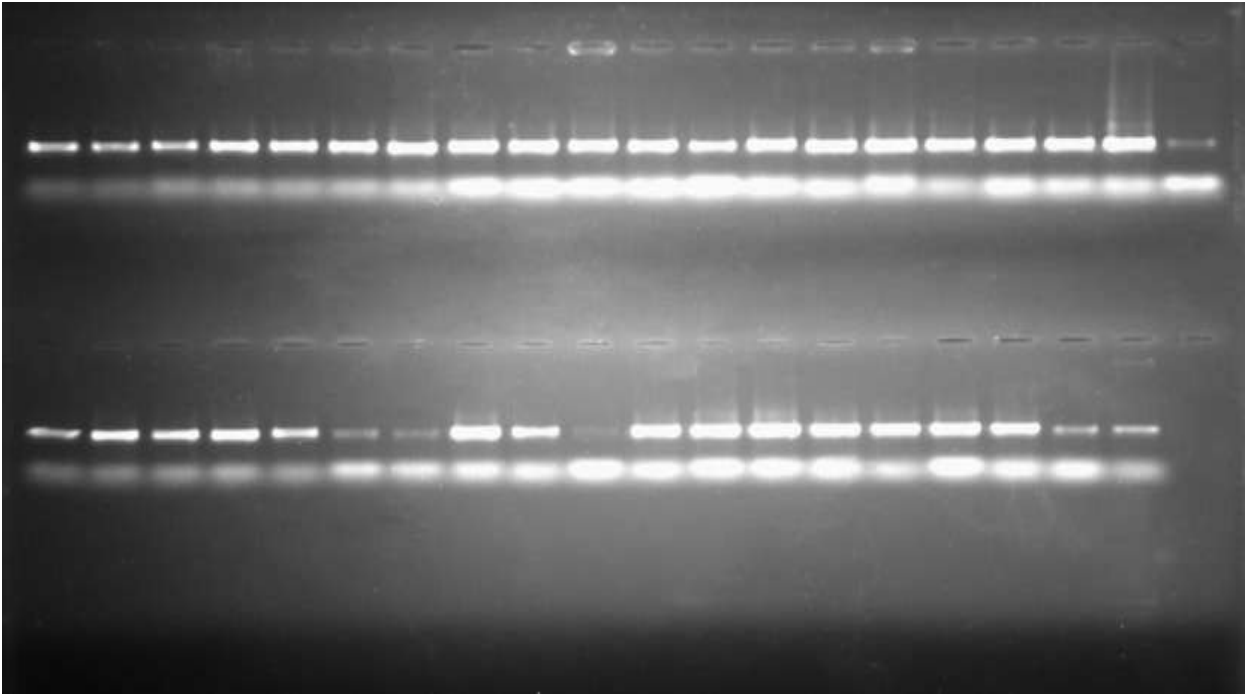


Figura 20. Gel de agarose com DNA dos fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão nos períodos chuvoso e de estiagem do ano de 2013, nos municípios de Manaus e Iranduba, AM

A utilização de técnicas de biologia molecular para identificar fungos associados a abelhas sem ferrão foi fundamental para confirmar gêneros já identificados pela morfologia clássica, corrigir erros associados a gêneros morfologicamente parecidos e identificar aqueles organismos que a morfologia não identificou (**Figura 20** e **Figura 21**). Os produtos obtidos na amplificação das regiões ITS1 e ITS4, revelaram um fragmento de aproximadamente 540 a 600 pb para todos os isolados analisados.

A identificação dos fungos com base em caracteres morfológicos e moleculares busca aumentar o conhecimento sobre sua diversidade na Amazônia. Os depósitos das sequências moleculares tropicais nos bancos de dados contribuirão para os estudos de filogenia de diversos grupos, uma vez que auxiliarão no entendimento dos fatores evolutivos que moldam a diversidade global de fungos (ISHIKAWA et al., 2012).

O espaço transcrito das regiões ITS's são altamente conservados entre indivíduos da mesma espécie, mas bastante divergentes e variam entre as espécies dentro de um gênero, tornaram-se uma das ferramentas mais úteis para ajudar na identificação de fungos e análise filogenética (LIU et al., 2010).

