

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PORTO NACIONAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECÓTONOS**

**DIÔGO JANUÁRIO DA COSTA NETO**

**LEVEDURAS VETORIZADAS POR ABELHAS SEM FERRÃO EM ÁREAS DE  
CERRADO NO ESTADO DO TOCANTINS, BRASIL**

**PORTO NACIONAL-TO**

**2017**

**DIÓGO JANUÁRIO DA COSTA NETO**

**LEVEDURAS VETORIZADAS POR ABELHAS SEM FERRÃO EM ÁREAS DE  
CERRADO NO ESTADO DO TOCANTINS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Ecologia de Ecótonos da Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ecologia de Ecótonos.

Orientadora: Dra. Paula Benevides de Moraes

**PORTO NACIONAL-TO**

**2017**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

C8371 Costa-Neto, Diôgo Januário da.

Leveduras vetorizadas por abelhas sem ferrão em áreas de cerrado no estado do Tocantins, Brasil. / Diôgo Januário da Costa-Neto. – Porto Nacional, TO, 2017.

53 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Porto Nacional - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ecologia de Ecótonos, 2017.

Orientadora : Paula Benevides de Moraes

1. Diversidade de leveduras. 2. Meliponíneos. 3. Mutualismo. 4. Vetorização. I. Título

**CDD 577**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

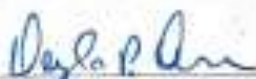
BANCA EXAMINADORA



Dr<sup>a</sup>. Paula Benevides de Moraes  
Universidade Federal do Tocantins - UFT (Presidente)



Dr<sup>a</sup>. Solange Cristina Carreiro  
Universidade Federal do Tocantins - UFT



Dr<sup>a</sup>. Deyla Paula de Oliveira  
Universidade Estadual do Tocantins - Unitins

Aprovada em: 09 de março de 2017

Local de defesa: Auditório do Neamb

Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Porto Nacional - To

**“Quando o mel é bom, a levedura sempre volta!”**

## AGRADECIMENTOS

Pela realização desse trabalho agradeço:

Aos meus pais, Edmilson e Maria de Jesus, e demais familiares pelo apoio;

À Universidade Federal do Tocantins, campus Porto Nacional e campus Palmas, pela oportunidade e apoio logístico;

Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecótonos, pelos professores que compartilharam conhecimentos e experiências nas disciplinas obrigatórias e optativas que cursei, à secretária Ana Paula pela disponibilidade, e aos colegas de turma (Alice, Aline Lopes, Aline Schuch, André, Eiderson, Idelina, Phamela, Pedro Henrique, Oscar, Renato e Úria);

À professora Dra. Paula Benevides de Moraes, pelas orientações, disponibilização de parte dos dados, acompanhamento em todas as etapas da pesquisa, por me ensinar todas as técnicas utilizadas nesse estudo, e pelo empenho nas correções da dissertação, sendo fundamental para a minha entrada no doutorado;

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da UFT (LAMBIO), pela estrutura e apoio técnico. Em especial à técnica Cristiane, pelo acompanhamento durante o período de estágio e na execução do teste do perfil fisiológico das leveduras, também à técnica Marcia pela disponibilidade, e aos motoristas Elias e Alberico que conduziram as idas e vindas nas coletas;

À toda equipe acadêmica do LAMBIO que convivi durante esses dois anos (pós-doutorandos, doutorandos, mestrandos e alunos de iniciação científica), pelo companheirismo e acolhimento. Em especial à Álef, Ana Paula, Mariane e Stella que permitiram-me acompanhar seus experimentos, à Deyla por auxiliar nas análises de biologia molecular, à Sanmyla e Seu Raimundo por auxiliarem na coleta, à Laudy pela indicação do Congresso de Microbiologia Agrícola da UNESP-Jaboticabal e Kitnet para morar em Palmas, e aos demais pela companhia nos almoços, cafés e bolos.

Ao meliponicultor Samuel Schiesa de Taquaruçu, por permitir a coleta;

À profa. Dra. Yasmine Antonini da Universidade Federal de Ouro Preto pela identificação da abelha *Scaptotrigona* aff. *postica*;

À profa. Dra. Solange Cristina Carreiro e Dra. Deyla Paula de Oliveira, pela leitura e sugestões durante a banca de defesa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da bolsa e concessão do auxílio (projeto nº457443/2012) que financiou o trabalho executado e análises realizadas.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	10
<b>2. Material e Métodos</b> .....	13
2.1. Área de estudo e abelhas sem ferrão amostradas .....	13
2.2. Amostragem .....	14
2.3. Identificação molecular das leveduras .....	15
2.4. Caracterização funcional das leveduras .....	16
2.5. Análises estatísticas.....	17
<b>3. Resultados</b> .....	19
3.1. Leveduras vetorizadas por seis espécies de meliponíneos .....	19
3.2. Diversidade de espécies de leveduras vetorizadas pela abelha <i>Scaptotrigona aff. postica</i> em Taquaruçu.....	36
3.3. Diversidade funcional de leveduras vetorizadas por abelhas <i>Scaptotrigona aff. postica</i>	40
<b>4. Considerações finais</b> .....	41
<b>6. Referências</b> .....	42

## Leveduras vetorizadas por abelhas sem ferrão em áreas de cerrado no estado do Tocantins, Brasil

### RESUMO

Há evidência de interação mutualista entre leveduras e abelhas sem ferrão, em que estas são vetores de leveduras que servem de alimento e modificam produtos do ninho das abelhas. Vários estudos registraram a ocorrência de espécies dos gêneros *Candida* e *Starmerella* associadas ao ninho de diferentes meliponíneos. Nesse estudo foram identificadas as espécies de leveduras vetorizadas por *Frieseomellita varia*, *Scaptorigona polysticta*, *Sacptorigona postica*, *Tetragonisca angustula angustula*, *Melipona compressipes manaoensis* e *Melipona scutellaris* em regiões e meliponários no Cerrado tocantinense, e feita uma análise das características funcionais das leveduras vetorizadas pela abelha *Scaptorigona postica*. Amostragens foram realizadas entre os anos de 2006 a 2015 em sistemas de meliponicultura localizados em quatro municípios do Estado do Tocantins, região norte do Brasil, sendo espécimes de abelhas campeiras capturadas na entrada dos ninhos com sacos plásticos e postas para caminhar em placas contendo meio YMA. Os isolados foram identificados por métodos moleculares, realizando-se extração de DNA, agrupamento por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o *primer* EI-1 e sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S rDNA utilizando os *primers* NL-1 e NL-4. As características funcionais das leveduras vetorizadas por *S. postica* foram mensuradas por testes fisiológicos e bioquímicos para as habilidades de assimilar oito compostos de carbono e quatro álcoois, fermentação de glicose, crescimento em meio contendo ácido acético, meio osmofílico e nas temperaturas 37°C e 40°C. Entre os diferentes meliponíneos, foram identificados 62 espécies de leveduras, classificadas em 18 gêneros do filo Ascomycota e seis do filo Basidiomycota, sendo observado uma maior frequência das espécies *Torulaspota delbrueckii*, *Candida apicola*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kluyveri* e *Starmerella meliponinorum*, representando 41% do total de isolados. Destas, *C. apicola* e *S. meliponinorum* são frequentes em meliponíneos, enquanto que as outras são típicas de substratos açucarados, mostrando que as abelhas vetorizam leveduras de seus ambientes de coleta de pólen e néctar. Diferenças na composição de espécies ocorreram entre Meliponini e Trigonini, mostrando estratégias diferentes de visitação nos substratos contendo leveduras. Ainda, cada abelha vetoriza uma comunidade típica de leveduras, o que pode indicar hábitos seletivos e diferenciais de coleta. A análise das características funcionais de 52 linhagens isoladas de *S. postica* revelou que em grande parte das leveduras assimilam os carboidratos galactose, maltose, celobiose e trealose, em quanto que o número de leveduras que assimilam sacarose, amido, melibiose e xilose foi menor. O etanol foi assimilado por 36,53% das leveduras, mas acetona, metanol e isopropanol foram pouco frequentes. Grande parte das leveduras foi fermentadora, osmofílica e resistente ao ácido acético, mostrando adaptação a altas concentrações de açúcares e ambiente fermentativo.

**Palavras-chave:** diversidade de leveduras, meliponíneos, mutualismo, vetorização



## Yeasts vectored by stingless bees in cerrado regions in the state of Tocantins, Brazil

### ABSTRACT

There are evidences for a mutualistic interaction between yeasts and stingless bees, in which bees vector yeasts that serve as food item or modify the products of the nest. Various studies report the occurrence of species of the genera *Candida* e *Starmerella* associated with nests of different meliponini. In this study we identified the yeast species vectored by *Frieseomellita varia*, *Scaptorigona polysticta*, *Sacptorigona postica*, *Tetragonisca angustula angustula*, *Melipona compressipes manaoensis* and *Melipona scutellaris* in areas of Cerrado, and we made a functional analysis of the yeasts associated with *Scaptorigona postica*. Sampling was done between the years 2006 and 2015 in Tocantins State, Northern Brasil, and the collector bees were captured in the nest entrance with sterile bags and put to walk on agar plates containing YMA. Yeast isolates were identified by molecular methods using DNA extraction, PCR fingerprinting with primer EI-1 and sequencing of D1/D2 region of the gene 26S rDNA using primers NL-1 and NL-4 of representative strains. Functional characters were tested as carbohydrate assimilation, osmotolerance and acid tolerance, and resistance to 37°C and 40°C for yeasts isolated from *Scaptorigona postica*. Among all stingless bees, 62 yeast species belonging to 18 genera of Ascomycota and six Basidiomycota were identified, with a higher frequency of *Torulaspora delbrueckii*, *Candida apicola*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kluyveri* and *Starmerella meliponinorum* that represented 41% of the strains. Among these, *C. apicola* and *S. meliponinorum* are frequent in stingless bees, and the others are commonly isolated from sugary substrates, indicating that the bees vector yeasts from the environments where they collect nectar and pollen. Significant differences in the yeast composition occur between Meliponini and trigonini, indicating different strategies of visitation in the substrates colonized by yeasts. Also each bee species carries different yeast communities, indicating a selective and different collecting habit. Functional characters of 52 yeasts isolated from *S. postica* revealed that most assimilate simple sugars galactose, maltose, celobiose, and trehalose, but only ¼ of them assimilate sucrose and xylose. Assimilation of starch and melibiose was uncommon. Ethanol was assimilated by 36,53% of the yeasts but acetone, methanol and isopropanol were less frequently assimilated. Most yeasts were fermentative, osmophilic and resistant to acetic acid which indicates an adaptation to high sugar concentrations and the fermentative environment.

**Key words:** meliponines, mutualism, vectorization, yeast diversity

## 1. Introdução

Os microrganismos, insetos e plantas podem participar de um sistema simbiótico tripartite, podendo ser mediado por qualquer uma das três partes (Gonzalez, 2014). Uma exemplificação desse sistema são as relações simbióticas entre leveduras, plantas e abelhas, em que as abelhas funcionam como vetores de leveduras quando visitam as plantas para o forrageio de néctar e pólen e estas parecem ser importante item alimentar, além de realizarem transformações nos produtos do ninho (Morais et al. 2013). As leveduras são fungos unicelulares imóveis que apresentam habilidades para metabolizar diferentes nutrientes e crescer em condições ambientais diversas, com ocorrência ubíqua em substratos açucarados como flores e frutos, atualmente existem 1.414 espécies de leveduras catalogadas na última edição do *The Yeast: a taxonomic study*, sendo 85 gêneros no filo Ascomycota e 63 gêneros no filo Basidiomycota (Kurtzman et al. 2011a). Leveduras têm sido isoladas de insetos de diferentes ordens e de substratos visitados por eles, sendo as leveduras beneficiadas com a dispersão para ambientes com disponibilidade de nutrientes, e para os insetos são apontados vários benefícios como a proteção contra patógenos, metabolização de substâncias importantes na produção de ferormônios, fornecimento de nutrientes requeridos pelos insetos e também um papel na digestão de alimentos pela liberação de enzimas extracelulares (Lachance et al. 2001; Yamada et al. 2003; Vega & Dowd, 2005). Interações mutualistas entre espécies específicas de leveduras dos gêneros *Candida* e *Starmerella* e abelhas sem ferrão foram apontadas na literatura (Rosa et al. 2003; Thiago-Calaça, 2011; Morais et al. 2013).

As abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae), também conhecidas como nativas, indígenas, corbiculadas e meliponíneos, são organismos sociais que não apresentam ovopositor funcional para picada e na maioria das espécies há presença de corbícula, uma estrutura com pelos localizada nas tíbias das pernas posteriores (Patricio et al. 2002). Ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo conhecidas mais de 500 espécies distribuídas em 33 gêneros e duas tribos, a tribo Meliponini que compreende todas as espécies do gênero *Melipona* e a tribo Trigonini que compreendem as espécies dos demais gêneros (Kerr et al. 1996; Camargo & Pedro, 2013; Michener, 2013). No Brasil ocorrem 244 espécies conhecidas (Pedro, 2014).

Em substratos visitados por abelhas sem ferrão, em que são coletados materiais para a construção do ninho e produção de alimento (Michener, 2013), são relatadas a ocorrência de leveduras no pólen e néctar das plantas (Herrera et al. 2009; Pozo et al. 2011; Pozo et al. 2012; Herrera et al. 2013; Pozo et al. 2014) e também associadas aos substratos dentro do ninho como saborá, mel, lixo, própolis, células de cria, larvas, nas pernas e conteúdo estomacal de abelhas adultas (Camargo et al. 1992; Lachance et al. 2001; Rosa et al. 2003; Souza et al. 2009; Thiago-Calaça, 2011; Costa-Neto et al. 2016).

