

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

CAMILA DA SILVA REIS

FUNGOS ASSOCIADOS AO BESOURO DA  
AMBROSIA, *Euplatypus parallelus*



Rio Claro  
2017

CAMILA DA SILVA REIS

FUNGOS ASSOCIADOS AO BESOURO DA  
AMBROSIA, *Euplatypus parallelus*

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Co-orientador: Quimi Vidaurre Montoya

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Biociências da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro,  
para obtenção do grau de Bacharela em  
Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2017

589.2 Reis, Camila da Silva  
R375f Fungos associados ao besouro da ambrosia, *Euplatypus parallelus* / Camila da Silva Reis. - Rio Claro, 2017  
45 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: André Rodrigues

Coorientador: Quimi Vidaurre Montoya

1. Fungos. 2. Simbiose. 3. Fungicultura. 4. Praga florestal.  
I. Título.

*Dedico esse trabalho a minha mãe,  
Andréa, que sempre me apoiou e me  
incentivou nos estudos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, que sempre foi o meu alicerce, principalmente à minha mãe, que esteve presente em todos os momentos importantes da minha vida e me ajudou muito por todo este trajeto. Ao Giovani, por todos os finais de semana me ajudando, sempre prestativo com todo amor e carinho. As minhas amigas, Iara, Lays, Giselle e Cristiane por todo companheirismo e amizade durante os cinco anos de graduação.

Agradeço ao Prof. Dr. André Rodrigues, por todos os ensinamentos adquiridos nos últimos dois anos. Ao meu co-orientador Quimi Vidaurre Montoya por toda ajuda e paciência, à Maria de Jesus Sutta pela ajuda nas análises e aos colegas do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), por todas as experiências compartilhadas e pela força nos momentos difíceis.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Alberto Hector Flechtmann (UNESP, Câmpus de Ilha Solteira), bem como ao seu estudante, Jean Carlos Pereira da Silva, por providenciar os besouros utilizados neste estudo.

Agradeço também ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia, da UNESP, Câmpus de Rio Claro, pelo suporte técnico concedido para o desenvolvimento desse trabalho. Assim como, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro que permitiu a realização desse trabalho (processo n. 2014/24298-1).

## RESUMO

Semelhante a outros insetos sociais fungicultores, *Euplatypus parallelus* (Coleoptera: Curculionidae, Platypodinae) utiliza fungos para alimentação. O hábito de cultivar fungos, somado à relação simbiótica com uma ampla variedade de micro-organismos, possibilitaram o sucesso evolutivo desse inseto. *Euplatypus parallelus* é considerado uma praga florestal devido às galerias que constrói nas árvores para o cultivo do fungo mutualista. Apesar da importância ecológica e econômica desse besouro, a diversidade e o papel biológico dos micro-organismos associados foram pouco explorados. Este estudo teve como objetivo conhecer os fungos encontrados em *E. parallelus*. Fungos do interior e exterior dos besouros foram isolados utilizando três métodos: i) besouros caminhando no meio de cultivo; ii) trituração dos insetos e iii) inóculo do pronoto e micângia. Os fungos obtidos foram identificados utilizando marcadores morfológicos e moleculares, seguido de análise filogenética. Um total de 124 isolados, pertencentes a 15 gêneros de fungos, foi encontrado no corpo de *E. parallelus*. Os gêneros *Ambrosiozyma*, *Cladosporium*, *Coprinellus*, *Fusarium*, *Geosmithia*, *Ogataea*, *Pichia*, *Pycnoporus*, *Raffaelea*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Schizophyllum* e *Yamadazyma* são reportados pela primeira vez no corpo desses besouros. Adicionalmente, observou-se que os isolados do gênero *Raffaelea*, o mais abundante do estudo (39% dos isolados), agruparam-se em quatro clados filogenéticos, possivelmente novos para a ciência. Este resultado é interessante, pois *Raffaelea* é um simbionte cultivado por outras espécies de besouros da ambrosia; contudo, se desconhece o papel desses fungos para *E. parallelus*. Este estudo expandiu o conhecimento sobre os fungos que habitam o corpo de *E. parallelus*, além de abrir uma janela para o estudo da biologia e associações simbióticas desse besouro.

**Palavras chave:** Simbiose. Fungicultura. Praga florestal.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 OBJETIVOS.....	8
2.1 Geral.....	8
2.2 Específicos.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Coleta dos besouros .....	9
3.2 Isolamento, purificação e preservação dos fungos .....	10
3.3 Identificação dos fungos.....	11
3.3.1 Análise morfológica .....	11
3.3.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento dos isolados .....	11
3.3.3 Análise filogenética.....	13
3.3.4 Análise de diversidade.....	14
4 RESULTADOS .....	15
4.1 Isolamento e identificação dos fungos .....	15
4.2 Fungos por método de isolamento .....	18
4.3 Diversidade de fungos no corpo de <i>Euplatypus parallelus</i> .....	20
5 DISCUSSÃO .....	24
6 CONCLUSÕES .....	26
7 PERSPECTIVAS.....	27
REFERÊNCIAS .....	28
ANEXOS.....	32

## 1 INTRODUÇÃO

Os besouros (Arthropoda: Coleoptera) desempenham várias funções nos ecossistemas. Esses insetos contribuem na polinização de diversas plantas, auxiliam na manutenção do solo (promovendo a adubação e a aeração) e controlam populações de outros insetos (BUCHSBAUM et al., 1987; GALLO et al., 2002). Entretanto, existem grupos de besouros considerados pragas de plantas, que ocasionam graves prejuízos econômicos, especialmente em áreas de reflorestamento destinadas a suprir demandas do setor florestal (AVIDOV et al., 1969; ELZINGA, 1997). A diversidade desses insetos pragas é maior nas regiões tropicais, incluindo o Brasil, onde foram reportadas cerca de 112 espécies pertencentes a 24 famílias (ZARBIN et al., 2009).

Os besouros da ambrosia (Coleoptera: Curculionidae: subfamílias Platypodinae e Scolytinae), também conhecidos como brocas, pertencem ao grupo de coleópteros considerados pragas florestais (HULCR et al., 2017). Esses besouros perfuram o lenho de plantas e podem levá-las à morte (WOOD, 1982). Segundo Farrell et al. (2001), os besouros da ambrosia apresentam uma elevada diversidade (cerca de 3200 espécies) e possuem baixa especificidade por plantas hospedeiras, colonizando árvores vivas, ou em processo de senescência. O ataque às plantas hospedeiras é influenciado pelas condições climáticas favoráveis, estresse das plantas ou condução inadequada do manejo florestal. Os danos ocasionados por esses insetos são especialmente graves quando atacam grandes extensões de áreas plantadas (GIL; PAJARES, 1986).

Os besouros da ambrosia vivem em simbiose com diferentes micro-organismos (fungos filamentosos, leveduras, bactérias e protozoários) que habitam o sistema digestivo dos mesmos. Contudo, a característica principal desses insetos é o fato de cultivar fungos para alimentação (BATRA, 1963). Para tanto, besouros machos ou fêmeas, dependendo da espécie, constroem galerias nas árvores, aonde as fêmeas ovipositam e inoculam os fungos simbiontes que servirão de alimento, principalmente para as larvas (FLECHTMANN et al., 1995; QUEIROZ; GARCIA, 2007). Mantendo uma dieta à base de fungo, o inseto supre a carência de sais, esteróides e vitaminas do grupo B (BAKER; NORRIS, 1968; UEDA; KOBAYASHI, 2005). Os fungos mutualistas inoculados por esses insetos são carregados em reservatórios especiais, denominados de micângias (BATRA, 1963). Essas estruturas são localizadas externamente em diversas regiões do corpo ou internamente, dependendo da espécie do besouro (HULCR et al., 2017). Nesse sentido, a associação simbiótica, besouros da

ambrosia-fungo mutualista, ajudaria a explicar o sucesso evolutivo e o poder de destruição desses insetos (BRIDGES, 1987).

Alguns estudos demonstraram que besouros da ambrosia abrigam vários gêneros de fungos no corpo, a saber: *Acremonium*, *Ambrosiella*, *Ambrosiozyma*, *Botryodiplodia*, *Candida*, *Ceratocystis*, *Fusarium*, *Geosmithia*, *Graphium*, *Grosmannia*, *Leptographium*, *Macrosporium*, *Meredithiella*, *Mucor*, *Ophiostoma*, *Pichia*, *Phialosporopsis*, *Raffaelea* e *Sporothrix* (MUELLER et al., 2004; WEBSTER et al., 2007; INÁCIO et al., 2008; JORDAL et al., 2012; TARNO et al., 2016; HULCR et al., 2017). Contudo, o real papel desses fungos ainda não está totalmente esclarecido (INÁCIO et al., 2008).

*Euplatypus parallelus* (Coleoptera: Curculionidae, subfamília Platypodinae) é uma espécie de besouro da ambrosia nativa da América do Sul, que ocasiona prejuízos em áreas florestais em várias regiões do Brasil (SILVA et al., 2013). Esse inseto foi relatado em mais de 60 espécies de árvores, compreendendo 20 famílias distintas, dentre as quais encontram-se as espécies *Hevea brasiliensis* (seringueira, utilizada para a extração de látex), *Persea americana* (abacateiro) e plantas exóticas e nativas de importância econômica, como os pinheiros e mognos (ZANUNCIO et al., 2002; SILVA et al., 2013).