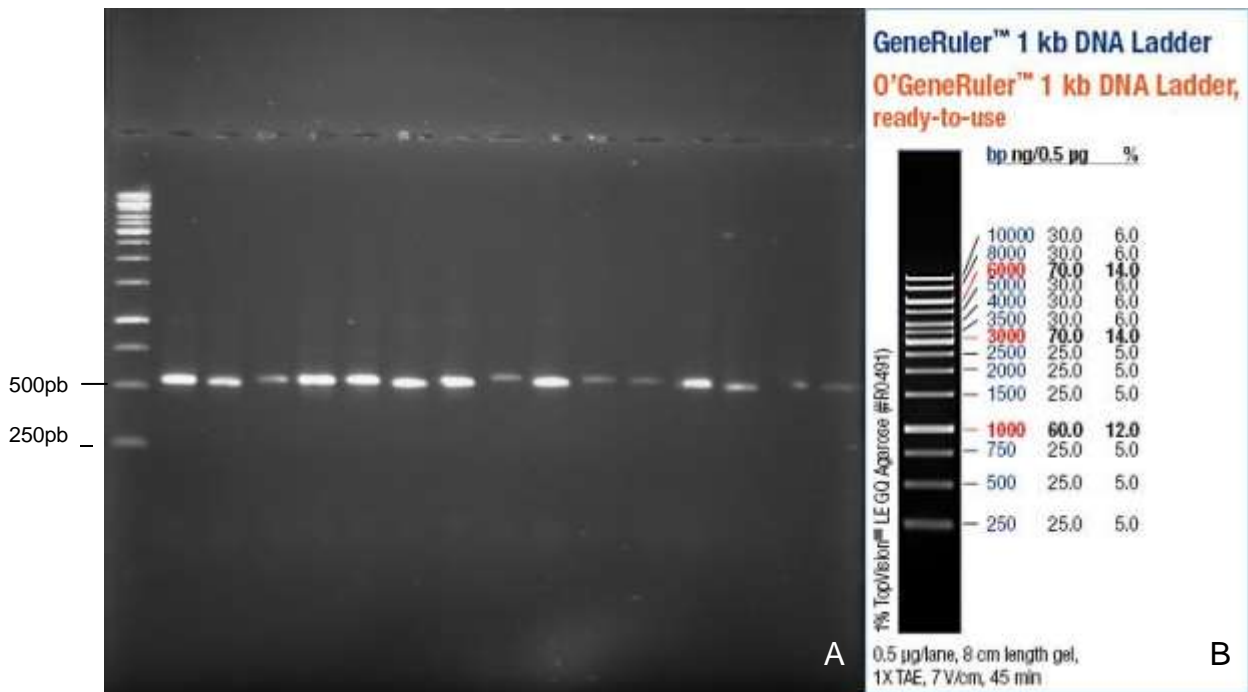


Figura 21. Gel de agarose com amplificação da região ITS do rDNA dos fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão (A), faixa de 250 a 10.000 pb do marcador molecular da Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder 1kb (B)

As análises genéticas identificaram 25 isolados independentes (**Tabela 01**). Todas as sequências analisadas no banco de dados do GenBank tiveram afiliação com cepas de Ascomycota ou Basidiomycota, correspondendo a nove Ordens: Eurotiales, Capnodiales, Hypocreales, Diaporthales, Xylariales, Sordariales, Polyporales e dois isolados com Ordem *Incertae sedis*, um no Filo Ascomycota (*Torula caligans*) e outro no Filo Basidiomycota (*Moniliella suaveolens*). As Ordens desses isolados ainda não foram definidas pela taxonomia e, portanto descrito como *Incertae sedis* (**Tabela 01**).

Os isolados de Eurotiales, Capnodiales e Hypocreales foram predominantes presentes nas abelhas. Os isolados PA20¹ e MO3 foram distantemente relacionados no banco de dados do GenBank com seus agrupamentos mais próximo *Paecilomyces inflatus* (GU566291) e *Moniliella suaveolens* (KF706431), com identidade (ID) 91%, os isolados FU00 e Ø16² apresentaram baixa relação com seus agrupamentos mais semelhantes *Fusarium merismoides* (AB586997), *Hypoxyton fendleri* (JN979418),

¹ Código adotado ao fungo conforme o gênero identificado pela morfologia, *Paecilomyces* (PA) mais a numeração da colônia (20).

² Código adotado ao fungo conforme colônia que não teve identificação morfológica confirmada (Ø) mais a numeração da colônia (16).

ambos com ID 96% e o isolado CO1 também apresentou baixa similaridade com seu agrupado mais semelhante *Diaporthe phaseolorum* (HQ130439) (ID 94%). Esses cinco isolados apresentaram similaridade de 91 a 96% com os do banco de dados do GenBank, para ser aceito como espécie essa similaridade deve ser $\geq 98\%$. Devido esses indivíduos não apresentarem alta semelhança com o banco de dados é sugerido novas análises e maior avaliação para esses isolados (**Tabela 01**).

A análise morfológica dos isolados Ø13, Ø16 e Ø21 não foi capaz de identificá-los, ao contrário da ferramenta genética que identificou Ø13 e Ø21 a nível específico e Ø16 a nível de gênero (**Figura 22**).

A **Figura 22** apresenta uma visão geral da relação filogenética dos fungos isolados de abelhas sem ferrão e identificados por análise genética.

Tabela 01. Fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão no período chuvoso e de estiagem do ano de 2013 nos municípios de Manaus e Iranduba, identificação dos isolados por análise molecular