O pólen, um componente rico em proteínas, lipídios, açúcares, vitaminas e minerais, é coletado através da corbícula e depositado em discos de cera da colmeia, sendo transformado em saborá, que é alimento das abelhas nas fases larval e adulta, pela adição de mel, néctar e secreções mandibulares (Hebert Jr & Shimanuki, 1978; Gilliam, 1979; Souza et al. 2004). O néctar, um componente rico em carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e flavonoides (Herrera et al. 2009), é coletado através do aparelho bucal e transformado em mel pela ação de secreções glandulares da abelha, como a enzima invertase que converte açúcares complexos em açúcares simples. O mel é composto por 80% de monossacarídeos glicose e frutose e 10% de outros carboidratos, como maltose e rafinose. A concentração de açúcares no mel varia de 53-73% nas abelhas meliponas e 51-70% nas trigonas (Carvalho et al. 2005). A própolis é uma substância formada por resinas vegetais, cera, compostos voláteis, ácidos, entre outros componentes que variam com as espécies vegetais forrageadas e o período do ano (Bankova et al. 1998; Pereira et al. 2002; Menezes, 2005; Torres et al. 2008).

As leveduras que colonizam néctar e pólen das flores apresentam características funcionais que lhes permitem habitar esse ambiente seletivo, que apresenta altas concentrações de carboidratos, sendo em sua maioria glicose, e baixo teor de nitrogênio (Gilliam, 1979; Herrera et al. 2009; Pozo et al. 2011; Pozo et al. 2012; Herrera et al. 2013; Pozo et al. 2014). As leveduras podem, ainda, modificar a composição química do ambiente através da metabolização dos compostos existentes e impor novas interações na comunidade, como por exemplo, a fermentação de glicose que tem como produto o etanol, e a transformação de açúcares complexos como a sacarose que também podem ser metabolizados e formar diferentes ácidos, como acético, málico (Park et al. 1996).

As habilidades fisiológicas e bioquímicas de leveduras podem mediar interações entre os organismos nos substratos que elas ocorrem, como na relação simbiótica

tripartite planta-microrganismo-inseto (Vega & Dowd, 2005). No néctar, a glicose pode ser fermentada alterando a temperatura do nectário (Herrera & Pozo, 2010), a fermentação da glicose gera etanol como produto e também substâncias ácidas como o ácido acético (Park et al. 1996) e compostos voláteis atraindo polinizadores (Dashko et al. 2014). As leveduras podem também disponibilizar, no meio, nutrientes não sintetizados pela abelha, como aminoácidos, vitamina B e esteroides, e digerir celulose (Douglas, 2009; 2014). Essas habilidades podem, também, ser úteis na caracterização do habitat de origem das leveduras e prever novos habitats, a assimilação de sacarose, por exemplo, que é um elemento presente em abundância na cana-de-açúcar e em menor quantidade em partes de plantas, indica que as leveduras são provenientes de substratos vegetais com altos teores de carboidratos, assim como outros elementos como a maltose que é um componente do amido, a celobiose é uma unidade de celulose de plantas, a melibiose ocorre em exsudatos e nectários de plantas, trealose é um componente da hemolinfa de insetos e pólen de plantas, entre outros (Starmer, 1981; Morais et al. 1994).

Em diferentes microhabitats do ninho de meliponíneos, como por exemplo, o mel e a própolis, espera-se a ocorrência de leveduras tolerantes a altas concentrações de açúcares e compostos voláteis respectivamente, nos quais estes substratos são ricos. Assim, as características fisiológicas e bioquímicas das leveduras vetorizadas pelas abelhas durante o forrageamento predizem sua persistência ou não nos diferentes substratos dentro do ninho e seu potencial carreamento para novas flores.

Uma possível interação mutualista entre leveduras dos gêneros *Candida* e *Starmerella* e abelhas sem ferrão foi evidenciada por Rosa et al. (2003) e Thiago-Calaça (2001), a partir da frequência de ocorrência das espécies de leveduras entre as abelhas nativas. O objetivo desse estudo foi analisar espécies de leveduras vetorizadas por diferentes espécies de abelhas sem ferrão em quatro regiões do estado do Tocantins e avaliar as características funcionais das leveduras vetorizadas pela abelha *Scaptotrigona aff. postica* em um meliponário localizado no distrito de Taquaruçu, Palmas, Tocantins.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Área de estudo e abelhas sem ferrão amostradas

As amostras utilizadas nesse estudo foram coletadas entre os anos de 2006 e 2015 em sistemas de meliponicultura localizados em áreas de cerrado do Estado do Tocantins (Figura I).

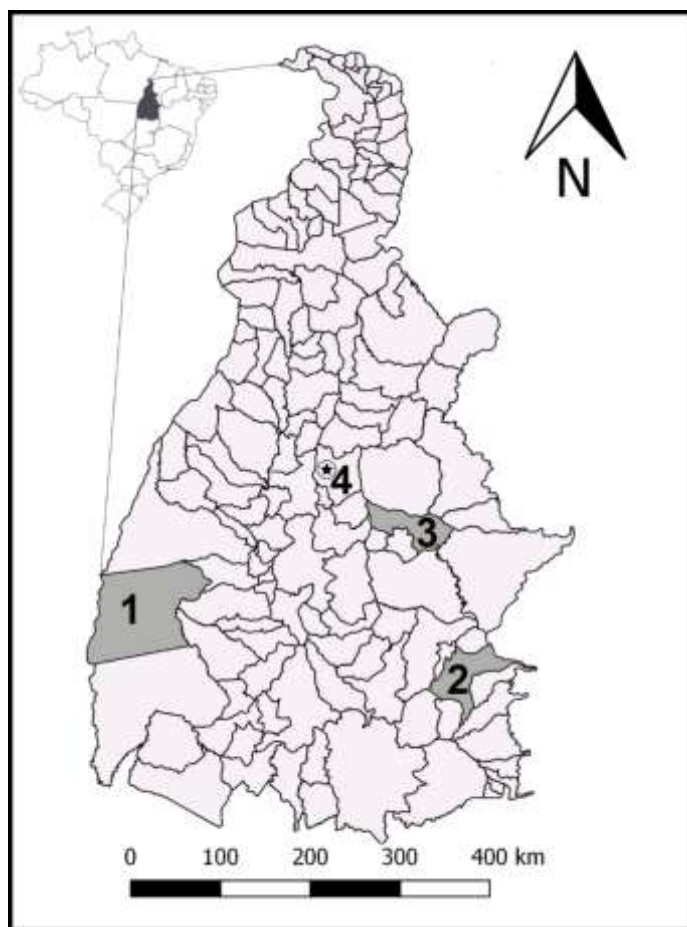


Figura I. Mapa de localização da área de estudo, evidenciando a posição do estado do Tocantins no Brasil e as localidades amostradas: 1- Lagoa da Confusão, 2-Dianópolis, 3- Novo Acordo e 4- Palmas.

A região de Lagoa da Confusão está localizada no sudoeste do estado do Tocantins a 216 km de Palmas, com 200 m de altitude, sendo uma região de transição entre Cerrado e Floresta Amazônica (Martins et al., 2002; Brito et al., 2006). Nesta localidade, não há meliponários, mas sim ninhos em troncos de madeira, recuperados de

derrubadas florestais. A área de Dianópolis (11°37'40"S 46° 49' 14" W) está localizado na região sudeste do Estado do Tocantins, a aproximadamente 400 km de Palmas com altitude de 693 m (Zampaulo et al. 2007; IBGE, 2010a). Também aqui não há meliponários, mas ninhos em troncos de madeira. Novo Acordo (9°57'45.3"S 47°40'43.2"W) está localizada na região leste do estado do Tocantins, a 233 m de altitude e aproximadamente 180 km de Palmas, com a maior parte da vegetação constituída por formações savânicas (cerrado stricto sensu) com manchas de veredas (Viana, 2015). Nesta localidade, foram visitados dois meliponários que possuem caixas racionais e ninhos em troncos de madeira. A área amostral central está situada na zona urbana de Taquaruçu (10°19'04.4"S 48°09'29.4"W), um distrito do município de Palmas, capital do Tocantins (IBGE, 2010b), que representa uma região de cerrado denso em altitude média de 410 m. Neste local, as abelhas são criadas em caixas racionais.

Foram amostradas as abelhas *Friseomellita varia* (manoe-de-abreu), *Scaptotrigona* aff. *postica* (tubi-bravo), *Scaptotrigona polysticta* (tubi-manso), *Tetragonisca angustula angustula* (jataí), *Melipona compressipes manaoensis* (jupará) e *Melipona scutellaris* (uruçu nordestina) (Tabela I).

Tabela I. Distribuição das espécies de abelhas sem ferrão entre os locais amostrados

Abelhas	Lagoa da Confusão	Dianópolis	Novo Acordo	Palmas
<i>Friseomellita varia</i>		X	X	
<i>Scaptotrigona</i> aff. <i>postica</i>			X	X
<i>Scaptotrigona polysticta</i>			X	
<i>Tetragonisca angustula angustula</i>	X		X	
<i>Melipona compressipes manaoensis</i>	X		X	
<i>Melipona scutellaris</i>			X	

## 2.2. Amostragem

Em cada localidade, foram capturados espécimes de abelhas na entrada dos ninhos (caixas racionais e em troncos de arvores), no período da manhã das 9h às 11h. Para a captura, utilizaram-se sacos plásticos estéreis, de onde as abelhas eram

transferidas e postas para caminhar individualmente em placas contendo o meio YMA (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% peptona, 2% de glicose e 3% de ágar) acrescido de 0,04% de cloramfenicol, por 15 minutos (Rosa et al. 2003).

Após documentação fotográfica da espécie e dos ninhos e libertação das abelhas, no mesmo local de captura, as placas foram levadas para o laboratório e incubadas à  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  em estufa tipo B.O.D por um período de 7 dias. As colônias obtidas foram descritas morfológicamente, purificadas e preservadas em tubo contendo 80% de caldo GYMP (0,1% extrato de levedura, 0,5% peptona, 1% glicose, 0,02% fosfato de sódio monobásico) e 20% de glicerol no freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para identificação posterior.

As análises foram realizadas no laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins.

### 2.3. Identificação molecular das leveduras

Após isoladas e purificadas, as estirpes de leveduras foram submetidas ao processo de extração do DNA, agrupamento por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento.

A extração do DNA das leveduras foi realizada a partir de colônias puras e isoladas, crescidas no período de 1-2 dias em placas com meio ágar Sabouraud (0,5% extrato de levedura, 1% peptona, 1% glicose e 2% ágar). O DNA foi extraído baseado no protocolo de Valente et al. (1996) com modificações. Células de culturas de leveduras foram suspensas em microtubo contendo 100uL de tampão de extração (0,15M NaCl/ 50nM Tris-HCl/ 10nM EDTA/ 2% SDS/ [pH=8,0]) e incubadas em banho maria a  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. O DNA total foi extraído com 200uL de clorofórmio-álcool isoamílico (centrifugação 14000 rpm, 15 minutos) e precipitado com isopropanol (v/v à temperatura ambiente). Após ficar na bancada por 15 min foi centrifugado (13000 rpm, 10 min) e em seguida lavado com 200uL de etanol 70% gelado e centrifugado (13000 rpm, 10 minutos), após a centrifugação o etanol foi desprezado e o tubo foi mantido em overnight para evaporar o etanol, o DNA foi suspenso em 50uL de TE (10nM Tris-HCl pH=7,6/ 1nM EDTA [pH=8,0]) e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop Thermo 2000.

Depois de extraído, o DNA foi quantificado e diluído até a concentração 50ng para amplificação na PCR pelo método *fingerprinting* utilizando o *primer* EI-1(5'-CTG GCT TGG TGT ATG-3') (Barros Lopes et al. 1996). Foi preparado um Mix contendo 9,37µL de água ultrapura, 2,5µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1,0 µL de dNTPs (10mM), 5,0µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM KCl), 0,125 µL da enzima Taq DNA polimerase e 1,0 µL de DNA (50 ng/µL) e misturado com 4uL do *primer* EI-1 para reagir no termociclador (PxE 0.2 Thermo Electron Corporation).

Os produtos da PCR foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de agarose (1% agarose, TBE 0,5x), sendo os poços preenchidos com 2uL do produto da PCR, 4uL de Gelred (Biotium, Inc.) e 4uL do tampão de corrida 1Kb (Promega Corp., Madison, WI, USA). As bandas foram visualizadas na luz ultra violeta em Fotodocumentador (LPIX-EX, Loccus Biotecnologia, Brasil) (Apêndices: Figura V; VI e VII).

Foi realizado o sequenciamento de um fragmento de DNA mitocondrial (gene rDNA 26S) do domínio D1/D2 das leveduras agrupadas utilizando para amplificação os *primers* NL-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') e NL-4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') (O'Donnell *et al.*,1993) como descrito por Kurtzman & Robnett (1998) e Lachance et al. (1999). As etapas de purificação e sequenciamento foi realizado no Laboratório de Genômica e Bioinformática do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Pará, utilizando kit de sequenciamento *BigDye*.

As sequências obtidas foram alinhadas e ajustadas usando o programa Geneious 6.1.8 (Kearse et al. 2012), sendo comparadas com as depositadas no programa BLASTn do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequencias com porcentagem de identidade  $\geq 99\%$  de pares de bases foram consideradas da mesma espécie, de acordo com Kurtzman et al. (2011b) acima de 1% de divergência a partir de 400 pares de bases as estirpes são consideradas pertencentes a diferentes espécies.

#### 2.4. Caracterização funcional das leveduras

Procurou-se investigar as habilidades fisiológicas e bioquímicas das leveduras que podem influenciar nas interações dentro do ninho, por isso as leveduras foram



caracterizadas quanto à utilização de diferentes fontes de carbono e a tolerância para fatores ambientais limitantes pelo método *replica plating* (Lederbeg & Lederbeg 1952). Dentre as habilidades de utilizar recursos, foram realizados teste de fermentação da glicose, metabolização de carboidratos (galactose, maltose, sacarose, celobiose, melibiose, trealose, amido, xilose etanol, metanol, acetona e isopropanol). Os fatores limitantes testados foram resistência ao ácido acético, osmofilia em 50% de glicose e 10% de NaCl, e habilidade de crescimento nas temperaturas à 37°C e 40°C, segundo Kurtzman et al. (2011c).