Apesar do impacto econômico ocasionado por *E. parallelus*, pouco se conhece sobre a microbiota associada ao corpo desse coleóptero. Um estudo reportou a presença de oito gêneros de fungos em diferentes partes do corpo desse besouro, incluindo intestino, exoesqueleto e micângia (TARNO et al., 2016). Alguns desses gêneros já haviam sido reportados no grupo dos besouros da ambrosia; contudo, os gêneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Saccharomyces* e *Trichoderma*, foram reportados pela primeira vez por esses autores.

Considerando a falta de estudos sobre a diversidade de fungos que habitam o corpo de *E. parallelus*, o presente estudo teve como intuito avaliar os fungos encontrados na parte externa e interna do corpo desta espécie.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar os fungos encontrados no corpo do besouro da ambrosia, *Euplatypus parallelus*

### 2.2 Específicos

- Acessar os fungos da parte interna e externa do corpo de *E. parallelus*
- Criar uma coleção de fungos para estudos futuros de sistemática e controle biológico de *E. parallelus*

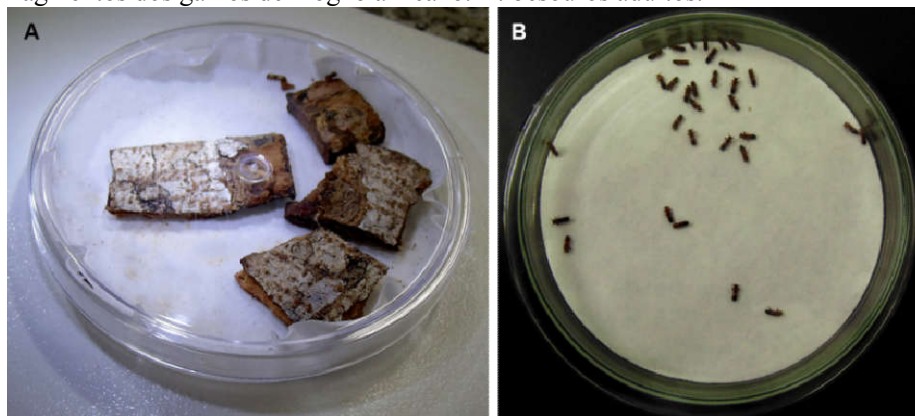
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em parceria com o grupo de pesquisa do Laboratório de Entomologia Florestal e Veterinária (UNESP, Câmpus de Ilha Solteira, SP), coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Hector Flechtmann. O estudante desse grupo de pesquisa, Jean Carlos Pereira da Silva, realizou a coleta e forneceu os besouros para o isolamento dos fungos.

#### 3.1 Coleta dos besouros

Besouros adultos de *E. paralellus* (n=22) foram coletados de uma árvore senescente de mogno africano (*Khaya ivorensis*). Para este propósito, fragmentos do tronco da árvore (contendo os besouros) foram coletados no dia 26 de julho de 2016, nas dependências da Fazenda Guajará, Valença-BA (Coordenadas: 13°27'12.78"S e 39°12'00.48"W). As árvores de *K. ivorensis* foram plantadas em setembro de 2012, nesse local. O material vegetal coletado foi transportado para o Laboratório de Entomologia Florestal e Veterinária (UNESP, Câmpus de Ilha Solteira) aonde foi realizada a dissecação do tronco, retirando-se porções da casca (com auxílio de uma cunha, marreta, formão e martelo) até atingir as galerias dos insetos. Os besouros adultos que se encontravam nas galerias foram coletados com auxílio de uma pinça. Em seguida, os insetos foram dispostos em placas de Petri (90x15 mm de diâmetro) com papel de filtro umedecido com água (Figura 1) e transportados até o Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF, UNESP, Câmpus de Rio Claro, SP), local aonde foram realizados os isolamentos (quatro dias após a coleta).

**Figura 1.** Armazenamento de *Euplatypus paralellus* para o transporte. A: fragmentos dos galhos de mogno africano. B: besouros adultos.



### 3.2 Isolamento, purificação e preservação dos fungos

Fungos da parte externa e interna de indivíduos adultos de *E. parallelus* foram obtidos utilizando três métodos de isolamento: i) besouros caminhando no meio de cultivo; ii) trituração dos insetos e iii) inóculo do pronoto e micângia (estrutura aonde besouros carregam os esporos dos fungos, localizada no pronoto das fêmeas). Os meios de cultivo utilizados para os isolamentos dos fungos foram: Ágar Batata-Dextrose (BDA, Acumedia), Ágar malte 2% (MA2%, Acumedia) e Ágar nutriente sintético (SNA, Acumedia). Todos os meios utilizados para o isolamento foram suplementados com  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cloranfenicol (Sigma), para evitar o crescimento de bactérias. Esses meios foram escolhidos por apresentarem diferentes fontes de carbono e nutrientes, proporcionando isolamento de uma maior variedade de fungos (MUELLER et al., 2004).

O primeiro método permitiu o isolamento dos fungos da parte externa do corpo dos besouros. Para tal, cinco indivíduos machos e cinco fêmeas foram dispostos para caminhar na superfície do meio BDA durante 15 minutos. Foi utilizada uma placa de Petri (90x15 mm) para cada indivíduo, totalizando 10 placas. O segundo e terceiro método foram utilizados para o isolamento dos fungos da parte interna dos besouros. Nesse sentido, os indivíduos utilizados no primeiro método (cinco machos e cinco fêmeas), após caminharem no meio, foram submetidos à desinfecção superficial (segundo método) com imersão em etanol 70% durante 30 segundos, seguido de imersão em 1 mL de solução salina 0,85% durante 1 minuto e de três lavagens sucessivas com água destilada esterilizada durante 30 segundos. Posteriormente, cada indivíduo foi triturado em 1 mL de solução salina 0,85% e agitados no *vortex* durante um minuto. Após homogeneização, 100 $\mu\text{L}$  da suspensão foram semeados na superfície dos meios BDA, MA2% e SNA (uma placa de cada meio de cultivo para cada indivíduo), totalizando 30 placas. Para o terceiro método, 12 besouros fêmeas foram submetidos ao mesmo processo de desinfecção superficial utilizado no segundo método. Após a desinfecção, foi realizada a raspagem das micângias de seis fêmeas com auxílio de uma agulha esterilizada. Os pronotos dos outros seis insetos foram dissecados. Tanto o material raspado, quanto os pronotos foram semeados nos três meios de cultivos, totalizando 12 placas de Petri (seis de micângias e seis de pronotos). Para o segundo e terceiro método, a última água utilizada na lavagem foi inoculada nos três meios de cultivo para verificar a eficiência do processo de desinfecção. Todas as placas de isolamento foram incubadas a 25 °C, durante sete a quatorze dias, no escuro. As colônias que foram crescendo nos meios foram transferidas para novas placas de MA2% e incubadas novamente a 25 °C, durante sete dias, no escuro.

Os isolados obtidos foram purificados pelo método de cultura monospórica. Resumidamente, foi realizada uma diluição seriada de conídios (para cada isolado) em água destilada esterilizada até atingir uma diluição de  $10^{-5}$ . Para os fungos que não esporularam, a diluição foi realizada com o micélio aéreo do fungo. Seguidamente, um volume de 50  $\mu$ L da suspensão foi espalhado na superfície da placa com meio BDA. Após três a cinco dias de incubação, os esporos (ou fragmentos de hifas) germinados foram isolados em uma nova placa com BDA e incubados a 25 °C, no escuro.

Posteriormente, os isolados purificados foram separados em morfotipos. Tal separação foi baseada nas características morfológicas das colônias. Os isolados representativos de cada morfotipo foram fotodocumentados em relação às características macroscópicas das colônias e transferidos para tubos contendo meio BDA inclinado, para criar o estoque de trabalho (mantido a 10 °C). Posteriormente, esses morfotipos foram preservados em glicerol 20 % a -80 °C (em suspensão de esporos ou hifas) e depositados na coleção de pesquisa do LESF.

### *3.3 Identificação dos fungos*

#### *3.3.1 Análise morfológica*

A avaliação das características morfológicas dos isolados representativos de cada morfotipo foi realizada após cultivo em BDA a 25 °C, após sete dias de incubação, no escuro. As características macroscópicas avaliadas foram: coloração da superfície e da base da colônia, a textura do micélio aéreo, presença de exsudatos e presença de pigmentos solúveis no meio. Para examinar as características microscópicas dos isolados (i.e. conidióforos, células conidiogênicas, clamidósporos, conídios, etc) foram montados microcultivos, bem como lâminas a fresco utilizando KOH 3M e lactofenol. Tais estruturas microscópicas foram observadas e fotodocumentadas no microscópio óptico (Leica DM 500).

#### *3.3.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento dos isolados*

Baseado nos resultados da análise morfológica, 46 isolados foram escolhidos para a análise molecular, compreendendo de um a nove representantes de cada grupo de fungos. Nesse sentido, os 46 isolados foram cultivados em meio BDA durante sete dias a 25°C, no escuro, para a obtenção de biomassa. A extração de DNA foi realizada mediante lise físico-química do micélio, seguindo o método de Möller et al. (1992). Assim, o micélio de cada

isolado foi triturado com auxílio de microesferas de vidro (Sigma, diâmetro de 500-600µm), em solução de lise TES (Tris-EDTA-SDS), proteinase K (20 mg/mL<sup>-1</sup>) e incubado a 65 °C durante 30 minutos. Na presença de CTAB e NaCl 5M foi incubado novamente a 65 °C durante 60 minutos. A fase orgânica foi separada utilizando solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). O material foi centrifugado (12.000g durante 10 minutos) e o DNA genômico foi coletado do sobrenadante. Em seguida, o DNA foi precipitado com acetato de sódio 3M e isopropanol 99%, centrifugado (12.000g durante 15 minutos) e purificado com lavagens sucessivas em etanol 70%. Finalmente, o DNA lavado foi suspenso em 30 µL de solução Tris-EDTA e armazenado a -20°C.