Isolado	Resultado mais próximo no GenBank				
	Fungo	Cobertura %	Identidade %	Acesso GenBank	
Ascomycota					
AS 2	Eurotiales	<i>Aspergillus ochraceus</i>	98	99	GU134890
PE 34		<i>Penicillium tropicum</i>	99	99	EU427292
PE 36		<i>Penicillium citrinum</i>	100	99	NR_121224
PE 40		<i>Penicillium</i> sp.	99	99	JF439501
CL 3	Capnodiales	<i>Cladosporium</i> sp.	99	99	KC113295
CL 13		<i>Cladosporium perangustum</i>	98	99	KC311516
CL 28		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	99	99	EU497957
AC 2	Hypocreales	<i>Sarcopodium araliae</i>	98	99	FJ037741
VE 11		<i>Verticillium</i> sp.	99	99	JN093261
FU 13		<i>Fusarium solani</i>	100	99	HE974457
FU 20		<i>Fusarium longipes</i>	98	100	AB820724
FU 00		<i>Fusarium merismoides</i>	99	96	AB586997
FU 29		<i>Fusarium</i> sp. 1	97	100	KF746096
FU 44		<i>Fusarium</i> sp. 2	98	100	KF746127
FU 45		<i>Fusarium</i> sp. 3	99	100	FJ770062
CO 1	Diaporthales	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	99	94	HQ130439
Ø 16	Xylariales	<i>Hypoxyylon fendleri</i>	99	96	JN979418
Ø 21		<i>Microdochium</i> sp.	95	98	KC847989
PS 3		<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>	100	100	JX999998
Ø 13	Sordariales	<i>Neurospora tetrasperma</i>	98	99	JX136749
PA 20		<i>Paecilomyces inflatus</i>	99	91	GU566291
PA 19		<i>Paecilomyces</i> sp.	100	99	KF986441
TO 2	<i>Incertae sedis</i>	<i>Torula caligans</i>	99	99	JQ246356
Basidiomycota					
MO 3	<i>Incertae sedis</i>	<i>Moniliella suaveolens</i>	80	91	KF706431
PH 1	Polyporales	<i>Fomitopsis</i> sp.	100	99	KC595911

A análise genética das amostras foi fundamental e corroborou com os resultados morfológicos, apenas o isolado AC2 não se agrupou conforme análises da morfologia e da genética, onde a morfologia descreveu o gênero *Acremonium* e a genética *Sarcopodium araliae* e quando analisado no Mega 6 MV/NJ de 1.000 conjuntos de dados reamostrados com os demais isolados, AC2 agrupou-se com os isolados do gênero *Fusarium* (**Figura 22**). O isolado AC2 apresentou características similares a algumas espécies do gênero *Fusarium*, e no banco de dados do GenBank apresentou similaridade de 91% com *F. ciliatum*. Na árvore filogenética o valor de *bootstrap* de AC2 foi de 27, um valor de confiança muito baixo, não se sabe se o AC2 é realmente um *Fusarium* ou se a sequência depositada no banco de dados como de *S. araliae* seja de um *Fusarium* erroneamente confundida.

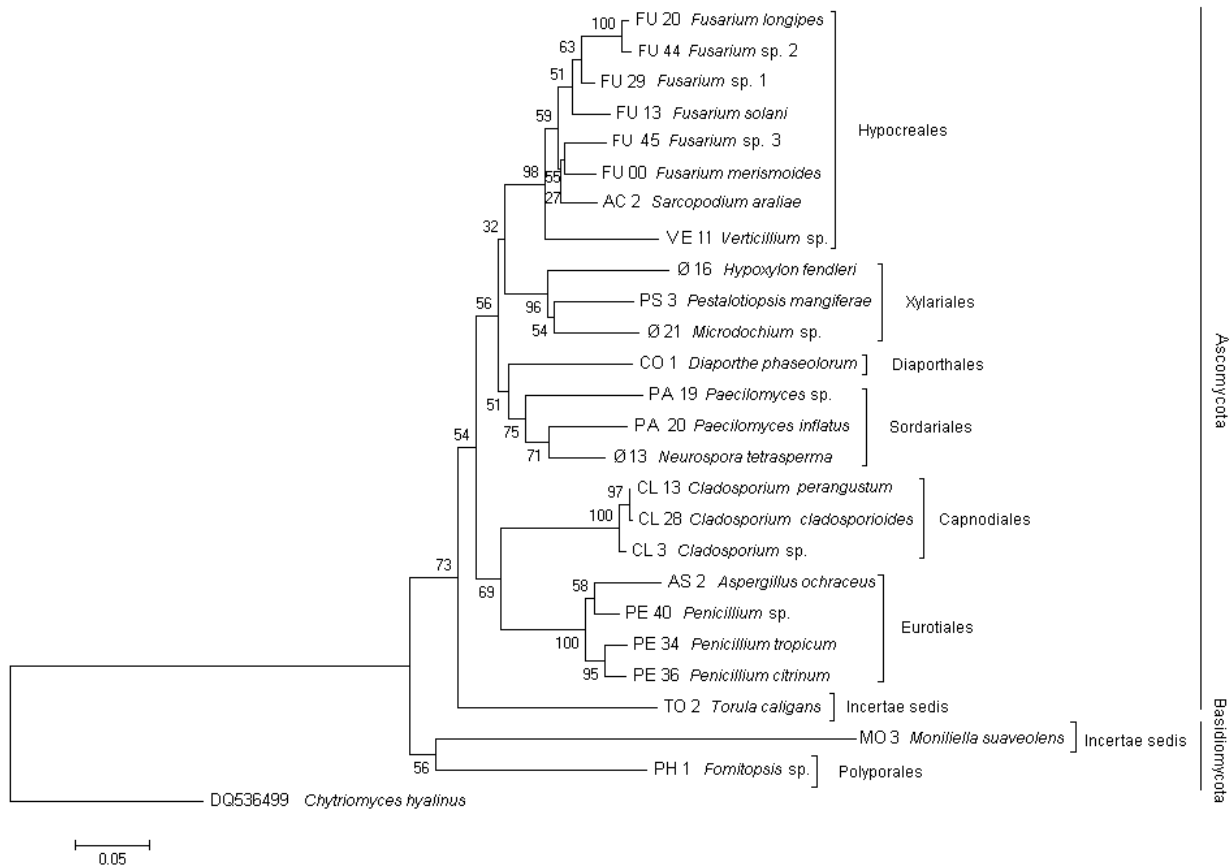


Figura 22. Árvore dos fungos associados a abelhas sem ferrão com base em rDNA. A análise das sequências (> 560 pb). Os números em cada ramo são os valores de *bootstrap* obtidos pela análise de Agrupamento de vizinhos (NJ) de 1.000 conjuntos de dados reamostrados