## 2.5. Análises estatísticas

O Cálculo da frequência das leveduras foi realizado com base na presença/ausência das espécies em cada indivíduo de abelha amostrado. Cada isolado representou a presença da espécie de levedura em um indivíduo de abelha onde esta espécie foi detectada, e não o número de células de leveduras presentes no indivíduo. Frequência de ocorrência ( $F_o$ ) é o percentual de indivíduos de abelhas em que a espécie de levedura foi encontrada, em relação ao total de abelhas amostrados (400 abelhas), calculado pela fórmula:

$$F_o = \left( \frac{\sum_1^j n_i}{N} \right) \times 100 \quad \text{onde:}$$

$n_i$  = frequência de ocorrência da espécie  $i$  na abelha  $j$ ;

$N$  = número total de abelhas amostradas.

Frequência de isolamento ( $F_{iso}$ ) é o percentual de isolados da espécie de levedura  $i$  em relação ao total de isolados de leveduras (1474 isolados), calculado pela fórmula:

$$F_{iso} = \left( \frac{\sum_1^j n_i}{T} \right) \times 100 \quad \text{onde:}$$

$n_i$  = frequência de ocorrência da espécie de levedura  $i$  na espécie de abelha  $j$ ;

$T$  = número total de isolados de leveduras.

A riqueza esperada [E(S)] de espécies de leveduras em cada espécie de abelha foi calculada pela técnica de rarefação segundo Hurlbert (1971) e Heck et al. (1975), que calcula o número de espécies esperado para uma determinada amostra, utilizando como amostra padrão a abelha que apresentou o menor número de isolados, sendo esta análise feita no software R versão 3.2.3 (R Core Team, 2015) utilizando o pacote vegan (Oksanen et al. 2017).

$$E(S) = \sum_{i=1}^s \left[ 1 - \frac{\binom{N - N_i}{n}}{\binom{N}{n}} \right]$$

onde:  $\frac{N}{n}$  é calculado como  $\frac{N!}{n!(N-n)!}$

A equitabilidade, que verifica a distribuição do número de isolados entre as espécies de leveduras, foi calculada pelo índice de Pielou (J') (Barros, 2007).

$$J' = \frac{H'(\text{observado})}{H'(\text{máximo})}$$

onde  $H'(\text{máximo}) = \log S$  onde S = número total de espécies

A diversidade foi mensurada pelos índices Shannon-Wiener (H'), que considera riqueza e equitabilidade e atribui maior importância para espécies menos frequentes (Barros, 2007), e Margalef (d), que atribui maior importância para espécies diferentes em cada amostra. As análises de diversidade e equitabilidade foram realizadas segundo Legendre & Legendre (1998) no software PAST (Hammer et al. 2001).

O índice de Shannon-Wiener foi calculado segundo a fórmula:

$$H' = - \sum p_i (\log p_i)$$

Onde  $p_i$  = valor de importância; log = base 2 ou 10 ou neperiano.

O índice de Margalef foi calculado segundo a fórmula:

$$d = (n - 1) / \ln N$$

Onde n = número de espécies presentes; N = total de indivíduos encontrados.

A análise de similaridade foi realizada por meio de um dendograma (UPMG) pelo método de ligação por grupos pareados, empregando os índices de similaridade Jaccard, a partir de uma matriz de presença e ausência (Valentin, 1995; Ramette, 2007), sendo essa análise realizada no *PAST*.

O compartilhamento de espécies de leveduras entre as abelhas foi visualizado em diagramas de Venn, sendo as análises feitas no software R, utilizando o pacote VennDiagram versão 1.6.17 (Chen & Boutros, 2011).

### 3. Resultados

#### 3.1. Riqueza e diversidade de leveduras vetorizadas por meliponíneos no Cerrado do Estado do Tocantins

Um total de 61 espécies de leveduras foi identificado das 1.474 linhagens isoladas das patas de seis espécies de abelhas sem ferrão, totalizando 400 espécimes (Tabela II). As leveduras foram identificadas em 18 gêneros do filo Ascomycota (51 espécies) e seis gêneros do filo Basidiomycota (10 espécies). O número médio de isolados de leveduras por espécime de abelha variou entre 5,4 e 2,8 (Tabela II). Oito espécies não tiveram confirmada sua identificação, estando próximas a espécies conhecidas: (*Candida apicola*-like, *Candida friedrichi*-like, *Candida magnoliae*-like, *Candida parapsilosis*-like, *Debaryomyces nepalensis*-like, *Lachancea fermentati*-like, *Torulaspora delbrueckii*-like e *Rodosporidium toruloides*-like) com percentual de similaridade entre 82 e 88%, e requerem novos sequenciamentos utilizando novos iniciadores moleculares para confirmação de sua identidade como pertencentes a estas espécies ou a descrição de novas espécies.

É reconhecida a forte associação de leveduras ascomicéticas com insetos, inclusive abelhas (Morais et al. 1992; Rosa et al. 2003; Lachance, 2014). Leveduras ascomicéticas são descritas por Lachance (2014) como organismos copiotróficos. Elas assimilam poucas fontes de carbono quando ocorrem em ambientes ricos nestes compostos. São em geral fermentadoras facultativas e podem utilizar-se de uma forma de crescimento micelial para dispersão local, além disso podem liberar compostos odoríferos, atraindo insetos, que facilitam sua dispersão para outros ambientes

(Lachance, 2014). Assim, é esperado que insetos em geral, e abelhas particularmente, vetorizem uma predominância de leveduras ascomicéticas. Isto porque as abelhas visitam substratos usualmente ricos em proteína e carboidratos para forrageio, como pólen e nectários de flores, e frutos carnosos. As leveduras basidiomicéticas, em geral, dominam substratos como solos, ambientes aquáticos oligotróficos e filoplano vegetal, que não são atrativos para o forrageio de abelhas (Lachance, 2014).

Dos 1.474 isolados de leveduras obtidos de 400 espécimes de abelhas, o gênero *Candida* foi o mais comum, representando 33%, seguido de *Pichia* com 15%, *Torulaspota* com 13% e *Starmerella* com 10%. Os demais gêneros apresentaram frequências abaixo de 10% do total de isolados. O gênero *Candida* é um gênero polifilético e altamente diversificado, considerado um agrupamento artificial de várias espécies sem ancestralidade comum e ecologias diversas. Como a partir de 2011, apenas um nome passou a ser aceito para uma espécie fúngica, toda a classificação das leveduras está sendo reformulada. O gênero *Candida*, por exemplo, de 314 espécies em 2011 (Lachance et al. 2011), passará a ter menos de 20 espécies, sendo todas estas próximas filogeneticamente de *C. albicans* (Rosa et al. em preparação). Assim, sua alta frequência de isolamento neste trabalho deve-se mais à extensão atual do gênero, englobando espécies pouco relacionadas. Já os gêneros *Pichia* e *Starmerella* são frequentemente associados a insetos, e em especial a abelhas meliponíneos (Rosa et al. 2003; Thiago-Calaça et al. 2011).

As espécies que apresentaram maiores valores de frequência de ocorrência foram *Torulaspota delbrueckii* (47% de 400 abelhas), *Candida apicola* (34%), *Pichia membraniefaciens* (31%), *P. kluyveri* (23%), *Starmerella meliponinorum* (20%) e *S. bombicola* (17%), *Debaryomyces nepalensis* (13%), *Hanseniaspora guilliermondii* (12%) e *Candida parapsilosis*-like (10%). Além destas, 18 espécies do gênero *Candida* apresentaram frequências entre 1 e 9%, enquanto que apenas três espécies deste gênero apresentaram frequências abaixo de 1%. Entre as leveduras ascomicéticas de outros gêneros, 16 espécies apresentaram frequências acima de 1%, enquanto que outras sete espécies foram raramente (<1%) isoladas. Já as leveduras basidiomicéticas, seis das dez espécies identificadas apresentaram frequência de ocorrência entre 1-6%.

A frequência de isolamento ( $F_{iso}$ ) das espécies de leveduras mostra que poucas espécies podem ser consistentemente associadas às abelhas meliponíneos em Cerrado – apenas nove (14%) das espécies isoladas. A alta frequência de leveduras raras – aquelas

com menos de 1% de isolamento; mostra que o processo de vetorização pelas abelhas tem um forte componente aleatório em relação às leveduras e pode estar mais relacionado ao comportamento de forrageio das espécies de abelha, dependendo fortemente dos substratos visitados.

Em outros estudos, a ocorrência de leveduras foi relacionada com componentes do ninho de abelhas sem ferrão, que sugerem uma relação mutualista entre determinadas espécies de leveduras e abelhas sem ferrão. Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas do pólen estocado em ninhos de abelha piranha (*Ptilotrigona lurida*), tendo um suposto papel na desidratação, ensilagem do pólen e proteção contra invasão de forídeos (moscas da família Phoridae), que são inimigos naturais de abelhas sem ferrão (Camargo et al. 1992; Camargo & Pedro, 2002). Na Costa Rica, Lachance et al. (2001) isolaram as espécies *Candida powellii* e *Candida tilneyi* em abelhas do gênero *Trigona* e flores visitadas por elas. Espécies do gênero *Pichia* também foram isoladas de abelhas sem ferrão, especialmente as espécies *P. kudriavzevii* e *P. guilliermondii* (Thiago-Calaça, 2011; Saksinchai et al. 2012). O gênero *Starmerella* foi descrito em associação com abelhas sem ferrão por Rosa & Lachance (1998) e as espécies *S. meliponinorum*, *S. bombicola* e *S. neotropicalis* foram isoladas primeiramente do ninho dessas abelhas (Rosa & Lachance, 1998; Teixeira et al. 2003; Daniel et al. 2013)

Entre as seis espécies de abelhas meliponíneas, quatro pertencem à tribo Trigona. Nas abelhas desta tribo, foram obtidas 1004 isolados de leveduras, entre os quais o gênero *Candida* se destaca com 28% do total de isolados, seguido de *Pichia* (18%), *Starmerella* e *Torulaspota* (10% cada espécie), *Hanseniaspora* e *Metschnikowia* (6% cada), *Debaryomyces* (5%) e *Rhodotorula* que, apresentando 4% dos isolados, foi o gênero basidiomicético mais comum entre as leveduras obtidas de Trigonas. Estes sete gêneros ascomicéticos e o gênero basidiomicético *Rhodotorula* totalizaram 59% dos isolados de leveduras obtidos das abelhas trigonas. Entre as espécies de leveduras que apresentaram o maior número de isolados em trigonas estão *C. apicola* com 13%, *T. delbrueckii* (10%), *P. kluyveri* e *P. membranifaciens* (com 9% cada), *S. meliponinorum* (6%) e *D. nepalensis* e *H. guilliermondii* com 5% cada. As outras 40 espécies associadas a estas abelhas apresentaram frequências menores que 5%.

As leveduras isoladas da espécie *Frieseomellita varia* totalizaram 298 isolados pertencentes a 18 espécies. Os gêneros mais comumente isolados do total de isolados foram *Pichia* com 27%, *Hanseniaspora* com 17%, *Candida* com 15%, *Starmerella*

(14%), *Metschnikowia* (10%) e *Debaryomyces* (6%) que totalizam 89% do total de leveduras isoladas desta espécie de abelha. Dentre as espécies de leveduras isoladas desta abelha, *Hanseniaspora guilliermondii* foi a mais comum (17%), seguida de *Pichia membraniefaciens* (15%), *P. kluyveri* (12%), *S. bombicola* (10%) e *C. bombi* (8%). Não houve isolamento de *T. delbrueckii*, que foi comum entre as leveduras nas Trigona. *Hanseniaspora guilliermondii* foi isolada somente nesta abelha, e já foi isolada de frutos, insetos e plantas (Cadez & Smith, 2011) e pode ser associada ao ninho desta espécie de meliponíneo, por sua alta frequência de isolamento. *Pichia kluyveri* é uma espécie associada a frutos e outras partes de plantas (Kurtzman, 2011). *Starmerella bombicola* é uma espécie isolada de flores e um besouro do gênero *Conotelus* (Rosa & Lachance, 1998). *Candida bombi* foi isolada de abelhas solitárias e néctar (Lachance et al. 2011, Pozo et al. 2012). Rosa et al. (2003) isolaram, de cinco espécimes de abelhas *Frieseomelita varia*, sete linhagens identificadas como três espécies de leveduras, sendo 71,42% dos isolados pertencentes a *S. meliponinorum*.

As leveduras isoladas da abelha *Scaptotrigona polysticta* totalizaram 250 isolados pertencentes a 19 espécies. Os gêneros mais comuns foram *Candida* com 36% do total de isolados, *Torulaspota* (18%) e *Starmerella* (13%), perfazendo 67% dos isolados. As espécies mais comuns foram *Torulaspota delbrueckii* (18%), *S. meliponinorum* (13%), *C. apicola* e *C. friedrichii* (9% cada), *Hyphopichia burtonii* (7%) e *P. kluyveri* (6%). Não foram isolados representantes de *Hanseniaspora* e *Debaryomyces* nesta abelha.

Entre os 313 isolados pertencentes a 19 espécies de leveduras obtidas em *Scaptotrigona aff postica*, o gênero *Candida* foi o mais comum, com 36% do total de isolados, seguido de *Torulaspota* com 19% e *Debaryomyces* com 11%. Os gêneros *Metschnikowia*, *Pichia* e *Starmerella* representaram somente 3-4% dos isolados. Entre as espécies mais comuns estão *Candida apicola* (30%), *Torulaspota delbrueckii* (19%), *Debaryomyces nepalensis* (11%). As leveduras basidiomicéticas isoladas nessa espécie tiveram frequência de 0,3 – 5%. *Debaromyces nepalensis* foi isolada de abelhas solitárias, do solo e mucosa de cachorro (Suziki et al. 2011; Pozo et al. 2012). *C. apicola* é uma espécie associada com abelhas (Rosa et al. 2003) e *T. delbrueckii* é uma espécie isolada do solo e de frutas sendo fermentadoras eficientes (Kurtzman, 2011b).