Em seguida, foi amplificada a região ITS (*internal transcribed spacer*) (*primers* ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' e ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), o gene que codifica para Beta tubulina, (BTub2a: 5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3' e BTub2b: 5'-CCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') e as regiões hipervariáveis D1 e D2 do gene que codifica para a subunidade maior do ribossomo (NL1: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' e NL4:5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3').

As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 25 µL (4 µL de dNTPs 1,25 mM, 5µL de Buffer 5X, 1 µL de BSA 1 mg mL<sup>-1</sup>, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1 µL de cada *primer* [10 µM], 0,2 µl de Taq polimerase [5 U µL<sup>-1</sup>], 2 µL de DNA genômico diluído [1:10] e 8,8 µL de água ultrapura estéril). Os *amplicons* foram corados com *GelRed*<sup>TM</sup> (Biotium) e observados em gel de agarose 1% sob U.V. em fotodocumentador (*DNR Bio-Imaging Systems*, MiniBIS Pro). Posteriormente, os produtos de amplificação foram purificados com o *Kit Wizard*<sup>®</sup> *SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. Os *amplicons* purificados foram quantificados em *NanoDrop*<sup>®</sup> (ThermoScientific) e sequenciados utilizando *BigDye Terminator*<sup>®</sup> v. 3.1 *Kit* (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram os mesmos utilizados na amplificação. Finalmente, as sequências *forward* e *reverse* geradas pelo método de Sanger, no sequenciador ABI 3500 (Life Technologies), foram reunidas em sequências *consensus* com ajuda do *software* Bio Edit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999).

### 3.3.3 Análise filogenética

As sequências *consensus* dos fungos foram comparadas com as sequências homólogas depositadas na base de dados do NCBI- GenBank. As sequências da base de dados que apresentaram maior identidade com as do presente estudo foram recuperadas para as análises filogenéticas (de cinco a dez sequências para cada um dos gêneros). Adicionalmente, sequências de outros estudos (referentes a cada grupo de fungos) também foram incluídas nos conjuntos de dados (JAMES et al., 2004; KOLARIK et al., 2005; MARIMON et al., 2007; ZALAR et al., 2007; HARRINGTON et al., 2010; KURTZMAN et al., 2010; BADALYAN et al., 2011; LESAGE-MEESSEN et al., 2011; PERRONE et al., 2011; WATANABE et al., 2011; CIAFARDINI et al., 2013; KURTZMAN et al., 2013; ABE et al., 2014; MUSVUUGWA et al., 2015; RÉDOU et al., 2015; SIMMONS et al., 2016).

Os conjuntos de dados compreendendo as sequências geradas nesse estudo e as sequências obtidas das bases de dados foram alinhadas utilizando o *software* MAFFT v 7 (KATO et al., 2013) e editadas com o programa GBLOCKS (CASTRESANA, 2000). Os alinhamentos foram elaborados separadamente para cada gênero de fungo. As características dos conjuntos de dados de cada alinhamento, assim como o marcador molecular utilizado para a análise filogenética de cada gênero estão listadas na tabela 1.

As árvores filogenéticas foram inferidas no programa MEGA v.7.1 (KUMAR et al., 2016), utilizando o método de *neighbour-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980). A robustez das árvores foi calculada através do método de *bootstrap*, com 1000 pseudoréplicas.

**Tabela 1.** Características de cada conjunto de dados (separados por gêneros de fungos) utilizados nas análises filogenéticas.

Gênero	Nº de sequências	Grupo externo (código de acesso)	Marcador molecular	Nº de pb do alinhamento
<i>Aspergillus</i>	24	<i>Aspergillus</i> (EF661081)		615
<i>Cladosporium</i>	34	<i>Cercospora</i> (JQ408381)	Beta tubulina	383
<i>Geosmithia</i>	25	<i>Acremonium</i> (KF225146)	(WANG, et al., 2004)	1025
<i>Penicillium</i>	26	<i>Aspergillus</i> (EU014101)		425
<i>Ogataea</i>	31	<i>Schizosaccharomyces</i> (KY109602)		569
<i>Pichia</i>	36	<i>Schizosaccharomyces</i> (EF550348)	D1D2	669
<i>Rhodotorula</i>	22	<i>Yarrowia</i> (JX561143)	(KURTZMAN, et al., 1998)	640
<i>Yamadazyma</i>	28	<i>Babjeviella</i> (U45848)		530
<i>Ambrosiozyma</i>	42	<i>Pichia</i> (AY251639)		577
<i>Coprinellus</i>	34	<i>Coprinus</i> (AY176346)		739
<i>Fusarium</i>	47	<i>Microdochium</i> (KP859008)		565
<i>Pycnoporus</i>	22	<i>Trametes</i> (MF155573)	ITS	580
<i>Raffaëlea</i>	63	<i>Podospora</i> (AY515359)	(SCHOCH, et al., 2012)	466
<i>Rhizopus</i>	29	<i>Acremonium</i> (FN691453)		822
<i>Schizophyllum</i>	26	<i>Schizosaccharomyces</i> (KJ562356)		835

pb: pares de bases

### 3.3.4 Análise de diversidade

O teste de Fisher foi utilizado para corroborar se a diversidade, em termos de proporção (abundância) de fungos isolados, é dependente do sexo do besouro ou do meio de cultivo. Por outro lado, para determinar se o esforço amostral deste trabalho foi suficiente, foram construídas curvas de rarefação. Esse método possibilita comparações entre amostras com diferentes tamanhos amostrais.

A diversidade dos fungos (riqueza e abundância) foi avaliada separadamente para os fungos encontrados na parte externa e na parte interna do corpo de *E. parallelus*. Para tal, foi realizada uma análise alfa levando em consideração o fato de que foi realizada apenas uma coleta, no mesmo âmbito temporal e local. Nesse sentido, foram utilizados os índices de riqueza (S), diversidade de gêneros de Shannon-Wiener (H), dominância de gêneros de Simpson (inverso: 1-D) e a riqueza esperada de gêneros (Chao-1) (MAGURRAN, 2004). A similaridade entre as amostras foram avaliadas pelos índices de Jaccard e Bray-Curtis (CHAO et al., 2005). Todas as análises foram processadas no *software* R v.3.4 utilizando os pacotes *Vegan*, *Biodiversity R* (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Isolamento e identificação dos fungos

Um total de 124 isolados fúngicos foi obtido do corpo de *E. parallelus*. Todos os isolados foram submetidos à purificação pelo método de cultura monospórica, preservados em glicerol 20% a -80 °C e depositados no acervo do LESF.

Inicialmente, a análise morfológica permitiu agrupar os isolados em seis gêneros: *Aspergillus* (n=1), *Cladosporium* (n=3), *Fusarium* (n=1), *Geosmithia* (n=2), *Penicillium* (n=1), *Rhizopus* (n=7), cinco morfotipos de fungos filamentosos [Morfotipo 1 (n=29), Morfotipo 2 (n=1), Morfotipo 3 (n=1), Morfotipo 4 (n=49), Morfotipo 5(n=1)] e quatro morfotipos de leveduras [Morfotipo 6 (n=1), Morfotipo 7 (n=5), Morfotipo 8 (n=2), Morfotipo 9 (n=20)](Tabela 2).

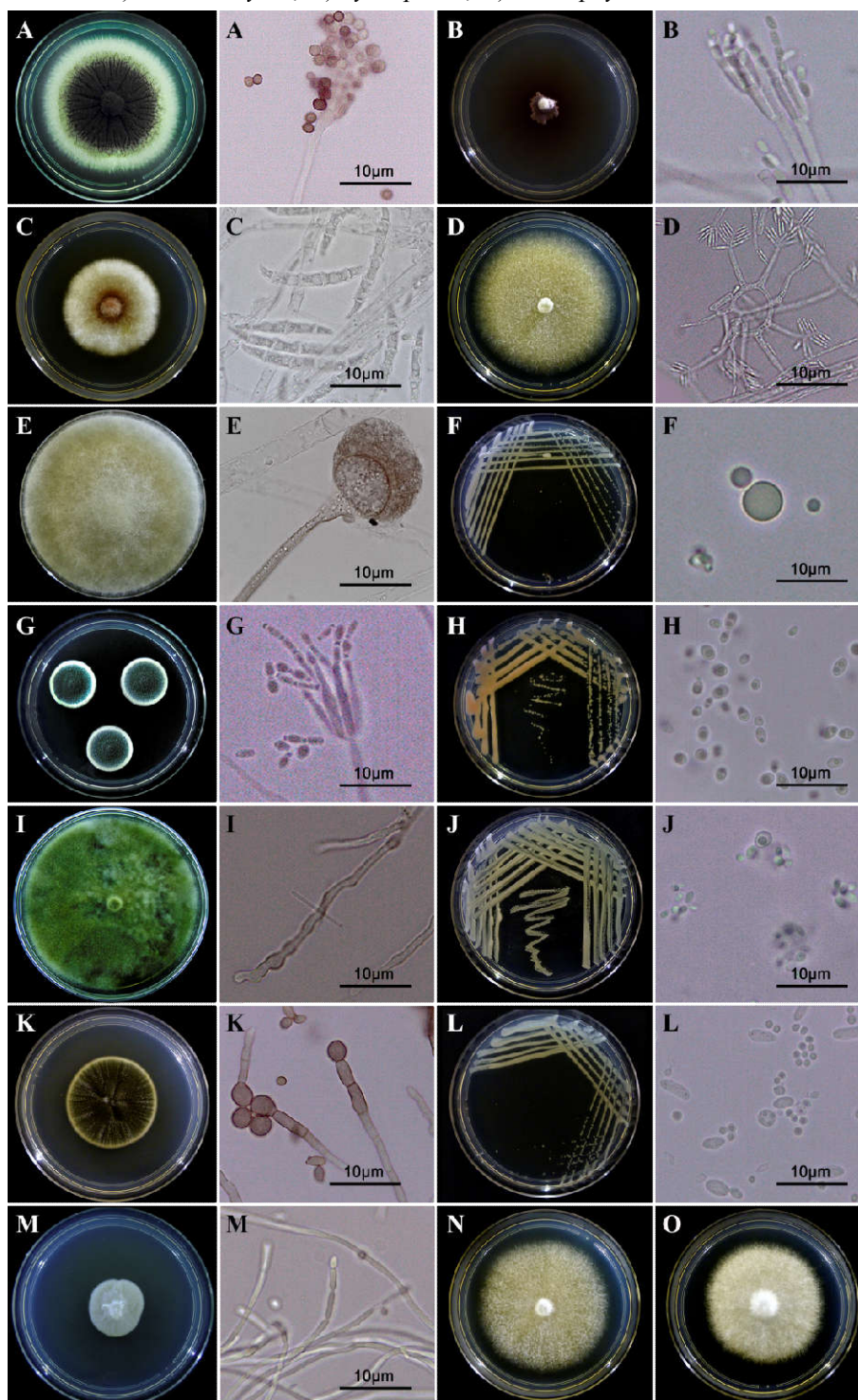
**Tabela 2.** Identificação dos isolados representativos de cada gênero de fungo, baseada nas análises morfológicas e no resultado inicial da comparação das sequências com as sequências depositadas nas bases de dados do NCBI. O número de acesso de cada gênero com o qual a nossa amostra apresentou a maior porcentagem de identidade encontra-se na direita.