Gêneros identificados pela análise das estruturas morfológicas relacionados na **Figura 01** e não listados na **Tabela 01** foi devido a problemas relacionados com a temperatura dos ciclos da PCR, purificação do produto das PCR's e ou erros no sequenciamento das amostras. Há uma necessidade futura de novos estudos voltados para esses isolados ainda não identificados para tentar preencher uma lacuna aberta entre essas abelhas e os fungos.

6 DISCUSSÃO

Há uma grande necessidade de se conseguir mais informações sobre associações entre insetos e fungos (BLACKWELL, 2011). Apesar da grande contribuição para o nosso ecossistema, as abelhas sem ferrão possuem poucos estudos. A maioria dos estudos estão voltados para criação de abelhas, análise e tipificação do mel, e muitas das informações referentes às abelhas sem ferrão estão publicadas como resumo em anais de eventos e reuniões científicas, com poucas publicações em periódicos científicos (SOUZA, 2008). Poucos estudos tem avaliado diretamente a incidência de fungos na superfície corpórea desses organismos (FERRAZ et al., 2008).

Segundo Morais et al. (2013), o grupo altamente diversificado de abelhas sem ferrão apresenta uma microbiota associada, que é suspeito de ser responsável por transformar o pólen de abelha ou pão para a formação de mel. Estes microrganismos também podem desempenhar um papel na maturação ou modificação bioquímica do mel armazenado. Leão et al. (2012) citaram que colônias de abelhas sem ferrão são habitadas por uma grande diversidade de microrganismos, mas a maioria deles ainda são desconhecidos.

Eltes e Gorke (2002) descreveram o primeiro caso relatado de coleta de esporos do fungo *Rhizopus* em vez de pólen pelas abelhas sem ferrão, é um caso raro de coleta de esporos de fungos, antes relatado apenas por abelhas *A. mellifera*. Segundo Oliveira e Morato (2000), as abelhas sem ferrão podem facilitar a dispersão de esporos.

Trabalhos realizados por Oliveira e Morato (2000), Eltes e Gorke (2002), Leão et al. (2012), Lima et al. (2012) e Morais et al. (2013) destacaram a diversidade de fungos associados a abelhas sem ferrão e as análises mostraram que os Filos Ascomycota (FERRAZ et al., 2008; LIMA et al., 2012; MORAIS et al., 2013; FOLEY et al., 2014) e Zygomycota (ELTZ et al., 2002) são comumente associados as abelhas sem ferrão.

O presente estudo confirmou esta alta diversidade de fungos filamentosos associados a abelhas, onde esta diversidade foi estudada apenas na superfície

corpórea dessas abelhas e os Filos Ascomycota e Zygomycota foram isolados com maior frequência nas abelhas deste estudo e em destaque foram isolados pertencentes ao Filo Basidiomycota.

Segundo Sotão et al. (2004) para a Amazônia, pouco se conhece sobre os fungos, não existindo ainda uma lista com citação de todas as espécies já descritas, o que impossibilita a informação de dados quantitativos, referentes a diversidade desse grupo na região. Para Braga-Neto et al. (2008) um dos problemas de estudos de fungos em larga escala está relacionado à dificuldade de se identificar as espécies em campo. A identificação das espécies envolve caracteres microscópicos, de forma que a identificação de grandes coleções por especialistas pode demorar bastante tempo.

A diversidade fúngica associada à superfície corpórea de abelhas sem ferrão foi maior no período chuvoso. Este índice pode estar relacionado aos níveis de umidade, visto que Moreira e Siqueira (2002) verificaram mudanças nas populações de fungos conforme os níveis de umidade, demonstrando que quanto maior a umidade maior as populações de fungos. Ishikawa et al. (2012) citaram que em época chuvosa é comum observar grande diversidade de fungos na floresta Amazônica. Braga-Neto et al. (2008) descreveram que quanto maior a precipitação, mais fungos são registrados em serrapilheira na Reserva Ducke.

Esta maior diversidade de fungos em abelhas no período chuvoso pode também estar relacionado com o período de maior atividade de forrageamento das abelhas sem ferrão. As atividades externas da abelha se concentram pela manhã, tanto no período chuvoso de março a junho, quanto no período seco de setembro a dezembro (OLIVEIRA et al., 2012).

Das quatro coletas realizadas neste estudo os gêneros *Rhizopus* e *Mucor* foram isolados em todas as coletas, porém não foram encontrados nos estudos de Ferraz et al. (2008) e Lima et al. (2012), mas Eltz e Gorke (2002) já haviam relatado *Rhizopus* em abelhas sem ferrão. A literatura cita algumas espécies de Zygomycetes que podem causar zigomicoses ou mucormicoses em humanos (LACAZ et al., 1998).