Foram obtidas 184 isolados pertencentes a 13 espécies na abelha *Tetragonisca angustula angustula*. O gênero mais comum entre os isolados foi *Pichia* com 42% do

total, seguido de *Candida* (20%), *Starmerella* (11%) e *Lachancea* (10%). Entre as espécies, *Pichia membranifaciens* (24%), *P. kluyveri* (17%), *Candida apicola* (10%), *Lachancea fermentatii* (10%) e *Starmerella bombicola* (9%) foram as mais comuns entre os isolados. Não houve leveduras basidiomicéticas isoladas nesta abelha. *Lachancea fermentatii*, levedura que foi primeiramente descrita em associação a contaminação de sucos de frutas, ocorreu apenas em associação com esta abelha, e pode estar associada a seus ninhos (Lachance & Kurtzman, 2011). Em um estudo realizado por Rosa et al. (2003), foram isoladas 36 linhagens de leveduras classificadas em 12 espécies, em 29 espécimes da abelha *Tetragonisca angustula*, sendo 62% dos isolados pertencentes à levedura *Starmerella meliponinorum*, que no presente estudo foi isolada em frequência menor que 5%, com maior prevalência de *P. membranifaciens*. Isto mostra que podem haver diferenças geográficas na vetorização, e, portanto, distribuição de leveduras pelos meliponíneos. Também, podemos apontar a diferença nas frequências de isolamento das espécies de *Starmerella* no Cerrado do Estado do Tocantins, *S. bombicola* apresentou-se em maior frequência de isolamento que *S. meliponinorum*, espécie mais frequente nos meliponíneos *F. varia* e *T. angustula angustula* no Cerrado de Minas Gerais (Rosa et al., 2003).

Foram obtidas 429 isolados de leveduras em duas espécies da tribo Melipona. Entre estas leveduras, o gênero *Candida* foi prevalente com 45% dos isolados, seguido de *Torulaspora* com 20% do total de isolados, *Debaryomyces* com 14%, *Starmerella* com 10% e *Pichia* com 7% de isolados. Estes quatro gêneros compõem 96% dos isolados obtidos destas duas espécies de abelhas. *Torulaspora delbrueckii* foi a espécie com maior frequência entre os isolados em meliponas (20%), seguida de *C. apis* (8%), *Debaryomyces melissophilus* e *P. membranifaciens* (com 7% cada). É notável que somente a espécie *Cryptococcus laurentii* representou os basidiomicetos entre as leveduras isoladas de melíponas com apenas 0,5% de frequência. Somente 23 espécies de leveduras foram isoladas em meliponas, e gêneros frequentemente isolados como *Hanseniaspora*, *Metchsniakowia* entre os ascomicetos e *Rhodotorula*, entre os basidiomicetos, não foram isolados destas abelhas.

Entre os 157 isolados de sete espécies de leveduras isoladas de *Melipona compressipes manoensis*, o gênero *Candida* foi prevalente com 67% do total de isolados, seguido de *Debaryomyces* (17%) e *Torulaspora* (16%). Entre as espécies mais comuns entre os isolados, *Candida apis* (22%), *C. parapsilosis*-like e *Debaryomyces*

*robertsiae* (com 17% cada), *Torulaspora delbrueckii* (16%) e *C. powellii* (15%) representaram 87% do total. Não houve isolamento de *Pichia* e *Starmerella*, além dos gêneros já citados. Também, não ocorreu o isolamento de leveduras basidiomicéticas nesta abelha. *Candida apis* é uma levedura que foi descrita associada a abelhas e seus ambientes (Lanchance et al. 2011) e *C. powellii* foi isolada por Lanchance et al. (2001) em abelhas do gênero *Trigona* e flores visitadas. *Torulaspora* é um gênero já isolado de solos, uvas fermentadas, frutos, e sucos de agave, chá, maçãs, além da vegetação de mangue, musgos e casca de árvores (Kutzman et al, 2011). *D. robertsiae* é uma espécie descrita associada a abelhas (Suzuki et al. 2011). A espécie *C. parapsilosis*-like difere de *C. parapsilosis* com dissimilaridade da região D1/D2 mapeada de 7%, e representa provavelmente uma nova espécie.

Foram isoladas 272 leveduras pertencentes a 18 espécies em *Melipona scutellaris*. Destas, *Candida* foi o gênero mais comumente isolado (33%), seguido de *Torulaspora* (22%), *Starmerella* (17%), *Debaryomyces* (13%) e *Pichia* (11%) e totalizaram 96% do total. As espécies *T. delbrueckii* (22%), *D. mycophilus* e *P. membranifaciens* (cada uma com 11%) foram as mais comuns, seguidas de *S. bombicola* (9%), *S. meliponinorum* (8%), *C. ambrosiae* (7%) e *C. etchelsii* (6%). Somente uma levedura basidiomicética foi isolada nesta abelha: *Cryptococcus laurentii*, com menos de 1% do total de isolados.

Novas espécies de leveduras foram descritas em associação com meliponíneos nos últimos anos. Rosa & Lanchance (2005) isolaram a levedura *Zygosaccharomyces machadoi* no lixo do ninho de *Tetragonisca angustula*, e também novas espécies do gênero *Starmerella* foram descritas em associação com estas abelhas por Teixeira et al. (2003) e Daniel et al. (2013).



Tabela II. Frequência de ocorrência (Fo) e de isolamento (Fiso) de leveduras vetorizadas por seis espécies de abelhas sem ferrão em áreas de Cerrado no Estado do Tocantins, Brasil.

Espécie de levedura	Fo de leveduras em cada espécie de abelhas sem ferrão						F <sub>o</sub> Total	F <sub>iso</sub> Total
	<i>Frieseomellita varia</i> N=55	<i>Scaptotrigona polysticta</i> N=55	<i>Scaptotrigona aff. postica</i> N=110	<i>Tetragonisca angustula angustula</i> N=55	<i>Melipona compressipes manaoensis</i> N=50	<i>Melipona scutellaris</i> N=75		
<b>ASCOMYCOTA</b>								
<i>Candida ambrosiae</i>	0	0	0	0	0	20	5	1,4
<i>Candida apicola</i>	0	23	93	19	0	1	34	9,2
<i>Candida apicola-like</i>	5	0	0	0	0	6	2,75	0,7
<i>Candida apis</i>	0	0	0	0	34	0	8,5	2,3
<i>Candida batistae</i>	0	0	0	10	0	0	2,5	0,7
<i>Candida bombi</i>	24	0	0	0	0	12	9	2,4
<i>Candida bombiphila</i>	0	0	0	0	0	12	3	0,8
<i>Candida davenportii</i>	0	0	0	0	0	9	2,25	0,6
<i>Candida etchellsii</i>	0	0	13	0	0	16	7,25	2,0
<i>Candida floricola</i>	12	0	0	0	0	0	3	0,8
<i>Candida floris</i>	0	0	0	0	9	0	2,25	0,6
<i>Candida friedrichii</i>	0	24	0	0	0	8	8	2,2
<i>Candida friedrichii-like</i>	3	0	0	0	0	0	0,75	0,2
<i>Candida geochares</i>	0	0	5	0	0	0	1,25	0,3
<i>Candida magnoliae</i>	0	3	0	8	0	0	2,75	0,7
<i>Candida magnoliae-like</i>	0	0	1	0	0	0	0,25	0,1
<i>Candida melibiosica</i>	0	9	0	0	0	0	2,25	0,6
<i>Candida orthopsilosis</i>	0	0	0	0	12	0	3	0,8
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	0	0	0	5	1,25	0,3

Tabela II. Cont.

Espécie de levedura	Fo de leveduras em cada espécie de abelhas sem ferrão						Fo Total	Fiso
	<i>Frieseomellita varia</i> N=55	<i>Scaptotrigona polysticta</i> N=55	<i>Scaptotrigona aff. postica</i> N=110	<i>Tetragonisca angustula angustula</i> N=55	<i>Melipona compressipes manaoensis</i> N=50	<i>Melipona scutellaris</i> N=75		
<i>Candida parapsilosis-like</i>	0	14	0	0	27	0	10,25	2,8
<i>Candida powelii</i>	0	11	0	0	23	0	8,5	2,3
<i>Candida saitoana</i>	0	7	0	0	0	0	1,75	0,5
<i>Candida sorbophila</i>	0	0	2	0	0	0	0,5	0,1
<i>Debaryomyces mycophilus</i>	0	0	0	0	0	29	7,25	2,0
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	17	0	35	0	0	0	13	3,5
<i>Debaryomyces nepalensis-like</i>	0	0	4	0	0	0	1	0,3
<i>Debaryomyces robertsiae</i>	0	0	0	0	27	7	8,5	2,3
<i>Dipodascus australiensis</i>	0	4	0	0	0	0	1	0,3
<i>Geotrichum candidum</i>	1	0	0	0	0	0	0,25	0,1
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	50	0	0	0	0	0	12,5	3,4
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0	0	2	0	0	0	0,5	0,1
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	0	0	0	9	0	0	2,25	0,6
<i>Hyphopichia burtonii</i>	0	18	0	10	0	0	7	1,9
<i>Kazachstania lodderae</i>	0	0	0	0	0	3	0,75	1,9
<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i>	0	0	0	0	0	2	0,5	0,2
<i>Lachancea fermentati</i>	0	0	0	19	0	0	4,75	0,1
<i>Lachancea fermentati-like</i>	3	0	0	0	0	0	0,75	1,3
<i>Lalaria inositophila</i>	0	3	0	0	0	0	0,75	1,3
<i>Lindnera fabianii</i>	12	0	0	0	0	2	3,5	0,9
<i>Metschnikowia fructicola</i>	18	12	0	0	0	0	7,5	2,0

Tabela II. Cont.

Espécie de levedura	Fo de leveduras em cada espécie de abelhas sem ferrão						Fo Total	Fiso
	<i>Frieseomellita varia</i> N=55	<i>Scaptotrigona polysticta</i> N=55	<i>Scaptotrigona aff. postica</i> N=110	<i>Tetragonisca angustula angustula</i> N=55	<i>Melipona compressipes manaoensis</i> N=50	<i>Melipona scutellaris</i> N=75		
<i>Metschnikowia gruessii</i>	14	0	10	2	0	0	6,5	1,8
<i>Metschnikowia koreensis</i>	0	0	0	6	0	0	1,5	0,4
<i>Pichia kluyveri</i>	35	15	11	32	0	0	23,25	6,3
<i>Pichia membranifaciens</i>	46	0	2	45	0	31	31	8,4
<i>Starmerella bombicola</i>	29	0	0	15	0	26	17,5	4,7
<i>Starmerella meliponinorum</i>	12	32	10	6	0	21	20,25	5,5
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0	45	60	0	25	60	47,5	12,9
<i>Torulaspota delbrueckii-like</i>	0	5	0	0	0	0	1,25	0,3
<i>Wickerhamiella domercqia</i>	6	0	0	0	0	0	1,5	0,4
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0	0	0	3	0	0	0,75	0,2
<i>Wickerhamomyces pijperi</i>	0	9	0	0	0	0	2,25	0,6
<b>BASIDIOMYCOTA</b>								
<i>Cryptococcus bhutanensis</i>	3	0	7	0	0	0	2,5	0,7
<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	3	0	0	2	1,25	0,3
<i>Cyrenella elegans</i>	0	0	2	0	0	0	0,5	0,1
<i>Hannaella zeae</i>	0	0	1	0	0	0	0,25	0,1
<i>Kwoniella mangroviensis</i>	0	0	1	0	0	0	0,25	0,1
<i>Rhodospidium toruloides-like</i>	0	2	0	0	0	0	0,5	0,1
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	0	4	10	0	0	0	3,5	0,9

Tabela II. Cont.

Espécie de levedura	Fo de leveduras em cada espécie de abelhas sem ferrão						Fo Total	Fiso
	<i>Frieseomellita varia</i> N=55	<i>Scaptotrigona polysticta</i> N=55	<i>Scaptotrigona aff. postica</i> N=110	<i>Tetragonisca angustula angustula</i> N=55	<i>Melipona compressipes manaoensis</i> N=50	<i>Melipona scutellaris</i> N=75		
<i>Rhodotorula dairensis</i>	0	10	13	0	0	0	5,75	1,6
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	0	0	12	0	0	0	3	0,8
<i>Trichosporon asahii</i>	8	0	16	0	0	0	6	1,6
<b>Total de isolados</b>	<b>298</b>	<b>250</b>	<b>313</b>	<b>184</b>	<b>157</b>	<b>272</b>		
Riqueza de espécies (S)	18	19	21	13	7	19		
Riqueza esperada (S <sub>r</sub> )	17,7	18,7	19,2	12,9	7	17,9		
Número médio de isolados por indivíduo (abelha)	5,4	4,5	2,4	3,3	3,1	3,6		

### 3.2. Vetorização de leveduras por meliponíneos no Cerrado do Estado do Tocantins

As leveduras mais frequentes correspondem àquelas que foram detectadas em um maior número de indivíduos de abelhas. Assim, *Torulaspota delbrueckii* foi a levedura mais frequente, isolada em 47,5% das 400 abelhas amostradas neste estudo. Além desta levedura, outras oito espécies apresentaram frequências de ocorrência maiores que 10%: *C. apicola*, isolada em 34% das abelhas, *Pichia membranifaciens* (31%), *P. kluyveri*, isolada em 23%, *S. meliponinorum* (em 20% das abelhas), *S. bombicola* (17%), *Debaryomyces nepalensis* (13%), *H. guilliermondii* (12% das abelhas) e *C. parapsilosis*-like ( $F_o=10,2\%$ ) (Tabela II). Portanto, 52 espécies foram isoladas com frequência abaixo de 10% das abelhas amostradas.