Código dos isolados	Nº total de isolados	Identificação morfológica	Identificação molecular	Resultado BLAST	Número de acesso
C03	1	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	100%	AY820000
C60	3	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i>	88%	KJ596629
C06	1	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>	99%	JX435216
C85	2	<i>Geosmithia</i>	<i>Geosmithia</i>	100%	KF853901
C46	1	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	99%	JF910277
C08	7	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus</i>	100%	KJ551412
C78	29	Morfotipo 1	<i>Ambrosiozyma</i>	99%	KY101644
C58	1	Morfotipo 2	<i>Coprinellus</i>	99%	KU954342
C73	1	Morfotipo 3	<i>Pycnoporus</i>	99%	AF363759
C48	49	Morfotipo 4	<i>Raffaelea</i>	100%	KX267140
C75	1	Morfotipo 5	<i>Schizophyllum</i>	99%	KY244078
C30	1	Morfotipo 6	<i>Ogataea</i>	100%	KY108692
C120	5	Morfotipo 7	<i>Pichia</i>	99%	KY108864
C57	2	Morfotipo 8	<i>Rhodotorula</i>	100%	KX771207
C119	20	Morfotipo 9	<i>Yamadazyma</i>	100%	KY110159

Após a comparação das sequências *consensus* de 46 isolados (representativos dos 124), com aquelas depositadas na base de dados do NCBI foi possível identificar 15 gêneros: *Ambrosiozyma* (n=4), *Aspergillus* (n=1), *Cladosporium* (n=3), *Coprinellus* (n=1), *Fusarium* (n=1), *Geosmithia* (n=2), *Penicillium* (n=1), *Pycnoporus* (n=1), *Raffaelea* (n=11), *Rhizopus* (n=7), *Schizophyllum* (n=1), *Ogataea* (n=1), *Pichia* (n=5), *Rhodotorula* (n=2), *Yamadazyma*

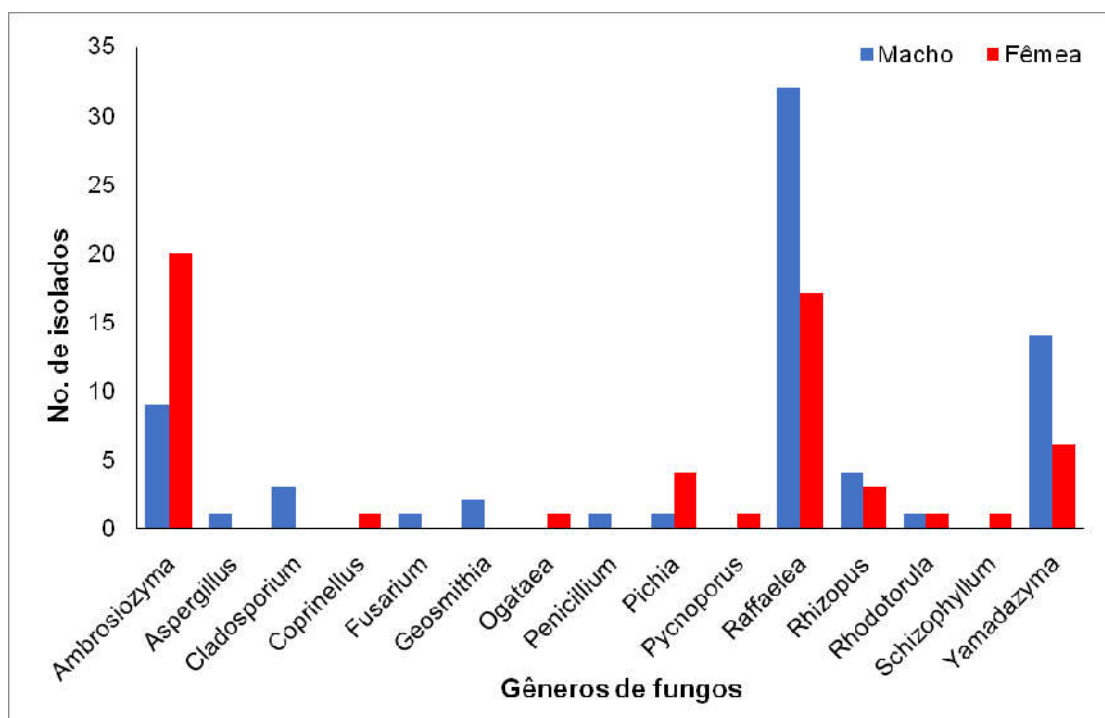
(n=5, Tabela 2 e Figura 2). A análise filogenética realizada para cada gênero de fungo, separadamente, corroborou esse resultado (Anexos 1- 14).

**Figura 2.** Gêneros de fungos isolados de *Euplatypus parallelus*. Os fungos foram cultivados a 25 °C em meio BDA, durante sete dias, no escuro. A) *Aspergillus*, B) *Geosmithia*, C) *Fusarium*, D) *Raffaelea*, E) *Rhizopus*, F) *Yamadazyma*, G) *Penicillium*, H) *Rhodotorula*, I) *Coprinellus*, J) *Ogataea*, K) *Cladosporium*, L) *Pichia*, M) *Ambrosiozyma*, N) *Pycnoporus*, O) *Schizophyllum*



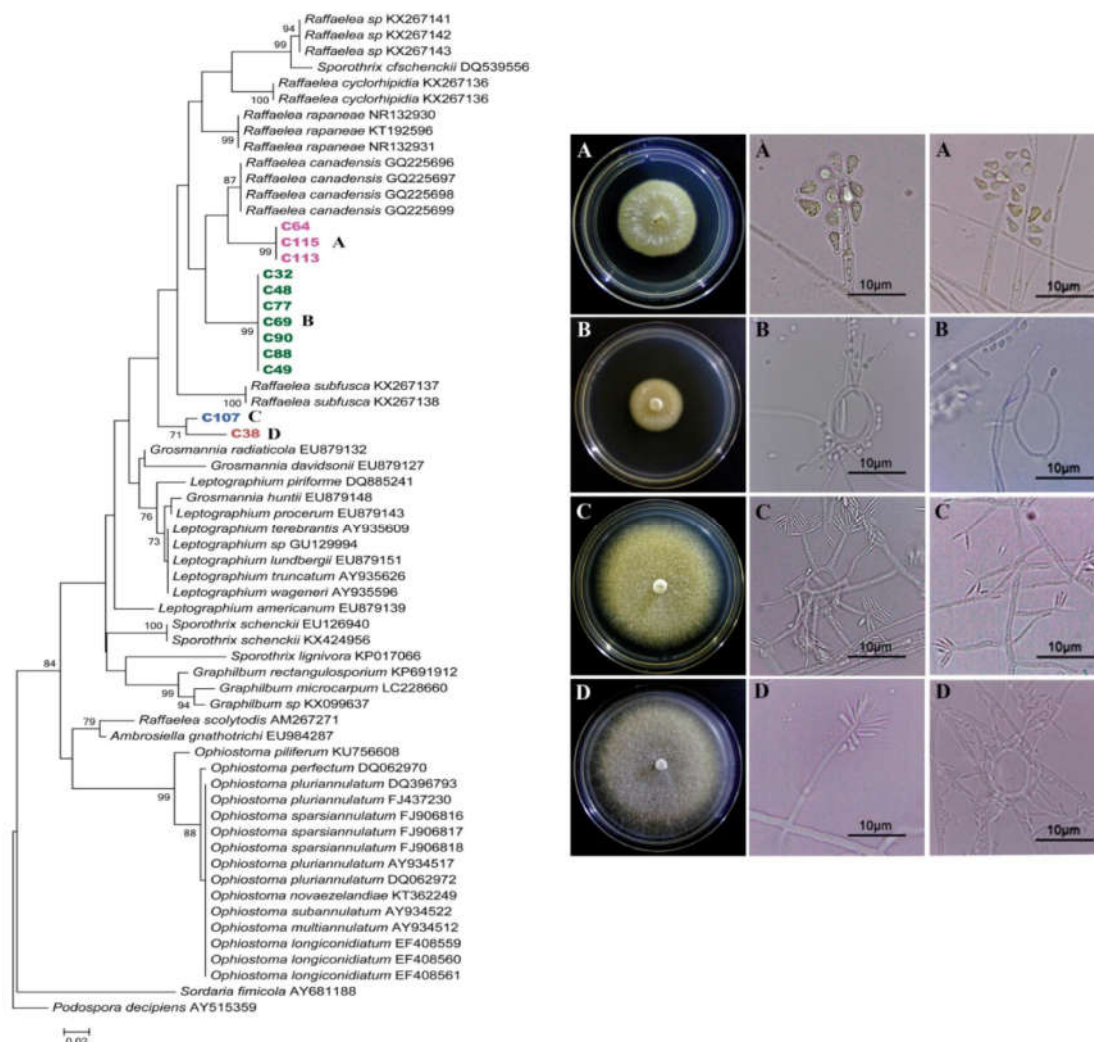
Considerando os 124 isolados, o gênero *Raffaelea* foi o mais abundante (39% dos isolados), sendo encontrado tanto em machos, quanto em fêmeas (Figura 3). O segundo gênero mais abundante foi *Ambrosiozyma* (23%, Figura 3).