Ainda, algumas espécies de *Fusarium*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Scedosporium*, *Tritirachium* e *Rhinocladiella*, são organismos oportunistas e podem causar infecções em pacientes imunodeprimidos (FISHER e COOK, 2001). Os gêneros

Fusarium, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Torula*, *Pestalotiopsis* e *Verticillium* possuem espécies que também podem ser patógenos de vegetais (LACAZ et al., 1998).

O gênero *Aspergillus* apresentou baixa ocorrência no estudo, ao contrário dos resultados obtidos por Ferraz et al. (2008) e Lima et al. (2012).

Os gêneros *Trichoderma*, *Monilia* e *Geotrichum* isolados por Lima et al. (2012), *Curvularia*, *Monilia*, *Nigrospora* e *Trichoderma*, por Ferraz et al. (2008), não foram isolados neste estudo. Entretanto, *Moniliella*, *Rhinoctadiella*, *Tritirachium*, *Scedosporium*, *Pestalotiopsis*, *Torula* e *Alysidium* isolados com pouca frequência ainda não haviam sido relatados em isolamentos de abelhas sem ferrão.

Morais et al. (2013) citaram que estudos poderiam comprovar que a microbiota de abelhas e ninhos são associados e podem agir como mutualistas e trazer benefícios nutricionais entre outros para as abelhas sem ferrão. Observações feitas por Oliveira e Morato (2000), indicaram que espécies de abelhas sem ferrão incluem esporos de fungos como um complemento em sua dieta, porém registros sobre interação abelha-fungos são muito raros. Para Menezes et al. (2013) embora essa microbiota pareça desempenhar um papel importante para a abelha com nutrição e proteção contra microrganismos nocivos, poucos estudos têm-se centrado na sua função e este tema ainda é muito controverso e a relação entre esses organismos ainda esconde muitas particularidades que ainda não foram exploradas.

Segundo Morais et al. (2013) associações de microrganismos com o mel, pólen, larvas e abelhas adultas é indicativo de uma relação funcional com esses insetos e existe a possibilidade de uma relação simbiótica entre esses organismos.

Segundo Oliveira et al. (1996 e 1999) as resinas usadas pelas abelhas solitárias ou sociais para construção e proteção de seus ninhos possui atividade inibidora contra alguns microrganismos como bactérias e fungos. Marsaioli et al. (1998) isolaram fungos filamentosos simbiontes na superfície corpórea de abelhas sem ferrão, esses fungos apresentaram resistência à atividade antimicrobiana do ninho, mas esses isolados fúngicos apresentaram atividade antimicrobiana promissora.

Neste estudo foi notado um elevado número de colônias do gênero *Penicillium*, sendo o isolado mais predominante. Trabalhos demonstraram que o uso de fungos para

benefícios próprios por abelhas já foi comprovado, podendo o *Penicillium* ser agente dessa relação nos ambientes.

Estudos realizados por Ferraz et al. (2008) e Lima et al. (2012) também apresentaram números significativos de isolados de *Penicillium*, entretanto *Fusarium*, *Acremonium* e *Verticillium*, predominantes no presente trabalho, não foram identificados nos trabalhos citados acima.

Houve uma grande variação dos resultados obtidos neste estudo e nos de Ferraz et al. (2008) e Lima et al. (2012), não se sabe se devido ao clima, habitat, regiões diferentes ou a poucos relatos de fungos associados a abelhas sem ferrão.

A análise genética dos isolados confirmou a presença de fungos de importância médica e agrícola na superfície corpórea das abelhas estudadas.

O isolado CL28 (**Tabela 01** e **Figura 22**) identificado através da genética como *Cladosporium cladosporioides* é um fungo entomopatogênico de ocorrência natural, também usado amplamente no controle biológico de diversas espécies de insetos. É considerado um fungo endofítico, vive no interior dos grãos sem causar danos aos mesmos e está largamente disseminado no ar e na matéria orgânica (OLIVEIRA et al., 2004).

FU13 identificado através da genética como *Fusarium solani* é um dos fungos mais frequentemente isolados de solo e resíduos de plantas e também está associada a graves micoses invasivas em pacientes imunocomprometidos e imunodeprimidos, mas também é patógeno específico de plantas de importantes agriculturas, incluindo a ervilha, cucurbitáceas, e batata-doce. Além disso, *F. solani* está cada vez mais associada a infecções oportunistas dos seres humanos e outros animais, causando infecções sistêmicas com uma elevada taxa de mortalidade (ZHANG et al., 2006).

PS3 identificado através da genética como *Pestalotiopsis mangiferae* é considerado um parasita fraco de vegetais como caju, Eucalipto, *Combretum decandrum* (planta medicinal utilizada para o tratamento de eczema, diarreia e problemas gástricos), videira entre outras, capaz de infectar folhas jovens feridas, frutas feridas, folhas mais velhas e não lesados frutos sadios se em contato com o tecido doente (MORDUE, 1980).

Nos últimos anos muitos estudos têm se voltado para identificação da microbiota associada a abelhas, principalmente *A. mellifera*, que vem sofrendo grandes perdas nos Estados Unidos, Europa e Ásia, onde fungos, vírus, ácaros e o uso de pesticidas têm ocasionado grandes mortandades de colmeia e milhões em prejuízos na agricultura por falta de polinizadores.