Esta  $F_o$  elevada para *T. delbrueckii* indica uma possível associação entre esta levedura e as abelhas amostradas no cerrado. *Starmerella meliponinorum* não esteve entre as espécies mais comuns da comunidade. No entanto, ela foi frequentemente vetorizada pelas abelhas, o que pode indicar forte associação com seus ninhos, apesar de sua participação na comunidade de leveduras ter menor representatividade numérica. Como mostra a Tabela II, sua vetorização foi feita por todas as abelhas, exceto *Melipona compressipes manaoensis*; e ela foi frequentemente vetorizada por abelhas *S. polysticta* e *M. scutellaris*. Isto demonstra que a composição percentual da comunidade de leveduras não é indicativo único da importância das espécies, mas também é importante considerar-se a frequência  $F_o$  com que cada espécie é encontrada na associação, neste caso com as abelhas.

A alta percentagem de espécies incidentais (que ocorreram em associação com menos de 10% das abelhas) parece indicar que, durante a visitação, as abelhas carregam mecanicamente as c elulas de leveduras, e esta vetoriza o ocasional não indica que tais esp ecies sejam habitantes dos locais de forrageio e provavelmente não são mutualistas com as abelhas, ou seus ninhos. Somente as leveduras que apresentaram alta frequência de ocorrência – ou seja, foram consistentemente isoladas dos indivíduos amostrados podem ser hipoteticamente mutualistas das abelhas. Estas esp ecies podem possivelmente produzir substâncias voláteis que atraem abelhas, como comprovado na rela o entre algumas esp ecies de *Drosophila* e leveduras (Becher et al., 2012; Hamby et al., 2012), e promover a visita o dos substratos que colonizam, assim aumentando as suas chances de serem vetorizadas pela abelha; e podem mesmo serem carreadas para os

ninhos e colonizarem compartimentos nesses. Uma investigação das comunidades de leveduras em ninhos dessas abelhas poderá comprovar esta hipótese.

A riqueza esperada ( $S_r$ ) de espécies de leveduras em cada abelha, calculada pela técnica de rarefação, foi similar à riqueza encontrada ( $S$ ), mostrando que provavelmente alcançou-se suficiência amostral. A abelha *M. compressipes manaoensis* apresentou um menor valor de riqueza observada de espécies de leveduras em relação às demais abelhas. Isto sugere que esta abelha apresenta um espectro limitado de ambientes de visitação, pela baixa riqueza de leveduras, mas não possui seletividade por uma destas espécies de leveduras.

A comunidade de leveduras mostrou equitabilidade relativamente elevada (Tabela III). Esta variou de 0,96 para a comunidade de leveduras associada a *M. compressipes manaoensis* até 0,75 para a comunidade associada a *S. aff. postica*. O menor valor de  $J'$  em *S. aff. postica*, que apresentou a maior riqueza observada de espécies de leveduras, pode ser devido   alta frequência de vetoriza o ( $F_o$ ) de duas das 19 espécies de leveduras (*T. delbrueckii* e *S. meliponinorum*) sugerindo um comportamento de forrageio seletivo em rela o às leveduras, e diversificado em rela o aos substratos visitados, nesta espécie de abelha, no ambiente de cerrado. Ou seja, *S. aff. postica* pode ser atraída diferencialmente pelos compostos voláteis produzidos por *T. delbrueckii* e *S. meliponinorum*, que são duas leveduras fermentadoras de maltose e xilose, produzindo etanol e xilitol. Já *M. compressipes manaoensis* apresentou baixa riqueza, mas a maioria das espécies de leveduras foi frequentemente vetorizada: cinco entre sete espécies isoladas foram vetorizadas por mais de 40% das abelhas. Isto pode indicar que esta abelha visita poucos substratos, mas não tem mais atra o por uma levedura em detrimento das outras colonizando tais substratos.

Tabela III. Diversidade de espécies de leveduras vetorizadas por abelhas sem ferrão em áreas de cerrado do estado do Tocantins, Brasil.

Abelha sem ferrão	J'	d	H'
<i>Frieseomelita varia</i>	0,8774	2,984	2,536
<i>Scaptotrigona polysticta</i>	0,8975	3,26	2,643
<i>Scaptotrigona</i> aff. <i>postica</i>	0,7592	3,655	2,347
<i>Tetragonisca angustula angustula</i>	0,8819	2,301	2,262
<i>Melipona compressipes manaoensis</i>	0,9616	1,187	1,871
<i>Melipona scutellaris</i>	0,8568	3,211	2,523

J' = índice de equitabilidade de Pielou, d = índice de diversidade Margalef, H' = índice de diversidade Shannon-Winer.

A diversidade calculada pelo índice de Shannon-Winer (H') foi maior em *S. polysticta*, e menor em *M. compressipes manaoensis*. A abelha *Scaptotrigona polysticta* vetorizou com frequência acima de 50% apenas duas espécies de leveduras, e cinco outras espécies foram vetorizadas por 25 a 50% das abelhas, enquanto que doze espécies foram raramente vetorizadas – e provavelmente representam a microbiota de substratos raramente visitados. Já *M. compressipes manaoensis* vetorizou apenas sete espécies de leveduras, das quais apenas duas foram raramente vetorizadas: *C. orthopsilosis* foi vetorizada por 12 abelhas, e *C. floris* por nove entre 50 abelhas amostradas. Isto demonstra que este índice de diversidade é fortemente influenciado pela presença de espécies raras na amostra, e a diferença entre as duas espécies de abelhas provavelmente reside nas diferenças de comportamento de forrageio, sendo que *S. polysticta* possui espectro mais amplo de visitação que *M. compressipes manaoensis*.

A diversidade calculada pelo índice de Margalef (d) foi maior em *S. aff. postica*, que apresentou a maior riqueza específica; e menor em *M. compressipes manaoensis*, que teve a mais baixa riqueza de espécies.

A composição de espécie de leveduras vetorizadas foi bastante distinta entre os meliponíneos. Nenhuma espécie de levedura foi isolada em todas as espécies de abelhas, somente *S. meliponinorum* foi isolada de cinco abelhas (ausente em *M. compressipes manaoensis*); e somente quatro espécies de leveduras entre 61 foram isoladas de quatro entre as seis espécies de abelhas: *C. apicola*, *P. kluyveri*, *P. membranifaciens* e *T. delbrueckii*. O número de espécies compartilhadas foi menor que

o número de espécies exclusivas: das 61 espécies de leveduras identificadas apenas 28 foram compartilhadas por duas ou mais espécies de abelhas. Apenas dez espécies de leveduras foram compartilhadas entre Trigonas e Meliponas: *C. apicola*, *C. apicola*-like, *C. bombi*, *C. etchelsii*, *C. friedrichii*, *C. parapsilosis*-like, *C. powelli*, *S. meliponinorum*, *T. delbrueckii* e *Cryptococcus laurentii*. Destas, as espécies *C. apicola*, *S. meliponinorum* e *T. delbrueckii* foram frequentes, e podem estar associadas a abelhas meliponíneos, como já reportado em estudos anteriores de Rosa *et al.* (2003) e Thiago Calaça *et al.* (2013). Já as outras sete espécies podem ser comuns em substratos visitados.

O diagrama de Venn apresentado na Figura II representa o compartilhamento de espécies de leveduras pelas quatro espécies de abelhas trigonas, *Frieseomelita varia*, *Scaptotrigona polysticta*, *Scaptotrigona* aff. *postica* e *Tetragonisca angustula angustula*. As trigonas vetorizaram, em comum, duas espécies de leveduras: *P. kluyveri* e *S. meliponinorum*, o que indica que estas espécies podem estar associadas aos ninhos de abelhas trigonas, e estas abelhas são importantes vetores destas espécies. *Pichia kluyveri* só é vetorizada por abelhas trigonas, e não foi encontrada nas meliponas, neste estudo.

A abelha *S. aff. postica* apresentou 11 espécies não compartilhadas com quaisquer outras abelhas; *S. polysticta* apresentou dez espécies não compartilhadas; *F. varia* vetorizou nove espécies não compartilhadas e *T. angustula angustula* apresentou cinco espécies não compartilhadas com outras trigonas.

*S. polysticta* (Ab2 no diagrama) compartilha seis espécies com *S. aff. postica* (Ab3), *Candida apicola* que é compartilhada (também com *T. angustula angustula*), *P. kluyveri* e *S. meliponinorum* que são comuns a todas as trigonas e *T. delbrueckii*, *R. aurantiaca* e *R. dairensis* que são compartilhadas unicamente pelas duas abelhas. *Frieseomelita varia* (Ab1) e *S. polysticta* (Ab2) apresentaram compartilhamento de três espécies entre si, *P. kluyveri*, *S. meliponinorum*, comuns a todas as trigonas, e *Metschnikowia frutícola*. *Scaptotrigona* aff. *postica* (Ab3) compartilhou cinco espécies de leveduras com *T. angustula angustula* (Ab4), *C. apicola* (também compartilhada com *S. polysticta*), *M. gruessii* e *P. membranifaciens* (também compartilhadas com *F. varia*), *P. kluyveri* e *S. meliponinorum*, que são comuns às trigonas, mas não houve levedura comum a somente estas duas abelhas. *F. varia* (Ab1) compartilhou cinco espécies de leveduras com *S. aff. postica* (Ab3), *D. nepalensis* e *Cryptococcus*



*buthanensis*, comuns somente a estas duas abelhas, *P. membraniefaciens* (compartilhada com *T. angustula angustula*), *P. kluyveri* e *S. meliponinorum*, comuns às trigona, e quatro espécies com *T. angustula angustula* (Ab4) mas nenhuma comum somente às duas abelhas.

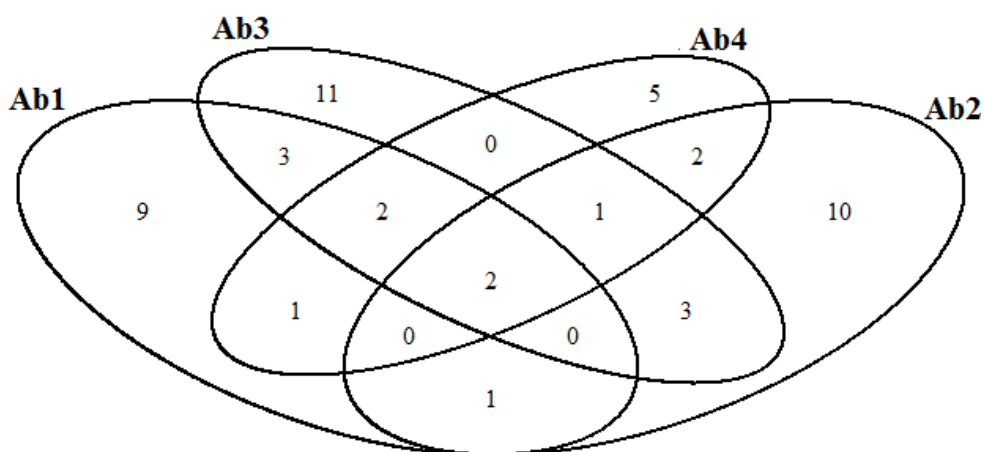


Figura II. Diagrama de Venn com o número de espécies de leveduras compartilhadas e exclusivas entre abelhas trigonas em áreas de cerrado no Estado do Tocantins, Brasil. Ab1= *Friseomelita varia*, Ab2=*Scaptotrigona polysticta*, Ab3=*Scaptotrigona* aff. *postica*, Ab4=*Tetragonisca angustula angustula*

O baixo número de espécies compartilhadas indica segregação de locais de forrageio, sendo que as espécies comuns a todas as abelhas trigonas são reconhecidamente associadas a meliponíneos por outros estudos, no caso de *S. meliponinorum*, ou copiotróficas de sucesso, no caso de *P. kluyveri* que é uma competidora eficaz em ambientes fermentativos.

A figura III apresenta o compartilhamento de espécies de leveduras entre as abelhas meliponas. Como a tabela II mostrou, estas abelhas vetorizaram 24 espécies de leveduras, sendo somente uma espécie – *Cryptococcus laurentii* – basidiomicética. Entre estas 24 espécies, foram comuns a ambas somente *Debaryomyces robertsiae* e *Torulaspora delbrueckii*. Assim, apesar de trigonas e meliponas apresentarem dez espécies em comum, as duas abelhas meliponas apresentaram apenas duas espécies de levedura em comum, indicando forte separação nos substratos visitados.

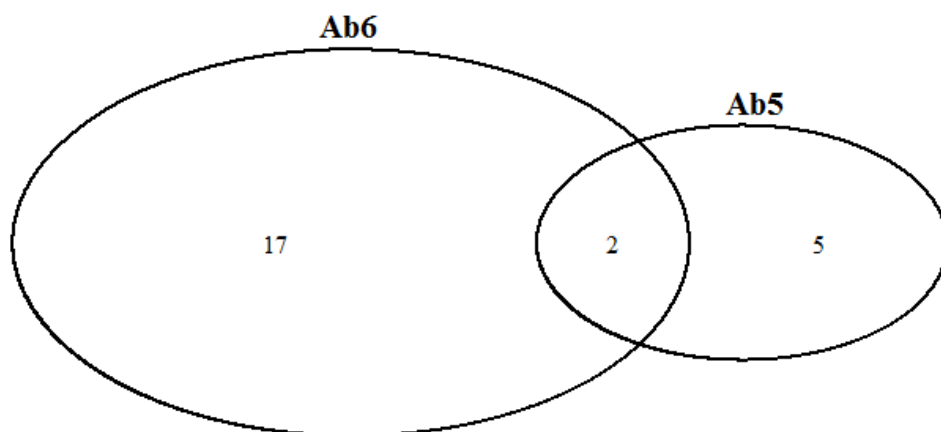


Figura III. Diagrama de Venn com o número de espécies de leveduras compartilhadas e exclusivas entre abelhas meliponas em áreas de cerrado no Estado do Tocantins, Brasil. Ab5= *Melipona compressipes manaoensis*, Ab6=*Melipona scutellaris*.