**Figura 3.** Gêneros de fungos isolados em machos e fêmeas de *Euplatypus parallelus*.



Adicionalmente, a análise filogenética baseada na região ITS dos isolados C38, C48, C49, C64, C69, C77, C88, C90, C107, C113 e C115 mostrou que esses agruparam-se em quatro possíveis clados filogenéticos novos dentro do gênero *Raffaelea* (Figura 4). O clado formado pelos isolados C64, C115 e C113 ficou acomodado filogeneticamente próximo de *R. canadensis*, já os outros três clados [(C32, C48, C77, C69, C90, C88, C49), (C107) e (C38)] posicionaram filogeneticamente próximos a *R. subfusca* (Figura 4).

**Figura 4.** Posição filogenética das quatro possíveis espécies filogenéticas novas de *Raffaella*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 63 sequências (ITS). O alinhamento final compreendeu 466 pb. Os números nos ramos indicam valores de *bootstrap* (valores abaixo de 70% foram excluídos). A espécie *Podospora decipiens* (AY515359) foi utilizada como *outgroup*. As fotos à direita mostram a morfologia de cada clado (Clado A: rosa, Clado B: verde, Clado C: azul, Clado D: vermelho). Os isolados, foram cultivados a 25 °C, durante 7 dias.



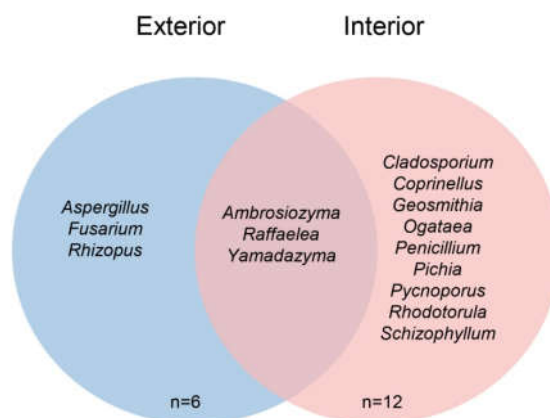
#### 4.2 Fungos por método de isolamento

Um total de 21 isolados foi recuperado da parte externa dos besouros (método I), pertencentes a seis gêneros de fungos: *Ambrosiozyma* (n=3), *Aspergillus* (n=1), *Fusarium* (n=1), *Raffaella* (n= 4), *Rhizopus* (n=7) e *Yamadazyma* (n=5, Figura 5). A maioria dos fungos foi isolada dos besouros machos (n=12), comparados com as fêmeas (n=9). Considerando o número de gêneros de fungos, os besouros machos também apresentaram uma maior riqueza

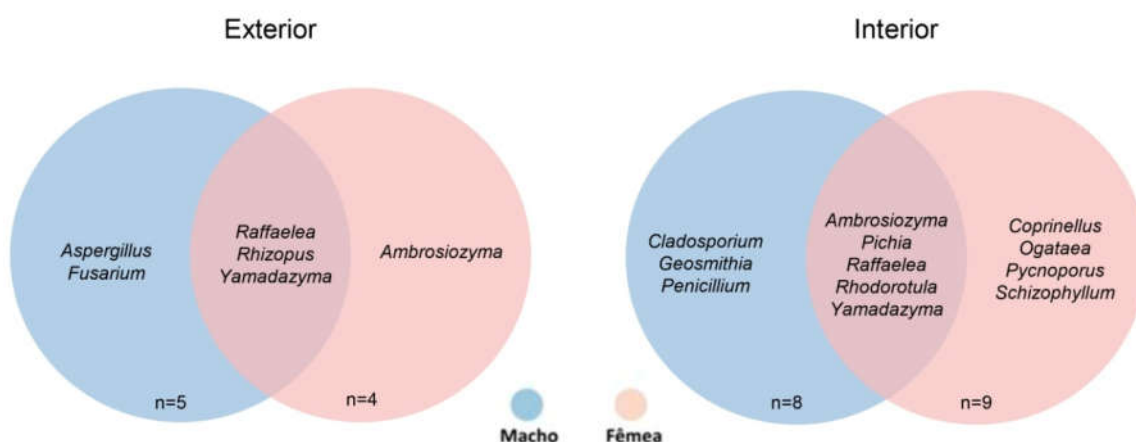
(n=5), quando comparado com as fêmeas (n=4). Ambos os sexos compartilharam três gêneros de fungos: *Ambrosiozymba*, *Raffaelea* e *Yamadazymba* (Figura 6).

Na parte interna dos besouros foi recuperado 103 isolados pertencentes a 12 gêneros de fungos: *Ambrosiozymba* (n=26), *Cladosporium* (n=3), *Coprinellus* (n=1), *Geosmithia* (n=2), *Ogataea* (n=1), *Penicillium* (n=1), *Pichia* (n=5), *Pycnoporus* (n=1), *Raffaelea* (n=45), *Rhodotorula* (n=2), *Schizophyllum* (n=1), *Yamadazymba* (n=15) (Figura 5). Dentre esses isolados, 92 foram obtidos no método II (trituração dos insetos). Neste método, os machos também apresentaram o maior número de isolados (n= 57), do que as fêmeas (n= 35, Tabela 3). No entanto, o número de gêneros de fungos encontrados nas fêmeas (n=8) foi maior do que nos machos (n=6). Os gêneros de fungos compartilhados por ambos os besouros (macho e fêmea) foram cinco: *Ambrosiozymba*, *Pichia*, *Raffaelea*, *Rhodotorula* e *Yamadazymba* (Figura 6). Já o terceiro método (inóculo do pronoto e micângia) recuperou 11 isolados pertencentes a três gêneros distintos: *Ambrosiozymba* (n=7), *Ogataea* (n=1), *Raffaelea* (n=3). Neste método os fungos foram obtidos apenas dos pronotos. Não houve crescimento de fungos nos raspados provenientes das micângias.

**Figura 5.** Compartilhamento de gêneros de fungos no exterior e interior de *Euplatypus parallelus*. n: número de gêneros.



**Figura 6.** Compartilhamento de gêneros de fungos encontrados no exterior e interior de *Euplatypus parallelus* em relação ao sexo do besouro. n: número de gêneros.



#### 4.3 Diversidade de fungos no corpo de *Euplatypus parallelus*

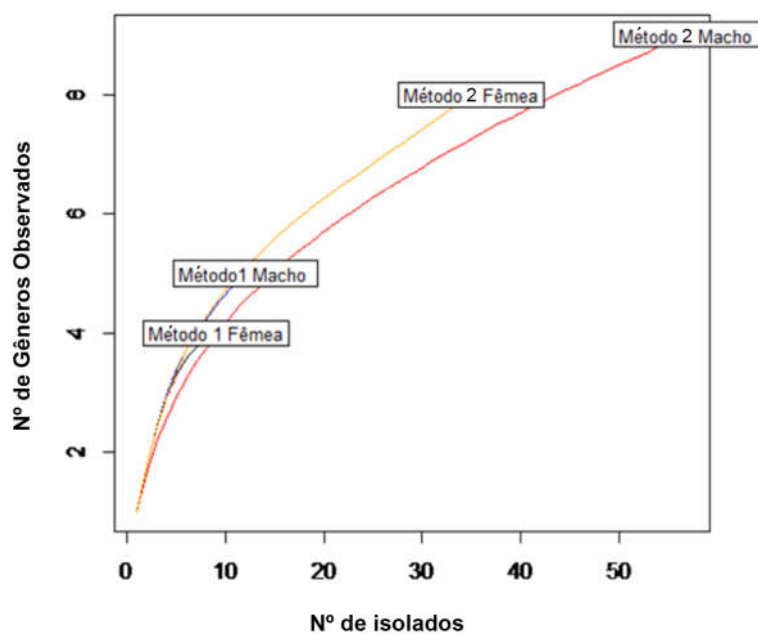
O teste de Fisher mostrou que no método II a riqueza dos gêneros não é dependente do meio de cultivo ( $p=0,3085$ ). A riqueza dos gêneros também não é dependente do sexo do besouro, tanto no método I ( $p=0,2791$ ), quanto no método II ( $p=0,06962$ ). Entretanto, observou-se que os machos apresentaram maior riqueza do que as fêmeas (Figura 3). A curva de rarefação evidenciou que é preciso de uma amostragem maior para conhecer o número total de gêneros associados aos besouros, pois nenhuma atingiu uma assíntota (Figura 7).