A importância de conhecer a sanidade microbiana de nossas abelhas é fundamental, para relacionarmos a interação ainda não compreendida entre esses organismos e evitar eventos como ocorridos nos Estados Unidos, Europa e Ásia envolvendo organismos associados à *A. mellifera*.

Neste trabalho todas as metas foram cumpridas, mas algumas lacunas ficaram abertas e com isso novas propostas surgiram, novas análises estão sendo realizadas e novas parcerias firmadas para que possamos compreender mais desta intrincada relação abelha-fungos.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos de isolados fúngicos de abelhas sem ferrão, identificados por características morfológicas e genética, permitiu concluir que:

- 1) Dentre os dezesseis gêneros identificados pelas análises morfológicas, alguns podem apresentar espécimes de importância médica e agrícola.
- 2) Dos isolados identificados por caracteres genéticos a maioria corroborou com a identificação morfológica.
- 3) O período chuvoso apresentou maior diversidade de fungos filamentosos, onde os gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Acremonium* e *Cladosporium* foram os isolados com maior destaque.
- 4) O período de estiagem apresentou menor incidência de fungos, porém o gênero *Cladosporium* apresentou uma maior incidência neste período quando comparado com o período chuvoso.

8 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. **Espécies de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e tipificação dos méis por elas produzidos em áreas de cerrado no município de Pirassununga**. São Paulo. 103p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”. Universidade de São Paulo, 2002.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ. 1998. 1163p.

ANDERSON, I.C.; CAIRNEY, W.G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 769-779, 2004.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUBLINCKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. **Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos**. Departamento de Genética. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo. 2002. 86p.

ARNOLD, A.E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 541-549, 2007.

ARX, J.A. von. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. 2. ed. J. Cramer, Vaduz, 1974. 351p.

AZEVEDO, J.L. Genética e melhoramento de fungos na biotecnologia. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 1, n.1, p. 12-15, 1997.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**, 3. ed. Mineapolis, Minnesota, USA: Burgess Publishing Co, 1972. 241p.

BLACKWELL, M. THE FUNGI: 1, 2, 3 ... 5.1 MILLION SPECIES? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BRAGA-NETO, R.; LUIZÃO, R.C.C.; MAGNUSSON, W.E. FUNGOS. In: OLIVEIRA, M.L.; BACCARO, F.B.; BRAGA-NETO, R.; MAGNUSSON, W. E. (Org.). **Reserva**

Ducke - A biodiversidade amazônica através de uma grade, 1 ed. Manaus: Attema Design Editorial, v. 1, p. 31-38, 2008.

BROMENSHENK, J.J.; HENDERSON, C.B.; WICK, C.H.; STANFORD, M.F.; ZULICH, A.W.; JABBOUR, R.E.; DESHPANDE, S.V.; MCCUBBIN, P.E.; SECCOMB, R.A.; WELCH, P.M.; WILLIAMS, T.; FIRTH, D.R.; SKOWRONSKI, E.; LEHMANN, M.M.; BILIMORIA, S.L.; GRESS, J.; WANNER, K.W.; CRAMER JR, R.A. Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. **Plos One**, v. 5, n. 10, p.1, 2010.

BURFORD, E.P.; KIERANS, M.; GADD, G.M. Geomycology: fungal growth in mineral substrata. **Mycologist**, v. 17, p. 98-107, 2003.

CASSA-BARBOSA, L.A. **Isolamento de fungos endofíticos de *Copaifera multijuga* e produção de enzimas de interesse biotecnológico por diversos isolados**. Brasília. 106p. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Distrito Federal. 2001.

CAMPOS, L.A.O.; PERUQUETTI, R.C. **Biologia e criação de abelhas sem ferrão**. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, MG. 1999. Disponível em: <<ftp://ftp.ufv.br/dbg/apiario/meliponini.pdf>> Acesso em: 10 nov. 2012.

CASTAGNINO, G.L.B.; FUNARI, S.R.C.; BLUME, E.; ARBOITTE, M.Z.; WEBER, M.N. Chalk brood disease *Ascospaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive & Spiltoir in the honey bee *Apis mellifera* L. in Central Depression of Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1909-1911, 2006.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) - bionomia e biogeografia. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 3, p. 311-372, 2003.

CORNMAN, R.C.; TARPY, D.R.; CHEN, Y.; JEFFREYS, L.; LOPEZ, D.; PETTIS, J.S.; VANENGELSDORP, V.; EVANS, J.D. Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies. **Plos One**, v. 7, n. 8, 2012.

CRUZ-LANDIM, C. Bacteria present in the intestinal tract of *Melipona quadrifasciata anthioides* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Journal of Hymenoptera Research**, v. 5, p. 264-272, 1996.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annul Review of Entomology**, v. 49, p. 71-92, 2004.

ELLIS, B.M. **Dematiaceous hyphomycetes**. Surrey, Commonwealth Mycological Institute, Kew. 1971. 608p.

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

FERRAZ, R. E.; LIMA, P. M.; PEREIRA, C. C. O.; FREITAS, N. D.; FEIJÓ, F. M. C. Microbiota Fúngica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 3, p. 345-346, 2008.