O grande número de espécies de leveduras exclusivas de cada abelha sugere um comportamento de forrageio segregado, ou seja, as abelhas compartilham poucos substratos de visitação, o que pode indicar uma estratégia de convivência, evitando a competição. As espécies comuns à maioria das abelhas também apresentaram alta frequência, o que pode indicar – como discutido acima, uma associação com os ninhos e as abelhas meliponíneas. A abelha *M. scutellaris* compartilha mais espécies de leveduras com as abelhas trigonas que com a abelha *M. compressipes manaoensis*, indicando que o forrageio desta abelha ocorre em substratos comuns às trigonas, e menor sobreposição de nicho alimentar com a abelha da mesma tribo.

A similaridade na composição da comunidade de leveduras entre abelhas (Tabela IV, Figura IV) foi maior entre *Scaptotrigona polysticta* e *Tetragonisca angustula angustula* (0,18), *Scaptotrigona postica* e *Friesomelita varia* (0,21). As espécies de meliponas ficaram isoladas, não formando um agrupamento, sendo uma observação que fortalece o argumento que abelhas da tribo Meliponini são mais seletivas no forrageamento, e dominam a coleta de pólen em relação às abelhas da tribo Trigonini, que procuram diversificar a coleta em outros substratos (Marques-Souza et al. 2002). Também indica menor sobreposição de nicho entre meliponas que entre trigonas.

Tabela IV. Matriz de similaridade de Jaccard para as leveduras vetorizadas por seis espécies de abelhas sem ferrão em áreas de cerrado no estado do Tocantins, Brasil.

	Ab1	Ab2	Ab3	Ab4	Ab5	Ab6
Ab1						
Ab2	0,08					
Ab3	0,21	0,17				
Ab4	0,19	0,18	0,16			
Ab5	0	0,13	0	0		
Ab6	0,15	0,11	0,17	0,14	0,04	

Ab1= *Frieseomelita varia*, Ab2=*Scaptotrigona polysticta*, Ab3=*Scaptotrigona aff. postica*, Ab4=*Tetragonisca angustula angustula*, Ab5=*Melipona compressipes manaoensis*, Ab6=*Melipona scutellaris*.

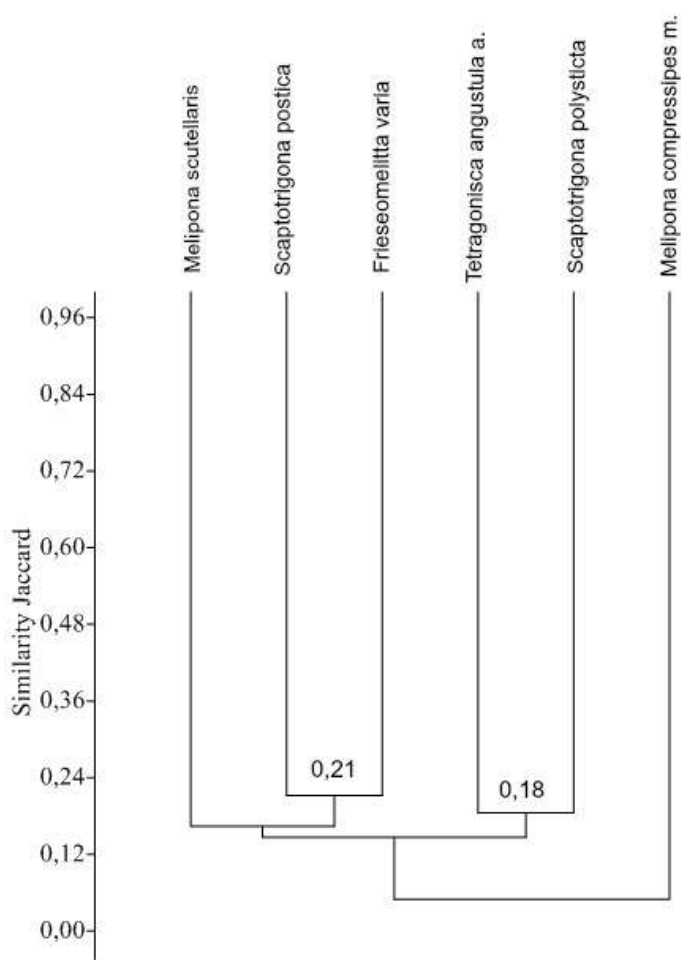


Figura IV. Dendrograma de similaridade das leveduras vetorizadas por diferentes espécies de abelhas sem ferrão em áreas de cerrado no estado do Tocantins. Agrupado pela similaridade Jaccard e o método de ligação grupos pareados.

### 3.2 A vetorização de leveduras por *Scaptotrigona aff. postica* em áreas urbana e rural florestada no Estado do Tocantins

Em 30 abelhas operárias de *S. aff. postica*, coletadas em cinco caixas de criatório racionais, foram isoladas 62 linhagens de leveduras, sendo identificadas em oito gêneros e 10 espécies, com porcentagem de similaridade entre 99-100% com as sequências depositadas no Genbank (Tabela V). Dos gêneros identificados, cinco pertencem ao filo Ascomycota (*Candida*, *Cynerella*, *Hanseniaspora*, *Kwoniella* e *Starmerella*) e três ao filo Basidiomycota (*Cryptococcus*, *Hanaella*, *Rhodotorula*). Isto mostra que a dominância de leveduras ascomicéticas é um padrão comum entre as comunidades associadas a abelhas meliponíneos, mesmo quando criadas em caixas racionais e alimentadas com alimentação artificial de maneira auxiliar à coleta de pólen e néctar. A presença significativa de leveduras basidiomicéticas pode ser um indicativo de que há maior escassez de substratos em ambiente urbano que em ambientes selvagens, e as abelhas visitam substratos mais diversos, e nem sempre preferenciais, nas áreas urbanas.

A espécie *Candida apicola* foi a levedura com maior frequência de ocorrência (43%), seguida de *C. etchelsii* e *R. mucilaginoso*, e depois *S. meliponinorum*. Como discutido acima, esta é uma levedura basidomicética que não foi frequentemente vetorizada por meliponíneos em outras regiões, e só ocorreu associada a esta abelha na região urbana de Taquaruçu. *Candida apicola* e *S. meliponinorum* confirmam sua associação com meliponíneos. As espécies *Candida sorbophila*, *Cynerella elegans*, *Hanaela zae* e *Kwoniella mangrovensis* foram menos frequentes entre as leveduras isoladas, sugerindo um comportamento de forrageio diversificado entre abelhas da mesma localidade.

A diferença na composição de espécies de leveduras vetorizadas pelas abelhas de diferentes ninhos pode estar relacionada com o comportamento agressivo intraespecífico de *S. postica* entre abelhas de diferentes ninhos nos locais de forrageamento, e também por apresentar preferência em coletar nos locais sinalizados por ferormônios de abelhas da colônia específica (Schorkopf et al. 2009; Schorkopf et al. 2011). Assim, *C. elegans*, *H. zae* e *K mangrovensis* foram isoladas de abelhas de um ninho somente. E somente *C. apicola* foi isolada de abelhas de todos os ninhos.

**Tabela V.** Distribuição das espécies de leveduras vetorizadas por abelhas *Scaptotrigona* aff. *postica* em cinco ninhos de um sistema de meliponicultura localizado no Distrito de Taquaruçu, Palmas-TO.

<b>Espécie</b>	<b>Caixa 1</b> <b>N=6</b>	<b>Caixa 2</b> <b>N=6</b>	<b>Caixa 3</b> <b>N=6</b>	<b>Caixa 4</b> <b>N=6</b>	<b>Caixa 5</b> <b>N=6</b>	<b>Total</b> <b>N=30</b>	<b>F<sub>o</sub></b> <b>(%)</b>
<i>Candida apicola</i>	4	2	1	3	3	13	43,3
<i>Candida etchellsii</i>	1	0	1	2	3	7	23,3
<i>Candida sorbophila</i>	2	0	0	0	0	2	6,7
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	0	0	0	2	3	10
<i>Cynerella elegans</i>	0	0	2	0	0	2	6,7
<i>Hanaella zea</i>	0	0	1	0	0	1	3,3
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1	0	0	1	0	2	6,7
<i>Kwoniella mangrovensis</i>	1	0	0	0	0	1	3,3
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	4	1	2	0	7	23,3
<i>Starmerella meliponinorum</i>	2	0	1	3	0	6	20
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>44</b>	

Comparando-se com as leveduras identificadas em meliponários que não utilizam caixas racionais, e situados em áreas florestadas (Tabela VI), não houve espécies em comum. Isto indica que diferenças geográficas são importantes e podem influenciar a comunidade de leveduras vetorizadas pelas abelhas. Em meliponários em áreas rurais de Novo Acordo-TO, *C. tilneyi* foi a espécie mais frequentemente vetorizada (72%), seguida de *C. apis* (68% das abelhas), *C. parapsilosis*-like e *D. robertsiae* (54%) e *T. delbrueckii* (50%). Nesta localidade, *S. aff. postica* não vetorizou leveduras basidiomicéticas. Também, a maioria das leveduras foi vetorizada por abelhas de diferentes meliponários (equivalentes às caixas racionais), sendo que somente *C. tilneyi* e *K. dobzhanski* estiveram ausentes de três dos seis meliponários amostrados.

**Tabela VI.** Distribuição das espécies de leveduras vetorizadas por abelhas *Scaptotrigona* aff. *postica* em áreas florestadas rurais no município de Novo Acordo, Estado do Tocantins.

<b>Espécies</b>	<b>Me1 N=12</b>	<b>Me2 N=8</b>	<b>Me3 N=8</b>	<b>Me4 N=12</b>	<b>Me5 N=5</b>	<b>Me6 N=5</b>	<b>Total N=50</b>	<b>F<sub>o</sub></b>
<i>Candida apis</i>	4	6	7	0	9	8	34	68
<i>Candida floris</i>	1	2	2	0	3	1	9	18
<i>Candida orthopsilosis</i>	2	0	2	0	2	6	12	24
<i>Candida parapsilosis-like</i>	6	4	6	1	4	6	27	54
<i>Candida powelii</i>	4	0	5	4	5	5	23	46
<i>Candida tilneyi</i>	12	0	0	12	0	12	36	72
<i>Debariomyces robertsiae</i>	3	4	7	5	1	7	27	54
<i>Kluyveromyces dobzansky</i>	2	0	3	0	3	0	8	16
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	4	5	2	7	6	1	25	50
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>21</b>	<b>34</b>	<b>29</b>	<b>33</b>	<b>46</b>	<b>201</b>	

### 3.3 Diversidade funcional de leveduras vetorizadas por *Scaptotrigona* aff. *postica* em uma área urbana

Um total de 52 linhagens de leveduras isoladas de *S. aff. postica* foram submetidas a testes fisiológicos *in vitro* e quantificados os traços funcionais (Tabela VII). A assimilação dos carboidratos galactose (65,38%), maltose (63,43%) e celobiose (55,76%) foi mais frequente entre os isolados, enquanto que trealose (44,23%), sacarose (26,92%), xilose (21,15%), amido (19,23%) e melibiose (13,46) foram assimilados por um número de isolados abaixo de 50% das leveduras testadas. Entre os compostos voláteis, as linhagens foram capazes de assimilar etanol (36,53%), mas poucas linhagens assimilaram acetona (17,30%), metanol (9,16%) e isopropanol (5,76%). O teste para o crescimento em meio osmofílico mostrou que 53,84% linhagens são osmofílicas. Também a resistência ao ácido acético foi comum entre as linhagens (67,30%), enquanto que o crescimento em altas temperaturas como 37°C (21,15%) e 40°C (19,23%) não foi comum. Entre as linhagens testadas, 51,92% dos isolados apresentam a habilidade de fermentar glicose. A fermentação é uma habilidade que pode contribuir para maturação do mel e na transformação do pólen em saborá dentro da colmeia (Gilliam, 1979). Na colonização de substratos como o saborá, leveduras podem transformar o pólen estocado conferindo desidratação, ensilagem e proteção contra florídeos que são predadores do pólen estocado em ninhos de abelhas nativas (Gilliam, 1979; Camargo et al. 1992; Fernandes-da-silva & Serrão, 2000).

Tabela VII. Atributos funcionais apresentados em testes *in vitro* por 52 linhagens de leveduras vetorizadas pela abelha *Scaptotrigona* aff. *postica* em um sistema de meliponicultura localizado em Taquaruçu, distrito de Palmas-TO

<b>Traço funcional</b>	<b>Total de leveduras</b>
Fermentação de glicose	27
Assimilação de galactose	34
Assimilação de maltose	33
Assimilação de sacarose	14
Assimilação de celobiose	29
Assimilação de trealose	23



Tabela VII. Cont.

<b>Traço funcional</b>	<b>Total de leveduras</b>
Assimilação de melibiose	7
Assimilação de amido	10
Assimilação de xilose	11
Assimilação de etanol	19
Assimilação de metanol	5
Assimilação de acetona	9
Assimilação de isopropanol	3
Resistência ao ácido acético	35
Crescimento em 50% glicosse	28
Crescimento em 37°C	11
Crescimento em 40°C	10

A assimilação dos carboidratos galactose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, melibiose, xilose e amido, indicam que os isolados tiveram origem de partes de plantas, como frutos, flores, nectários (Starmer, 1981). Das leveduras isoladas de *S. postica*, 63,46% assimilam maltose e 53,84% são osmofílicas, estas habilidades permitem a colonização dos potes de mel, entretanto outros atributos são necessários para que sejam estabelecidas populações nesse ambiente seletivo, como o crescimento na presença de ácidos orgânicos e compostos voláteis. Substâncias voláteis como álcoois e acetona foram encontradas em secreções mandibulares de *S. postica* por Gracioli-Vitti et al. (2012).