A análise alfa de diversidade da parte externa dos besouros evidenciou que os besouros machos apresentam maior riqueza de gêneros de fungos ( $n=5$ ), assim como a maior abundância (12 isolados). A população de machos e fêmeas não apresentou dominância de gêneros ( $D=0,2$ ). Entretanto, o índice inverso de Simpson indicou uma alta homogeneidade (0,7) e, portanto, uma maior diversidade como corroborado pelo índice de Shannon (Tabela 3). Os índices de similaridade Jaccard e Bray-Curtis mostram que a proporção de gêneros compartilhados entre as amostras de machos e fêmeas foi de 50% e 57% respectivamente, isto indica compartilhamento de gêneros entre machos e fêmeas (Tabela 4).

A análise de diversidade alfa da parte interna mostrou que a maior riqueza de gêneros ( $n=12$ ) foi recuperada no meio de cultivo MA2% (fêmeas  $n=7$  e machos  $n=5$ ), enquanto o meio BDA apresentou 9 gêneros (fêmeas  $n=4$  e machos  $n=5$ ) e SNA apresentou 8 gêneros (fêmeas  $n=4$  e machos  $n=4$ ). No quesito abundância, o meio MA2% foi o que apresentou a

maior quantidade de isolados ( $n=37$ , fêmeas  $n=18$  e machos  $n=19$ ), já a menor quantidade foi encontrada em SNA ( $n=22$ , fêmeas  $n=8$  e machos  $n=14$ ). O estimador de Chao-1 indicou que o número de gêneros esperados condiz com os obtidos, apresentando baixa variação entre os valores. Com exceção apenas das fêmeas para o meio MA2% (13 gêneros esperados e 7 obtidos). No geral, as amostras não apresentam dominância, pois todos os valores do índice foram menores que 0,5 (Tabela 3). Os valores de Simpson indicam uma maior homogeneidade nos machos no meio SNA (0,6122) e o grupo com menor homogeneidade foi o de fêmeas no MA2% (0,7593). A homogeneidade indica maior diversidade, isso se confirma com valores do índice de Shannon, com a maior diversidade em fêmeas de MA2% (1,642) e a menor diversidade em machos de SNA (1,215) (Tabela 3). O índice de Jaccard indicou que os gêneros isolados dos machos foram similares nos três meios de cultivo (0,4285), entretanto das fêmeas foram recuperados mais gêneros em comum nos meios SNA e BDA (0,6). Por outro lado, o índice de Bray-Curtis variou de 0,47 (apresentando baixa similaridade) até o valor de 0,66 com maior similaridade (Tabela 5).

**Figura 7.** Curva de rarefação dos gêneros encontrados nos métodos I e II em *Euplatypus parallelus*.



Os gêneros *Ambrosiella*, *Raffaelea* e *Yamadazyma* foram compartilhados em MA2% e SNA; e *Ambrosiella*, *Pichia*, *Raffaelea* e *Yamadazyma* em BDA. Os outros gêneros não foram compartilhados, aparecendo apenas em determinada amostra (Figura 8).

**Tabela 3.** Parâmetros de alfa diversidade de fungos encontrados em *Euplatypus paralellus*.

Índice Alfa	Método I				Método II			
	PDA		SNA		PDA		MA	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Taxa_S	5	4	4	4	5	4	5	7
Indivíduos	12	9	14	8	24	9	19	18
Dominância_D	0,2639	0,284	0,3878	0,3438	0,3681	0,3333	0,2964	0,2407
Simpson_1-D	0,7361	0,716	0,6122	0,6563	0,6319	0,6667	0,7036	0,7593
Shannon_H	1,445	1,311	1,215	1,213	1,222	1,215	1,411	1,642
Chao-1	5,5	4	8	4,5	6	5	5	13

**Tabela 4.** Índice de similaridade de Jaccard e Bray-Curtis comparando machos e fêmeas nos métodos de isolamento I e II.

		Jaccard	Bray-Curtis
Método I	Macho e fêmea	0.5	0.57143
Método II	Macho e fêmea	0.66667	0.54545

**Tabela 5.** Índice de similaridade de Jaccard e Bray-Curtis comparando machos e fêmeas nos três meios de cultivo para o método II.

Besouros	Meios	Jaccard	Bray-Curtis
<b>Macho</b>	SNA-BDA	0.4285714	0.63158
	BDA-MA	0.4285714	0.65116
	SNA-MA	0.4285714	0.66667
<b>Fêmea</b>	SNA-BDA	0.6	0.47059
	BDA-MA	0.57143286	0.51852
	SNA-MA	0.375	0.53846

**Figura 8.** Compartilhamento de gêneros isolados do interior de *Euplatypus parallelus*, nos meios BDA, SNA e MA 2%. n: número de gêneros.



## 5 DISCUSSÃO

Semelhante a outros insetos fungicultores como as formigas atíneas, cupins e abelhas (MUELLER; GERARDO, 2002; MENEZES et al., 2015), *E. parallelus* (besouro da ambrosia) também apresenta a característica de cultivar fungos para alimentação (BATRA, 1963). Esse inseto vive em simbiose não apenas com o fungo que cultiva, mas também com uma diversa microbiota associada aos diferentes estágios do besouro (larva, pupa e adultos), bem como às galerias que constroem nas árvores (TARNO et al., 2016). Devido à fungicultura praticada por *E. parallelus* nas galerias que constroem nas árvores, esses besouros são considerados pragas florestais de importância econômica (AVIDOV et al., 1969; ELZINGA, 1997).

Apesar da importância econômica de *E. parallelus* pouco se conhece a respeito da diversidade de fungos associados ao corpo desse inseto. Até hoje, apenas o estudo realizado por Tarno e colaboradores (2016) mostrou que existem fungos associados ao corpo desse besouro (gêneros: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Saccharomyces* e *Trichoderma*). No entanto, estudos prévios com outros besouros da ambrosia, mostraram uma maior diversidade de fungos (BAKER; NORRIS, 1968; BUMRUNGSRI et al., 2008; TARNO et al., 2016, HULCR et al., 2017). Comparados aos trabalhos citados acima, os resultados desse estudo mostraram uma maior diversidade de fungos associados ao corpo de *E. parallelus*, visto que, *Ambrosiozyma*, *Cladosporium*, *Coprinellus*, *Geosmithia*, *Ogataea*, *Pichia*, *Pycnoporus*, *Raffaelea*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Schizophyllum* e *Yamadazyma* estão sendo reportados aqui pela primeira vez. Adicionalmente, as curvas de rarefação sugerem que um maior número de gêneros de fungos poderia ser encontrado, caso mais besouros fossem analisados.

Alguns autores sugerem que os gêneros *Ambrosiella*, *Ambrosiozyma*, *Geosmithia*, *Raffaelea*, *Monacrosporium* e *Phialophoropsis* (carregados nas micângias) são utilizados como fonte de alimento pelos besouros da ambrosia (BATRA, 1963; BAKER; NORRIS, 1968; KLEPZIG et al., 2001; HULCR et al., 2017). Os gêneros *Ambrosiozyma*, *Geosmithia*, *Raffaelea* também foram encontrados neste estudo. Curiosamente, o gênero *Raffaelea* foi o mais prevalente e esteve mais relacionado à parte interna dos machos. No entanto, surge a pergunta sobre o porquê esse gênero foi encontrado com maior incidência nos machos. Estudos futuros esclarecerão se esses isolados são utilizados por *E. parallelus* como fonte nutricional.

As fêmeas dos besouros da ambrosia são responsáveis por carregar e inocular os fungos na parede das galerias (UEDA; KOBAYASHI, 2005), enquanto as galerias podem ser construídas por machos ou fêmeas, dependendo da espécie (FLECHTMANN et al., 1995). Nesse sentido, esperava-se que as fêmeas apresentassem um maior número de isolados do fungo *Raffaelea* do que os machos. Além disso, os isolados de *Raffaelea* encontrados neste estudo agruparam-se em quatro possíveis clados filogenéticos novos para a ciência. Considerando que tais isolados não se agrupam com as espécies relatadas como mutualistas, tais isolados poderiam estar desempenhando outros papéis (ainda desconhecidos) no ciclo biológico dos besouros machos. Devido a filogenia do gênero *Raffaelea* apresentar incongruências quando a análise é baseada em apenas um marcador molecular (SIMMONS et al., 2016), estudos futuros (baseados em análises filogenéticas com mais de um marcador molecular (DREADEN et al. (2014)) deverão discutir sobre o posicionamento filogenético de tais clados, assim como a relação com *E. parallelus*.

Por outro lado, Mendes e colaboradores (2012) sugeriram a importância das leveduras como produtoras de enzimas polissacaridases que permitem a degradação do substrato vegetal para a disponibilização de nutrientes no caso das formigas, porém o mesmo pode ser que ocorra para os besouros. Neste estudo, foram encontrados quatro gêneros de leveduras (*Ogataea*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Yamadazyma*), no entanto, se desconhece se todos esses micro-organismos realmente ajudam na obtenção de nutrientes para *E. parallelus*.

O presente estudo reuniu informações inéditas sobre a diversidade de fungos que habitam o corpo de *E. parallelus*, pois vários gêneros estão sendo relatados nesse microbioma pela primeira vez. Esses resultados abrem uma janela para estudos futuros da interação de *E. parallelus*- fungos simbiotes (que poderiam ser utilizados no controle biológico desses insetos praga), assim como para estudos de sistemática e descrição de possíveis espécies novas para a ciência.