FISHER, F.; COOK, N. B.. **Micologia Fundamentos e Diagnóstico**. Rio de Janeiro, RJ: Revinter. 2001. 337p.

FOLEY, K.; FAZIO, G.; JENSEN, A.B.; HUGHES, W.O.H. The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. **Veterinary Microbiology**, v. 169, p. 203-210, 2014.

GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. **FEMS Microbiology Letter**, v. 155, n. 1, p. 1-10, 1997.

GILLIAM, M.; ROUBIK, D.; LORENZ, B. Microorganisms associated with pollen, honey and brood provision in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. **Apidologie**, v. 21, n. 2, p. 89-97, 1990.

ISHIKAWA, N.K.; VARGAS-ISLA, R.; CHAVES, R.S.; CABRAL, T.S. Macrofungos da Amazônia: importância e potencialidades. **Ciência e Ambiente**, n. 44, p. 129-139, 2012.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**. Cambridge, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.

HEARD, T.A. The role of stingless bees in crop plantation. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 183-206, 1999.

IDAM. Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas. Ano V, n. 17. 2012. Disponível em:
<www.idam.am.gov.br/arquivo/informativo/73afe3bbdf719aed17c3edde5a478956.pdf>
Acesso em: 10 nov. 2012.

KERR, W.E. Importância da meliponicultura para o país. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, n. 3, p. 42-44, 1997.

KING, A.D.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 959-964, 1979.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier. 1998. 445 p.

LEÃO, C.S.; MENEZES, M.; TEIXEIRA, J.C.S.; SILVA, J.B. Filamentous fungus grows inside brood cells of *Melipona* bees and is eaten by larvae. **Anais do X Encontro sobre Abelhas**. Ribeirão Preto. p. 162. 2012.

LEMOS, J.L.S. **Seleção de microrganismo para produção de xilanases em bagaço de cana-de-açúcar**. CETEM/MCT. 2006. 47p.

LIMA, C.B.S.; RIBEIROM, F.; GAVA, C.A. Identificação de fungos encontrados em colônias de manduri (*Melipona asilvai*) em Petrolina-PE. **Semana Entomológica da Bahia (SINSECTA)**, Cruz das Almas-BA, v. 1, p. 240, 2012.

LIU, W.C.; LI, C.Q.; ZHU, P.; YANG, J.L.; CHENG, K.D. Phylogenetic diversity of ultrurable fungi associated with two marine sponges: *Haliclona simulans* and *Gelliodes carnosus*, collected from the Hainan Island coastal waters of the South China Sea. **Fungal Diversity**, v. 42, p. 1-15, 2010.

MARSAIOLI, A.J.; PORTO, A.L.M.; GONÇALVES, R.A.C.; OLIVEIRA, C.M.A.; MANFIO, G.P.; BITTRICH, V. **The Ecosystem of Microorganisms, Bees, and Clusia Floral Resin and Oils, from the Chemistry Point of View**. Conference on Biodiversity and Bioresources: Conservation and Utilization, Phuket, Thailand. 1998.

MATOS, I.T.S.R.; NUNES, M.T.; MOTA, D.A.; LAUREANO, M.M.M.; HOSHIBA, M.A. Qualidade microbiológica do mel de *Melipona* spp. produzido na Amazônia Central

(Parintins - AM - Brasil). **Revista Verde**. Mossoró, RN, Brasil, v. 6, n. 4, p. 91-95, 2011.

MATTILA, H.R.; RIOS, D.; WALKER-SPERLING, V.E.; ROESELERS, G.; NEWTON, I.L. G. Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. **Plos One**, v. 7, 2012.

MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; CONTRERA, F.A.F.L.; VENTURIERI, G.C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. **Springer Science**. New York, p.153-171, 2013.

MORAIS, P.B.; CALAÇA, P.S.T.; ROSA, C.A. Microorganisms Associated with Stingless Bees. **Springer Science**, New York, p. 173-186, 2013.

MORDUE, J.E.M. *Pestalotiopsis mangiferae*. C.M.I. **Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, n. 68, p. 676. 1980.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. UFLA/FAEPE, Lavras. 2002. 626 p.

MUELLER, G.M.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**. Boston: Elsevier Academic Press. 2004. 777 p.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P.. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? **Springer Science Business Media, Biodivers Conserv**, v. 16, p. 1-5, 2007.

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

ODEGAARD, F. How many species of arthropods? Erwin's estimate revised. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 71, p. 583-597, 2000.

OLIVEIRA, F.L.; DIAS, V.H.P.; COSTA, E.M.; FILGUEIRA, M.A.; SOBRINHO, J.E. Influência das variações climáticas na atividade de voo das abelhas jandairas *Melipona subnitida* Ducke (Meliponinae). **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 3, p. 598-603, 2012.

OLIVEIRA, J.S.; SOUZA, S.E.; OLIVEIRA, L.L.; CARVALHO, D.A.; MOREIRA, D.M.O. Distribuição do fungo *Cladosporium cladosporioides* em regiões produtoras de *Coffea arabica* na Bahia. **Bahia Agrícola**, v. 6, n.3, p. 72-75, 2004.

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

OLIVEIRA, C.M.A.; PORTO, A.L.M.; BITTRICH, V.; MARSAIOLI, A.J. Two polyisoprenylated benzophenones from the oral resins of three *Clusia* species. **Phytochemistry**, v. 50, p. 1073-1079, 1999.