#### **4. Considerações finais**

No cerrado tocantinense, foram vetores de identificadas 62 espécies de leveduras sendo vetorizadas por seis espécies de abelhas sem ferrão, algumas das quais parecem estabelecer relações simbióticas com estes meliponíneos. As leveduras *Starmerella meliponinorum*, *Candida apicola*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membranifaciens* e *Torulaspota delbrueckii* foram as mais frequentes, sendo as espécies *S. meliponinorum*

e *C. apicola* consideradas por outros autores como verdadeiramente associadas a meliponíneos. É possível que essas leveduras, que foram frequentes nesse estudo, tenham papel na nutrição das abelhas, atração por substratos, ou ainda, podem ser habitantes do ninho.

A comunidade de leveduras vetorizadas por meliponíneos parece corresponder às prováveis comunidades de substratos visitados pela alta prevalência de leveduras ascomicéticas e baixa frequência de leveduras basidiomicéticas. As leveduras ascomicéticas são prevalentes em frutos, flores e outros substratos açucarados, enquanto que as basidiomicéticas dominam comunidades de superfície foliar de plantas e solos ou água. Assim, é possível concluir que as abelhas agem como dispersores de leveduras entre substratos.

A baixa similaridade de espécies de leveduras vetorizadas demonstra uma provável segregação de nichos de forrageio entre as abelhas. Inclusive, é possível prever que algumas espécies de abelhas possuem padrão de visitação e forrageamento mais limitado – pela baixa riqueza e diversidade de leveduras isoladas. Também, fica clara uma diferenciação entre as abelhas da tribo Trigonini e Meliponi quanto às estratégias de forrageamento, reveladas pela composição de espécies de leveduras vetorizadas.

## **6. Referências**

Bankova V., Boudourova-Krasteva, G., Popov, S., Sforcin, J.M., Funari, S.R.C., 1998. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie* 29, 361-367.

Barros, R.S.M., 2007. Medidas de Diversidade Biológica. Programa de pós-graduação em ecologia aplicada ao manejo e conservação de recursos naturais – Universidade Federal de Juiz de Fora, Disponível em: [http://www.ufjf.br/ecologia/files/2009/11/Estagio\\_docencia\\_Ronald1.pdf](http://www.ufjf.br/ecologia/files/2009/11/Estagio_docencia_Ronald1.pdf). Acesso em 17 fev. 2017.

- Barros Lopes, M., Soden, A., Henschke, P.A., Langridge, P., 1996. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4514-4520.
- Becher, P.G., Flick, G., Rozpedowska, E., Schmidt, A., Hagman, A., Lebreton, S., Larsson, M.C., Hansson, B.S., Piskur, J., Witzgall, P., Bengtsson, M., 2012. Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Functional Ecology* 26, 822-828.
- Brito, E.R., Martins, S.V., Oliveira-Filho, A.T., Silva, E., Silva, A.F., 2006. Estrutura fitossociológica de um fragmento natural de floresta inundável em área de orizicultura irrigada, município de Lagoa da Confusão, Tocantins. *Revista Árvore* 30(5), 289-336.
- Cadez, N., Smith, M.T., 2011. *Hanseniaspora* Zikes (1912). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. *The Yeasts: a Taxonomic Study*, five edition. v2. Elsevier, Amsterdam, pp. 421-434.
- Camargo, J.M.F., Garcia, M., Júnior, E., Castrillon, A., 1992. Notas prévias sobre a bionomia de *Ptilotrigona lurida* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): associação de leveduras em pólen estocado. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*. 8(2), 391-394.
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 2002. Meliponini neotropicais: o gênero *Ptilotrigona* Moure (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Revista Brasileira de Entomologia* 48:3, 353-377.
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D., Melo, G.A.R., (Eds.). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em 18 de novembro de 2016
- Carvalho, C.A.L., Souza, B.A., Sodré, G.S., Marchini, L.C., Alves, R.M.O., 2005. Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. *Série meliponicultura* 4, Cruz das Almas-BA, Brasil.
- Chen, H., Boutros, P., 2011. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* 12, 1-7.

Costa-Neto, D.J., Oliveira, D.P., Morais, P.B., 2016. Leveduras associadas a abelha tubi bravo e aos produtos do ninho em sistemas de meliponicultura. *Ciencia & Tecnologia* 8: edição especial.

Daniel, H.M., Rosa, C.A., Thiago-Calaça, P.S.S., Antonini, Y., Bastos, E.M.A.F., Evrard, P., Huret, S., Fidalgo-Jiménez, A., Lachance, M.A., 2013. *Starmerella neotropicalis* f. n. sp. nov., a yeast species found in bees and pollen. *International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology*. 63, 3896-3903.

Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., Piskur, J., 2014. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research* 14, 826-832.

Douglas, A.E., 2009. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology* 23, 38-47.

Douglas, A.E., 2014. Multiorganismal Insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review entomology* 60, 17-34.

Fernandes-da-Silva, P.G., Serrão, J., 2000. Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee, *Scaptotrigona postica* Latr. (hymenoptera, apidae, meliponini). *Apidologie* 31(1), 39-45.

Fonseca, C.R., Ganade, G., 2001. Species functional redundancy, random extinctions and the stability of ecosystems. *Journal of ecology* 89,118-125

Gilliam, M., 1979. Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidology* 10, 43-53.

Gonzalez, F., 2014. Symbiosis between yeast and insects. *Sveriges lantbruks universitet*. 3, 1-52.

Gracioli-Vitti, L.F., Cruz-Landim, C., Abdalla, F.C., 2012. Volatile substances of mandibular gland secretion of a stingless bee: *Scaptotrigona postica* Latreille. *Animal Biology Journal* 3(2), 77-88.

Hamby, K.A., Hernadéz, A., Boundy-Mills, K., Zalom, F.G., 2012. Associations of Yeasts with Spotted-Wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*; Diptera: Drosophilidae) in Cherries and Raspberries. *American Society for Microbiology Journal*. 78(14), 4869-4873.

- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 1-9
- Heck, K.L., van Belle, G., Simberloff, D., 1975. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology* 56, 1459–1461.
- Herbert Jr., E.W., Shimanuki, H., 1978. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidology* 9, 33-40.
- Herrera, C.M., Vega, C., Canto, A., Pozo, M.I., 2009. Yeast in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of Botany* 103, 1415-1423.
- Herrera, C.M., Pozo, M.I., 2010. Nectar yeasts warm the flowers of a winter-blooming plant. *Proceeding of the Royal Society* 277, 1827-1834.
- Herrera, C.M., Pozo, M.I., Medrano, M., 2013. Yeasts in nectar of an early-blooming herb: sought by bumble bees, detrimental to plant fecundity. *Ecology* 94, 273-279.
- Hurlbert, S.H., 1971. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* 52, 577–586
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010a. Tocantins, Dianópolis. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/painel/historico.php?codmun=172100>. Acesso em 16 fev. 2017.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010b. Tocantins, Palmas. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/painel/historico.php?codmun=172100>. Acesso em 16 fev. 2017.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatic* 28, 1646-1649
- Kerr, W.E., Carvalho, G.A., Nascimento, V.A., 1996. *Abelha urucu: biologia, manejo e conservação*. Acangaú, Belo Horizonte, Brasil.

Kurtzman, C.P., 2011a. *Pichia* E.C Hansen (1904). in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T.. *The Yeasts: a Taxonomic Study*, five edition. v1. Elsevier, Amsterdam, pp.685-707.

Kurtzman, C.P., 2011b. *Torulaspora* Lindner (1904). in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T.. *The Yeasts: a Taxonomic Study*, five edition. v1. Elsevier, Amsterdam, pp.867-881.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331–371.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011a. *The Yeasts: a Taxonomic Study*, five edition. v1. Elsevier, Amsterdam.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011b. Gene Sequence Analyses and other DNA-Based Methods for Yeast Species Recognition. in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T.. *The Yeasts: a Taxonomic Study*, five edition. v1. Elsevier, Amsterdam, pp.137-144.

Lachance, M.A., 2011b. *Metschnikowia* Kamienski (1899). in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. *The Yeasts: a Taxonomic Study*, five edition. v2. Elsevier, Amsterdam, pp. 575-620.

Lachance, M.A., 2014. The Biodiversity, Ecology and Biogeography of Ascomycetous Yeast. in: Wiley, J., Sons, Inc. *The Ecological Genomics of Fungi*, first edition, pp.355-370.

Lachance, M.A., Bowles, J.M., Starmer, W.T., Barker, J.S.F., 1999. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Can. J. Microbiol.* 45(2), 172-177.

Lachance, M.A., Bowles, J.M., Chavarria-Diaz, M.M., Janzen, D.H., 2001. *Candida cleridarum*, *Candida tilneyi*, and *Candida powellii*, three new yeast species isolated from insects associated with flowers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 51, 1201-1207.

- Lachance, M.A., Boekhout, T., Scorzetti, G., Fell, J.W., Kurtzman, C.P., 2011. *Candida* Berkhout (1923). in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, five edition, v2. Elsevier, Amsterdam, pp. 987–1278.
- Lachance, MA., Kurtzman, C.P., 2011. *Lachancea* Kurtzman (2003). in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, five edition, v2. Elsevier, Amsterdam, pp. 511-520.
- Ledeberg, J., Lederbeg, E. M., 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J Bacteriol.* 63: 399–406.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical Ecology*. five edition. Elsevier Science, Amsterdam, pp207-246.
- Marques-Souza, A.C., Miranda, I.P.A., Moura, C.O., Rabelo, A., Barbosa, E.M. 2002. Características morfológicas e bioquímicas do pólen coletado por cinco espécies de meliponíneos da Amazônia central. *Acta Amazônica.* 32(2), 217-229.
- Martins, I.C.M., Soares, V.P., Silva, E., Brites, R.S., 2002. Diagnóstico ambiental no contexto da paisagem de fragmentos florestais naturais “ipucas” no município de Lagoa da Confusão, Tocantins. *Revista Árvore* 26(3), 299-309.
- Menezes, H., 2005. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto biológico* 72(3), 405-411.
- Michener, C.D., 2013. The Meliponini. In: Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D.W. (Eds). *Pot-Honey: a legacy of stingless bees*. Springer Science, New York, pp3-17.
- Morais, P.B., Hagler, A.N., Rosa, C.A., Mendonça-Hagler, L.C., 1992. Yeast associated with *Drosophila* in tropical forest of Rio de Janeiro, Brasil. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 1150- 1155.
- Morais, P.B., Rosa, C.A., Hagler, A.N., 1994. Yeast communities as descriptors of habitat use by the *Drosophila fasciola* subgroup (repleta group) in Atlantic rain forests. *Oecologia* 104, 45-51.
- Morais, P.B., Thiago-Calaça, P.S.S., Rosa, C.A., 2013. Microorganisms Associated with Stingless Bees. in: Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D.W. (Eds). *Pot-Honey: a legacy of stingless bees*. Springer Science, New York pp.173-186.

- O'Donnell, K., 1993. *Fusarium and its near relatives*. in: Reynolds, D.R., Taylor, J.W. (Eds). *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. Wallingford (UK): CAB International pp. 225-233.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., 2017. *Ordination methods, diversity analysis and other functions for community and vegetation ecologists*.
- Park, Y.K., Koo, M.H., Oliveira, I.M.A., 1996. Biochemical characteristic of osmophilic Yeast isolated from pollens and honey. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60(11), 1872-1873.
- Patricio, E.F.L.R.A., Cruz-Lopes, L., Maile, R., Tentschert, J., Jones, G.R., Morgan, E.D., 2002. The propolis of stingless bees: terpenes from the tibia of three *Frieseomelitta* species. *Journal of Insect Physiology* 48, 249-254.
- Pedro, S.R.M., 2014. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 61, 348-354.
- Pereira, A.S., Seixas, F.R.M.S., Aquino-Neto, F.R., 2002. Própolis:100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química nova* 25(2), 321-326.
- Pozo, M.I., Herrera, C.M., Bazaga, P., 2011. Species richness of yeast communities in floral nectar of Southern Spanish plants. *Microbiology Ecology* 61, 82-91
- Pozo, M.I., Lachance, M.C., Herrera, C.M., 2012. Nectar yeasts of two southern Spanish plants: the roles of immigration and physiological traits in community assembly. *FEMS Microbiology Ecology* 80, 281-293.
- Pozo, M.I., Lievens, B., Jacquemyn, 2014. Impact of microorganisms on nectar chemistry, pollinator attraction and plant fitness. in: Peck, R.L. (Eds). *Nectar: Production, Chemical Composition and Benefits to Animals and Plants*. New York: Nova Science Publishers 1-45.
- Ramette, A., 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 62, 142-160.
- R Core Team, 2015. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>



Rosa, C.A., Lachance, M.A., 1998. The yeast genus *Starmerella* gen.nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1413-1417.

Rosa, C.A., Lachance, M.A., Silva, J.O.C., Teixeira, A.C.P., Marini, M.M., Antonini, Y., Martins, R.P., 2003. Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research* 4, 271-275.

Rosa, C.A., Lachance, M.A., 2005. *Zygosaccharomyces machadoisp. n.*, a yeast species isolated from a nest of the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Lundiana* 6, 27–29.

Rosa et al., (em preparação). *Leveduras: classificação, taxonomia, ecologia e importância biotecnológica*, capítulo de livro em preparação.

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

Schorkopf, D.L.P., Hrncir, M., Mateus, S., Zucchi, R., Schmidt, V.M., Barth, F.G., 2009. Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: further evidence for their role in interspecific and intraspecific defence and aggression and against their role in food source signalling. *Journal of Experimental Biology*. 212, 1153-1162.

Schorkopf, D.L.P., Morawetz, L., Bento, J.M.S., Zacchi, R., Barth, F.G., 2011. Pheromone paths attached to the substrate in meliponine bees: helpful but not obligatory for recruitment success. *Journal of Comparative Physiology A* 197, 755-764.