## 6 CONCLUSÕES

- *Euplatypus parallelus* apresenta uma elevada diversidade de fungos no corpo.
- Prováveis espécies novas de fungos para a ciência estão presentes no corpo desses insetos.

## 7 PERSPECTIVAS

- Este estudo possibilitou a criação de uma coleção de fungos para estudos futuros de sistemática e controle biológico de *E. parallelus*.

## REFERÊNCIAS

- ABE, A. et al. The molecular phylogeny of the genus *Rhizopus* based on rDNA sequences. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 70, n. 10, p. 2387-2393, 2014.
- AVIDOV, Z. et al. **Plant pests of Israel**. Jerusalem: Israel University Press, 1969.
- BADALYAN, S. M. et al. New Armenian wood-associated coprinoid mushrooms: *Coprinopsis strossmayeri* and *Coprinellus* aff. *radians*. **Diversity**, Bethesda, v. 3, n. 1, p. 136-154, 2011.
- BAKER, J. M.; NORRIS, D. M. A complex of fungi mutualistically involved in the nutrition of the ambrosia beetle *Xyloborus ferrugineus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 11, [S. n.], p. 246-250, 1968.
- BATRA, L. R. Ecology of ambrosia fungi and their dissemination by beetles. **Transactions of the Kansas Academy of Science**, Topeka, v. 66, n. 2, p. 213-236. 1963.
- BRIDGES, J. R. Effects of terpenoid compounds on growth of symbiotic fungi associated with the southern pine beetle. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, n. 1, p. 83-85, 1987.
- BUCHSBAUM, R., et al. **Animal without back bones**. 3<sup>rd</sup> ed. Chicago: Press Chicago and London, 1987.
- BUMRUNGSRI, S. et al. The infestation by an exotic ambrosia beetle, *Euplatypus parallelus* (F.) (Coleoptera: Curculionidae: Platypodinae) of Angsana tress (*Pterocarpus indicus* Willd) in southern Thailand. **Songklanakarin Journal Science and Technology**, Hat Yai, v. 30, n. 5, p. 579-582, 2008.
- CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 17, n. 4, p. 540-552, 2000.
- CHAO, A. et al. A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. **Ecology Letters**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 148-159, 2005.
- CIAFARDINI, G. et al. *Yamadazyma terventina* sp. nov., a yeast species of the *Yamadazyma* clade from Italian olive oils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, n. 1, p. 372-376, 2013.
- DREADEN, T. J. et al. Phylogeny of ambrosia beetle symbionts in the genus *Raffaelea*. **Fungal Biology**, Oxford, v. 118, n. 12, p. 970-978, 2014.
- ELZINGA, R. J. **Fundamentals of entomology**. 4<sup>th</sup>ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997.
- FARRELL, B. D. et al. The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). **Evolution**, Lancaster, v. 55, n. 10, p. 2011-2027, 2001.
- FLECHTMANN, C. A. H. et al. **Scolytidae em reflorestamento com pinheiros tropicais**. 4<sup>th</sup>ed. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 1995.
- GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2002.

GIL L. A.; PAJARES, J. A. Los escolítidos de las coníferas em la Península Ibérica. **Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Ministério de Agricultura, Pesca y Alimentación**, Madrid, [S.n], p. 194- 198, 1986.

HARRINGTON, T. C. et al. New combinations in *Raffaelea*, *Ambrosiella*, and *Hyalorhino cladiella*, and four new species from the red bay ambrosia beetle *Xyleborus glabratus*. **Mycotaxon**, New York, v. 111, [S. n], p. 337-361, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, [S.n.], p. 95-98, 1999.

HULCR, J. et al. The ambrosia symbiosis: From evolutionary ecology to practical management. **The Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 62, [S. n], p- 285- 303, 2017.

INÁCIO, M. L. et al. Fungi of *Raffaelea* genus (Ascomycota: Ophiostomatales) associated to *Platypus cylindrus* (Coleoptera: Platypodidae) in Portugal. **Revista de Ciências Agrárias**. Lisboa, v. 31, n. 2, p. 96-104, 2008.

JAMES, T. Y. et al. Evolution of the gene encoding mitochondrial intermediate peptidase and its cosegregation with the A mating-type locus of mushroom fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 3, p. 381-390, 2004.

JORDAL, B. H. et al. Molecular phylogeny of bark and ambrosia beetles reveals multiple origins of fungus farming during periods of global warming. **BMC Evolutionary Biology**, New York, v. 12, n. 133, p. 1471- 2148, 2012.

KATOH, K. et al. M. Mafft Multiple sequence alignments of tware version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, [S.l.], v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KLEPZIG, K. D. et al. Mutualism and antagonism– Ecological interactions among bark beetles, mites and fungi. Biotic in plant pathogen associations (eds. M. J. Jeger and N. J. Spencer). **CAB International**, [S.l.], [S. n], p. 237-267, 2001.

KOLARIK, M. et al. A complex of three new white-spored, sympatric, and host range limited *Geosmithia* species. **Mycological Research**. Cambridge, v. 109, n. 12, p. 1323–1336, 2005.

KUMAR, S. et al. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger data sets. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

KURTZMAN, C. P. *Pichia* E. C. Hansen emend. In: Kurtzman C. P. Fell J.W. (eds) The yeasts, a taxonomic study, 4ed. **Elsevier**, Amsterdam, p. 273-352, 1998.

KURTZMAN, C. P. et al. Systematics of methanol assimilating yeasts and neighboring taxa from multigene sequence analysis and the proposal of *Peterozyma* gen. nov., a new member of the Saccharomycetales. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 353-361, 2010.

KURTZMAN, C. P. et al. Description of *Ambrosiozyma oregonensis* sp. nov., and reassignment of *Candida* species of the *Ambrosiozyma* clade to *Ambrosiozyma ashinagacolaf.a.*, comb. nov., *Ambrosiozyma llanquihuensisf.a.*, comb. nov., *Ambrosiozyma maleeaeef.a.*, comb. nov.,

*Ambrosiozyma pseudovanderkliftiif.a.*, comb. nov., and *Ambrosiozyma vanderkliftiif.a.*, comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, n. 10, p. 3877–3883, 2013.

LESAGE-MEESSEN, L. et al. Phylogeographic relationships in the polypore fungus *Pycnoporus* inferred from molecular data. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 325, n. 1, p. 37-48, 2011.

MAGURRAN, A. E. **Measuring biological diversity**. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2004.

MARIMON, R. et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. Mexicana*: Three New *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, 2007.

MENDES, T. D. et al. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, Switzerland, v. 3, n. 1, p. 228-245, 2012.

MENEZES et al. A brazilian social bee must cultivate fungus to survive. **Current Biology**. London, v. 25, n. 21, p. 2851-2855, 2015.

MÖLLER, E. M. et al. A simple and efficient protocol for isolation of high weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.

MUELLER, U. G.; GERARDO N. M. Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. **Proceedings of the National Academy of Science**. Washington, v. 99, n. 24, p. 15247-15249, 2002.

MUELLER, G. M. et al. **Biodiversity of fungi: Inventory and Monitoring**. [S.l.]: Elsevier, 2004.

MUSVUUGWA, T. et al. New species of Ophiostomatales from Scolytinae and Platypodinae beetles in the Cape Floristic Region, including the discovery of the sexual state of *Raffaelea*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 108, n. 4, p. 933-950, 2015.

PERRONE, G. et al. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. **Fungal Biology**, Oxford, v. 115, n. 11, p. 1138- 1150, 2011.

QUEIROZ, J. M.; GARCIA, M. A. Ocorrência de besouros de ambrosia (Coleoptera: Platypodidae) em área urbana de Campinas, SP. **Floresta e Ambiente**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 1-5, 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org>> Acesso em: 08 ago, 2017.

RÉDOU, V. et al. Species richness and adaptation of marine fungi from Deep-Sub sea floor sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 81, p. 3571–3583, 2015.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 16, p. 6241- 6246, 2012.

SILVA, J. C. P. et al. Biological aspects of *Euplatypus parallelus* (F.) (Coleoptera, Curculionidae, Platypodinae) attacking *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) in São Paulo northwest, Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEVEICULTURA, 3, 2013, Guarapari. **Anais...Guarapari** : CEDAGRO. 1 CD-ROM

SIMMONS, R. D. et al. New *Raffaelea* species (Ophiostomatales) from the USA and Taiwan associated with ambrosia beetles and plant hosts. **IMA Fungus**, United States, v. 7, n. 2, p. 265-273, 2016.

TARNO, H. et al. Microbial community associated with ambrosia beetle, *Euplatypus parallelus* on sonokembang, *Pterocarpus indicus* in Malang. **AGRIVITA Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 38, n. 3, p. 312-320, 2016.

UEDA, A. M.; KOBAYASHI, M. Attraction of *Platypus quercivorus* (Murayama) (Coleoptera: Platypodidae) to logs bored by conspecific silent males. **Bulletin of the Forest Products Research Institute**, Tsukuba, v. 4, n. 1, p. 39-44, 2005.

WANG, X. et al. *Penicillium persicinum*, a new grise of ulvin, chrysogine and roqueformite C producing species from Qinghai province, China. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 173-179, 2004.

WATANABE, M. et al. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the Fusarium genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. **BMC Evolutionary Biology**, New York, v. 11, [S.n], p. 322, 2011.

WEBSTER, J. et al. **Introduction to Fungi**. 3<sup>rd</sup>ed. New York: Cambridge University, 2007.

WOOD, S. L. 1982. The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph. **Great Basin Naturalist Memoirs**, Provo, v. 6, [S.n], p.1-1359, 1982.