OLIVEIRA, C.M.A.; PORTO, A.M.; BITTRICH, V.; MARSAIOLI, A.J. Floral resins of *Clusia* spp.: Chemical composition and biological function. **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 6427-6430, 1996.

ONIONS, A.H.S.; ALLSOPP, D.; EGGINS, H.O.W. **Smith's Introduction to Industrial Mycology**, 7 ed., Edward Arnold (ed.), London: Great Britain. 1981. 398 p.

PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; FERREIRA, A.; LIMA, A.O.S.; ANDREOTE, F.D.; PIMENTEL, I.C.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; QUECINE, M.C.; MARTINS, M.K.; LACAVAL, P.T.; ROSSETO, P.B.; STUART, R.M.; ARAÚJO, W.L. **Guia prático: Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**, 1 ed. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz. 2010. 167 p.

RABINOVITCH, L.; CAVADOS, C.F.G.; LIMA, M.M. Controle biológico de insetos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, n. 6, p. 10-12, 1998.

RIDDELL, R.W. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. **Mycologia**, v. 42, n. 2, p. 265-270, 1950.

ROUBIK, D.W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, v. 37, p. 124-143, 2006.

SANTO, A.L. **Identificação da flora microbiana em colmeias de *Miliponina***. Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Uberlândia. 35 f. Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Uberlândia. Minas Gerais. 2007.

SÃO JOSÉ, C.; COSTA, M.J.; ALMEIDA, M.J. Isolamento de Fungos Queratinofílicos a partir de Areia de Praias. **Revista de Biologia**. Lisboa, v. 15, p. 161-171, 1994.

SILVA, E.V.C. **Caracterização e pasteurização de méis de abelhas *Apis mellifera* (africanizadas) e *Melipona fasciculata* (uruçu cinzenta)**. Belém. 49f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil. 2006.

SILVA, R.T.; CARVALHO-ZILSE, G.A.; RAFAEL, J.A. Insetos associados a colônias de abelhas sem ferrão amazônicas em meliponário urbano e rural. **Anais**. In: XX Jornada de Iniciação Científica do INPA - PIBIC/CNPq - PAIC/FAPEAM, Manaus. 2011.

SCHMIT, J.P.; MUELLER, G.M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. **Springer Science Business Media, Biodivers Conservation**, v. 16, n. 1, p. 99-111, 2007.

SOUZA, B.A. **Caracterização físico-química e qualidade microbiológica de amostra de mel de abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponinae) do Estado da Bahia, com ênfase em *Melipona Illiger, 1806***. Piracicaba. 107 f. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. São Paulo. 2008.

SOUZA, B.A.; MARCHINI, L.C., DIAS, C.T.S.; ODA-SOUZA, M.; CARVALHO, C.A.L.; ALVES, R.M.O. Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia. **Ciência e Tecnologia de Alimento**. Campinas, v. 29, n. 4, p. 798-802, 2009a.

SOUZA, B.A.; CARVALHO, C.A.L.; ALVES, R.M.O.; DIAS, C.S.; CLARTON, L. **Munduri (*Melipona asilvai*): a abelha sestrosa**. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2009b. 46 p.

SOUZA, A.Q.L. **Fungos endofíticos de plantas tóxicas da Amazônia, *Paulicourea longiflora* (Aubl.) rich e *Stryhnos cogens* Bentham**. São Carlos, 102f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2001.

SOTÃO, H.M.P.; CAMPOS, E.L.; COSTA, S.P.S.E. **Micologia Diversidade dos fungos na Amazônia**. Cadernos de Alfabetização Científica: Museu Paraense Emílio Goeldi, v. 1, 2004.

STOLK, A.C.; DAKIN, J.C. *Moniliella*, a new genus of Moniliales. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 32, n. 1, p. 399-409, 1966.

SUNITHA, V.H.; RAMESHA, A.; SAVITHA, J.; SRINIVAS, C. Amylase production by endophytic fungi *Cylindrocephalum* sp. isolated from medicinal plant *Alpinia calcarata* (Haw.) Roscoe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1213-1221, 2012.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. California, USA: CMI Kew. 1980. 696p.

TEIXEIRA, A.C.P.; MARINI, M.M.; NICOLI, J.R.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R.P.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A.. *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 339-343, 2003.

USDA. **Colony Collapse Disorder Progress Report**. United States Department of Agriculture. 2010.

VENTURIERI, G.C. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 2 ed. Revisada e Atualizada. Belém, PA: EMBRAPA Amazônia Ocidental. 2008a. 60 p.

VENTURIERI, G.C. **Contribuição para a criação racional de meliponíneos amazônicos**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental. 2008b. 26 p.

WAINWRIGHT, M. **Introduction to fungal biotechnology**, 1 ed. Michigan, USA: John Wiley & Son Ltda. 1992. 214p.

WATANABE, T. **Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species**, 2 ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press. 2002. 486p.

ZHANG, N.; O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; NALIM, F.A.; SUMMERBELL, R.C. PADHYE, A.A.; GEISER, D.M. Members of the *Fusarium solani* Species Complex That Cause Infections in Both Humans and Plants Are Common in the Environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2186-2190, 2006.