Silva, J.A., Damasceno, B.P.G.L., Silva, F.L.H., Madruga, M.S., Santana, D.P., 2008. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. *Química Nova* 31(5), 1073-1077.

Sousa, J.L.U., Monteiro, R.A.B., 2011. Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol. *Cadernos de Pós-Graduação FAZU* 2, 1-8.

Souza, R.C.S., Yuyama, L.K.O., Aguiar, J.P.L., Oliveira, F.P.M., 2004. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. *Acta Amazônica* 34, 333-336.

- Souza, B.A., Marchini, L.C., Dias, C.T.S., Oda-Souza, M., Carvalho, C.A.L., Alves, R.M.O., 2009. Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do estado da Bahia. *Ciência e Tecnologia de alimentos* 29, 798-802.
- Starmer, W.T., 1981. A comparison of *Drosophila* habitats according to the physiological attributes of the associated yeast communities. *Evolution* 35, 38-52.
- Sugita, T., 2011. *Trichosporon* Behrend (1890). in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. *The Yeasts: a Taxonomic Study*, five edition. v3. Elsevier, Amsterdam, pp. 2015-2061
- Suzuki, M., Prasad, G.S., Kurtzman, C., 2011. in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. *The Yeasts: a Taxonomic Study*, five edition. v2. Elsevier, Amsterdam, pp. 361–372
- Teixeira, A.C.P., Marini, M.M., Nicoli, J.R., Antonini, Y., Martins, R.P., Lachance, M.A., Rosa, C.A., 2003. *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 339–343
- Thiago-Calaça, P.S.S., 2011. Aspectos da biologia de *Melipona quinquefasciata* Lepeletier (Mandaçaia do chão), características físico-químicas do mel, recursos alimentares e leveduras associadas. Dissertação de mestrado (Ecologia e Biomas tropicais) Universidade Federal do Ouro Preto.
- Torres, R.M.S., Lopes, J.A.D., Moita-Neto, J.M., Lopes-Citó, A.M.G., 2008. Constituintes voláteis de própolis piauiense. *Química nova* 31(3), 479-485.
- Valente, P., Gouveia, F.C., Lemos, G.A., Pimentel, D., Elsas, J.D.V., Mendonça-Hagler, L.C., Hagler, N.A., 1996. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiology Letters* 137, 253-256.
- Valentin, J.L., 1995. Agrupamento e Ordenação. in: Peres-Neto, P.R., Valentin, J.L., Fernandez, F.A.S. (Eds.). *Oecologia brasiliensis* v2. pp-27-55.
- Vega, F.E., Dowd, P.F., 2005. The Role of Yeasts as Insect Endosymbionts. in: Vega, F.E., Blackwell, M. (Eds). *Insect-fungal associations: ecology and evolution*. Oxford Univ. Press, New York pp.211-243.

Viana, R.H.O., 2015. Ecologia do cerrado arenícola do Jalapão, estado de Tocantins. Tese de doutorado (Botânica) Universidade Federal de Viçosa.

Yamada, E.A., Alvim, I.D., Santucci, M.C.C., Sgarbieri, V.C., 2003. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. *Revista de Nutrição* 16, 423-432

Zampaulo, R.A., Figueiredo, L.A.V., Pedro, E.G., Luz, C.S., 2007. Levantamento espeleológico, problemas socioambientais e potencial espeleoturístico da região de Dianópolis (TO). *Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Espeleologia*, Ouro Preto, MG.

Zhang, Q.G., Buckling, A., Godfray, C.J., 2009. Quantifying the relative importance of niches and neutrality for coexistence in a model microbial system. *Functional Ecology* 23, 1139-1147.

## Apêndices

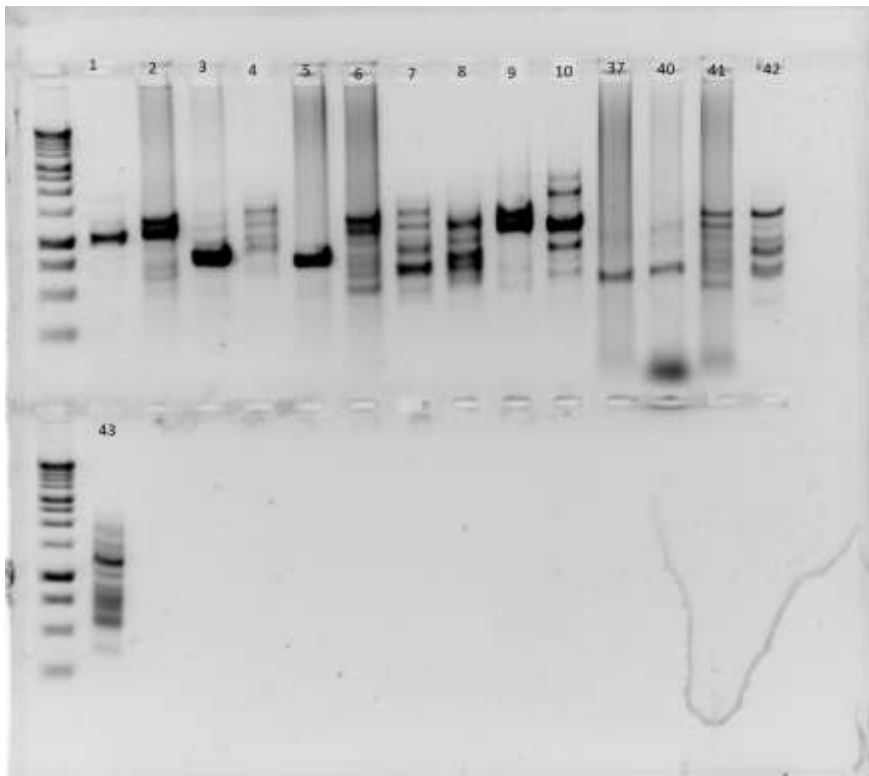


Figura V. Leveduras da caixa 1

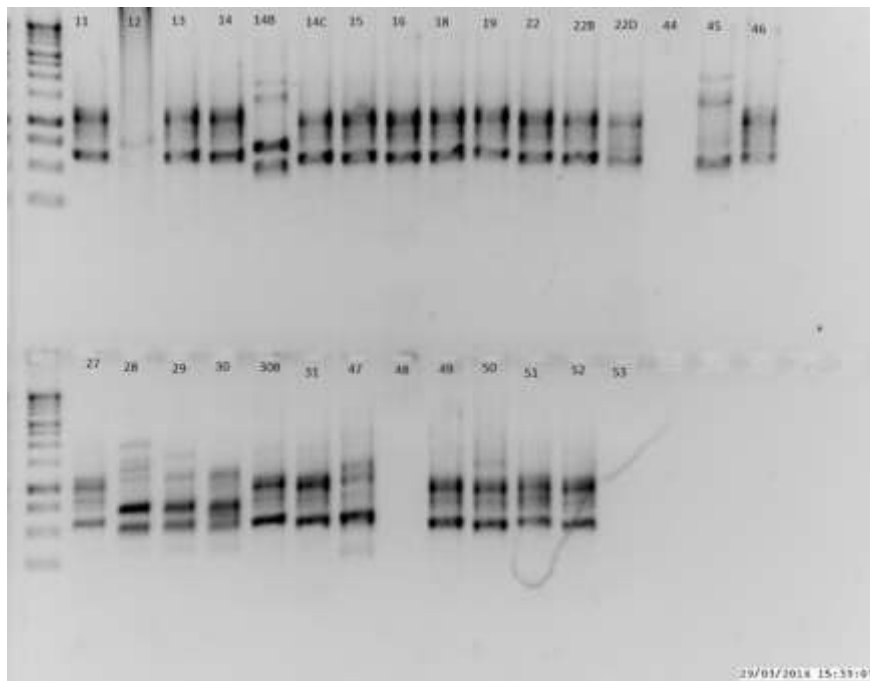


Figura VI. Leveduras da caixa 2 (canaletas da parte superior) e leveduras da caixa 3 (canaletas da parte inferior)

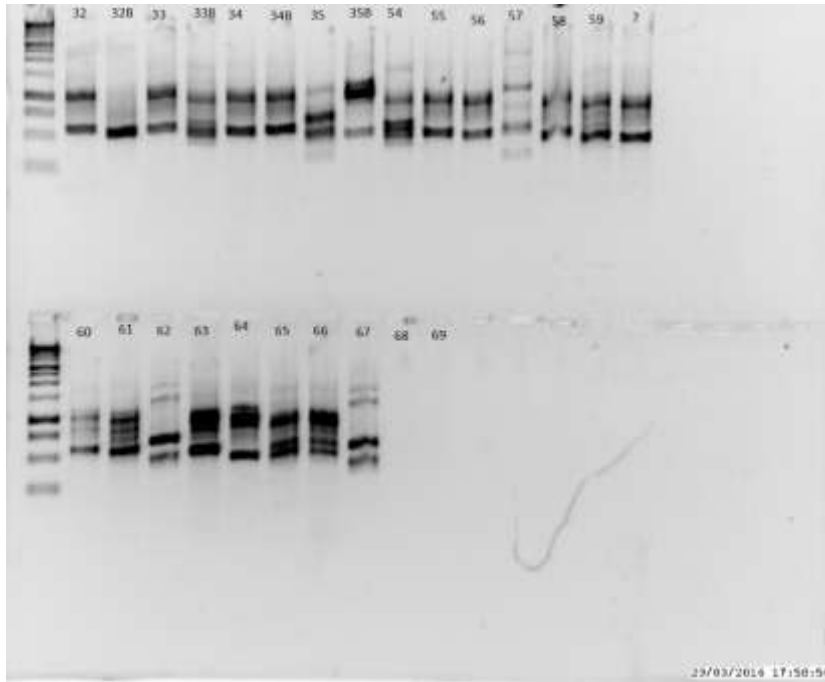


Figura VII. Leveduras da caixa 4 (canaletas da parte superior) e caixa 5 (canaletas da parte inferior)

Scripts das análises no *software* R

### #Rarefação

```
> library(vegan)
```

#### *Frieseomelita varia* (18)

```
> ab1<-c(5, 24, 12, 3, 17, 1, 50, 3, 12, 18, 14, 35, 46, 29, 12, 8, 6, 3)
```

```
> rarefy(t(as.data.frame(ab1)), 157)
```

#### *Scaptotrigona polysticta* (19)

```
> ab2<-c(23, 24, 3, 9, 14, 11, 7, 4, 18, 3, 12, 15, 32, 45, 5, 9, 2, 4, 10)
```

```
> rarefy(t(as.data.frame(ab2)), 157)
```

#### *Scaptotrigona aff. postica* (22)

```
> ab3<-c(93, 13, 5, 1, 2, 35, 4, 2, 10, 11, 2, 10, 7, 3, 2, 1, 1, 10, 13, 12, 16) falta 1
```

```
> rarefy(t(as.data.frame(ab3)), 157)
```

### ***Melipona compressipes manaoensis* (7)**

```
> ab5<-c(19, 10, 8, 9, 10, 19, 2, 6, 32, 45, 15, 6, 3)
```

```
> rarefy(t(as.data.frame(ab5)), 157)
```

### ***Melipona scutellaris* (19)**

```
> ab6<-c(20, 1, 6, 12, 12, 9, 16, 8, 5, 29, 7, 3, 2, 2, 31, 26, 21, 60, 2)
```

```
> rarefy(t(as.data.frame(ab6)), 157)
```

## **#Diagrama de Venn**

```
> library(venndiagram)
```

### **Diagrama 1**

```
> venn.plot<- draw.quad.venn(area1 = 18, area2 = 19, area3 = 22, area4 = 13, n12 = 3, n13 = 7,
n14 = 5, n23 = 6, n24 = 5, n34 = 5, n123 = 2, n124 = 2, n134 = 4, n234 = 3, n1234 = 2, category
= rep("", 4), lwd = rep(2, 4), lty = rep("solid", 4), col = rep("black", 4), fill = NULL, alpha = rep(
0.5, 4), label.col = rep("black", 15), cex = rep(1, 15), fontface = rep("plain", 15), fontfamily = re
p("serif", 15), cat.pos = c(-15, 15, 0, 0), cat.dist = c(0.22, 0.22, 0.11, 0.11), cat.col = rep("black",
4), cat.cex = rep(1, 4), cat.fontface = rep("plain", 4), cat.fontfamily = rep("serif", 4), cat.just = re
p(list(c(0.5, 0.5)), 4), rotation.degree = 0, rotation.centre = c(0.5, 0.5), ind = TRUE, cex.prop =
NULL, print.mode = "raw", sigdigs = 3, direct.area = FALSE, area.vector = 0)
```

### **Diagrama 2**

```
> venn.plot<- draw.pairwise.venn(area1=7, area2=19, cross.area=2, category = rep("", 2), euler.d =
TRUE, scaled = TRUE, inverted = FALSE, ext.text = TRUE, ext.percent = rep(0.05, 3), lwd = re
p(2, 2), lty = rep("solid", 2), col = rep("black", 2), fill = NULL, alpha = rep(0.5, 2), label.col = re
p("black", 3), cex = rep(1, 3), fontface = rep("plain", 3), fontfamily = rep("serif", 3), cat.pos = c(
-50, 50), cat.dist = rep(0.025, 2), cat.cex = rep(1, 2), cat.col = rep("black", 2), cat.fontface = rep(
"plain", 2), cat.fontfamily = rep("serif", 2), cat.just = rep(list(c(0.5, 0.5)), 2), cat.default.pos = "o
uter", cat.prompts = FALSE, ext.pos = rep(0, 2), ext.dist = rep(0, 2), ext.line.lty = "solid", ext.le
ngth = rep(0.95, 2), ext.line.lwd = 1, rotation.degree = 0, rotation.centre = c(0.5, 0.5), ind = TRU
E, sep.dist = 0.05, offset = 0, cex.prop = NULL, print.mode = "raw", sigdigs = 3)
```