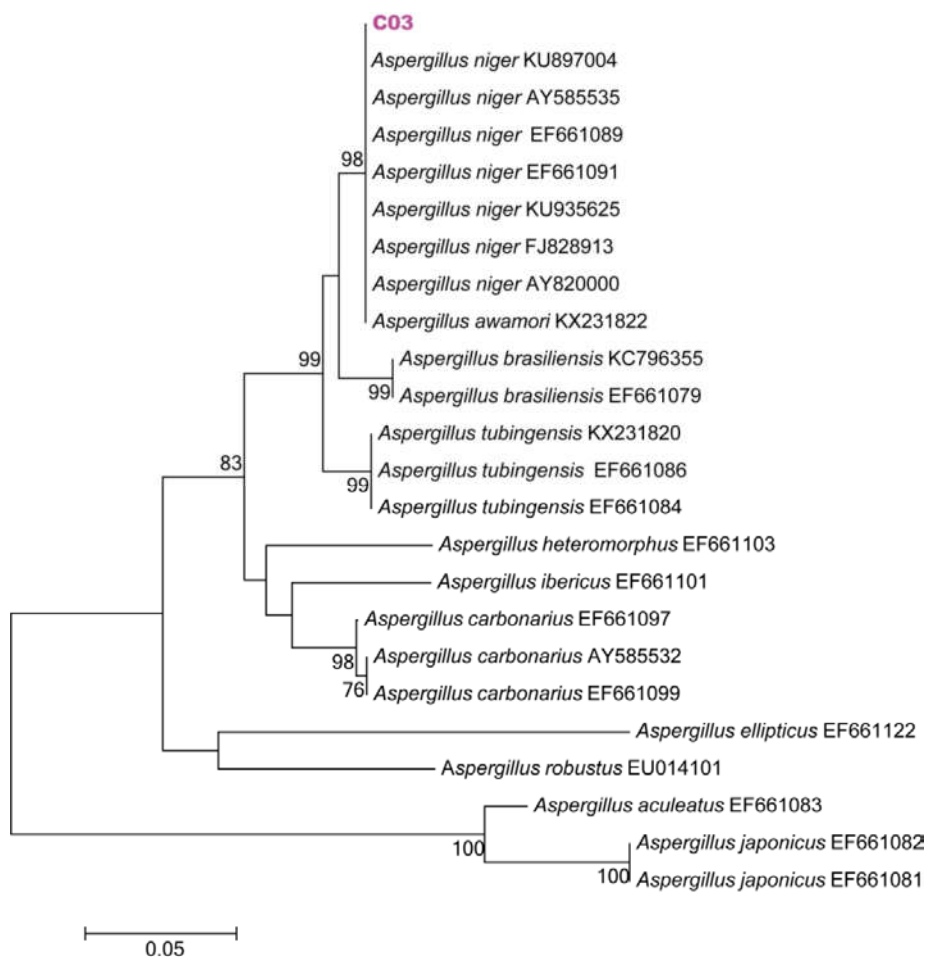
ZALAR, P. et al. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporiumphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. **Studies in Mycology**, [S.I], v. 58, n. 6, p. 157–183, 2007.

ZANUNCIO, J. C. et al. Occurrence of *Euplatypus parallelus*, *Euplatypus* sp. (Col.: Euplatypodidae) and *Xyleborus affinis* (Col.: Scolytidae) in *Pinus* sp. in Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 387-389, 2002.

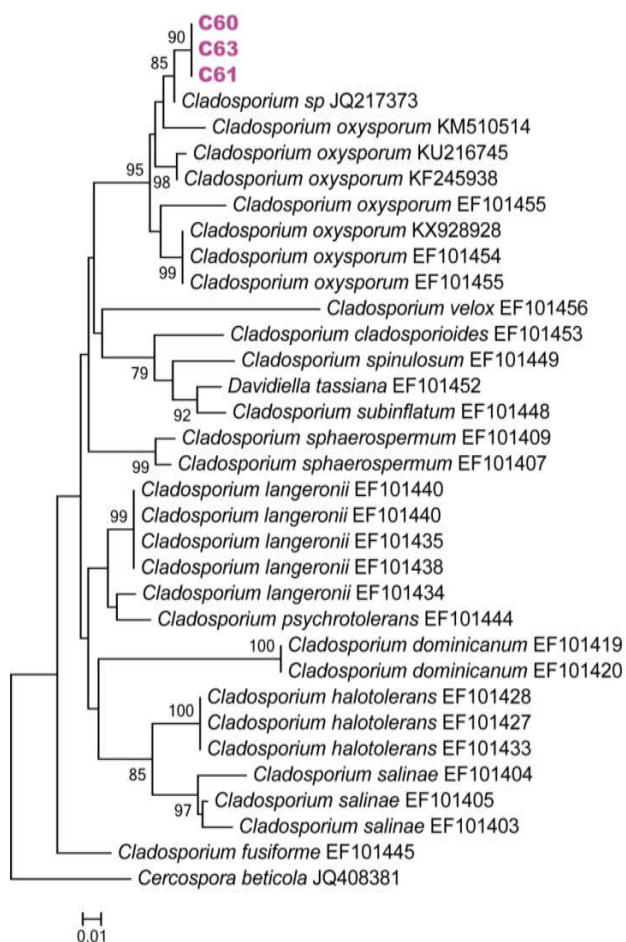
ZARBIN, P. H. G. et al. Insect pheromones: technology and challenges for a competitive agriculture in Brazil. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009.

## ANEXOS

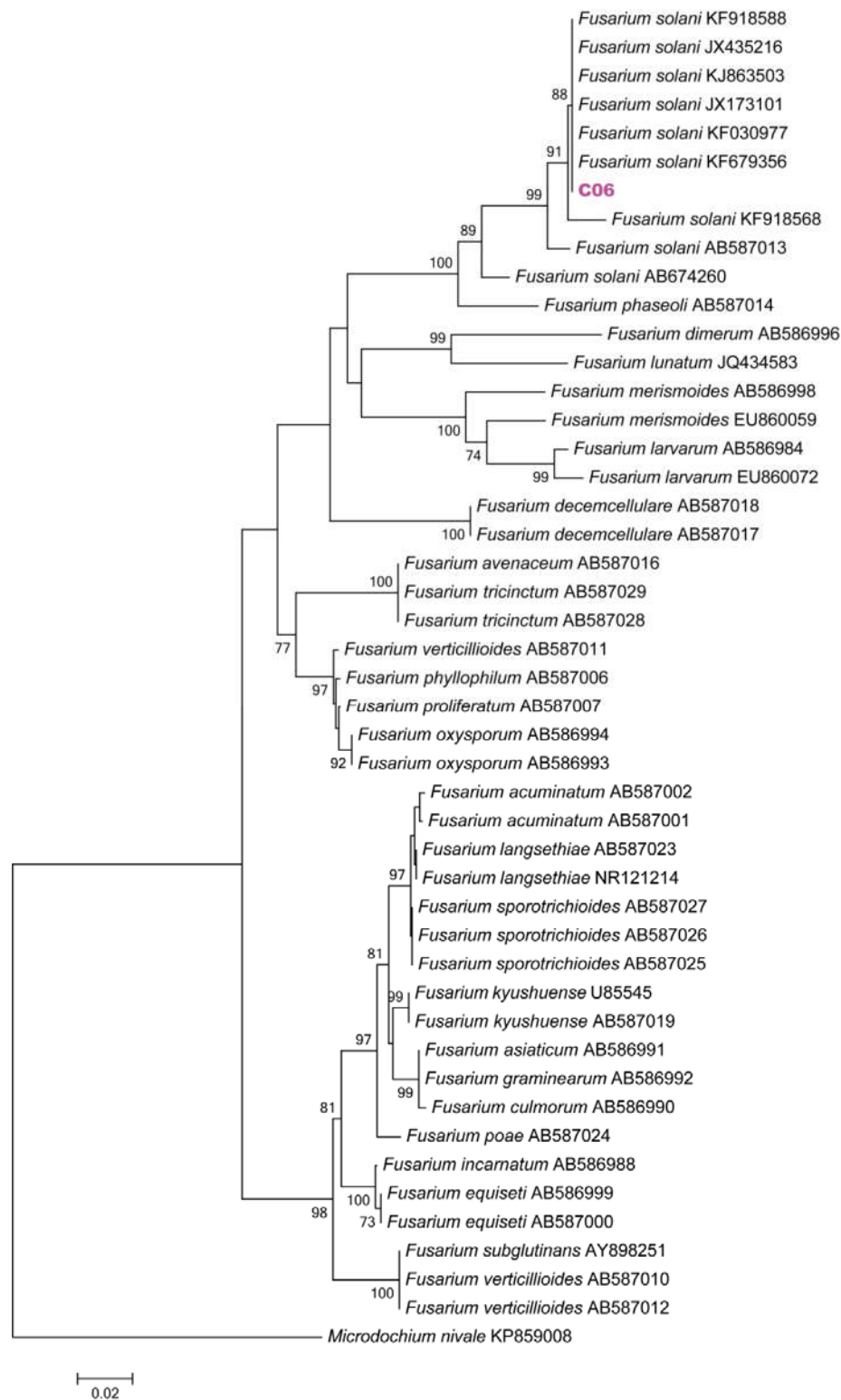
**Anexo 1.** Árvore filogenética do gênero *Aspergillus*. A figura mostra o isolado C03 (em roxo) dentro do clado de *A. niger*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com um total de 24 sequências de Beta tubulina. O alinhamento final compreendeu 615 pb. Os números nos ramos indicam valores de *bootstrap* (valores abaixo de 70% foram excluídos). As sequências com códigos de acesso EF661081, EF661082 e EF661083 foram utilizadas como *outgroup*.



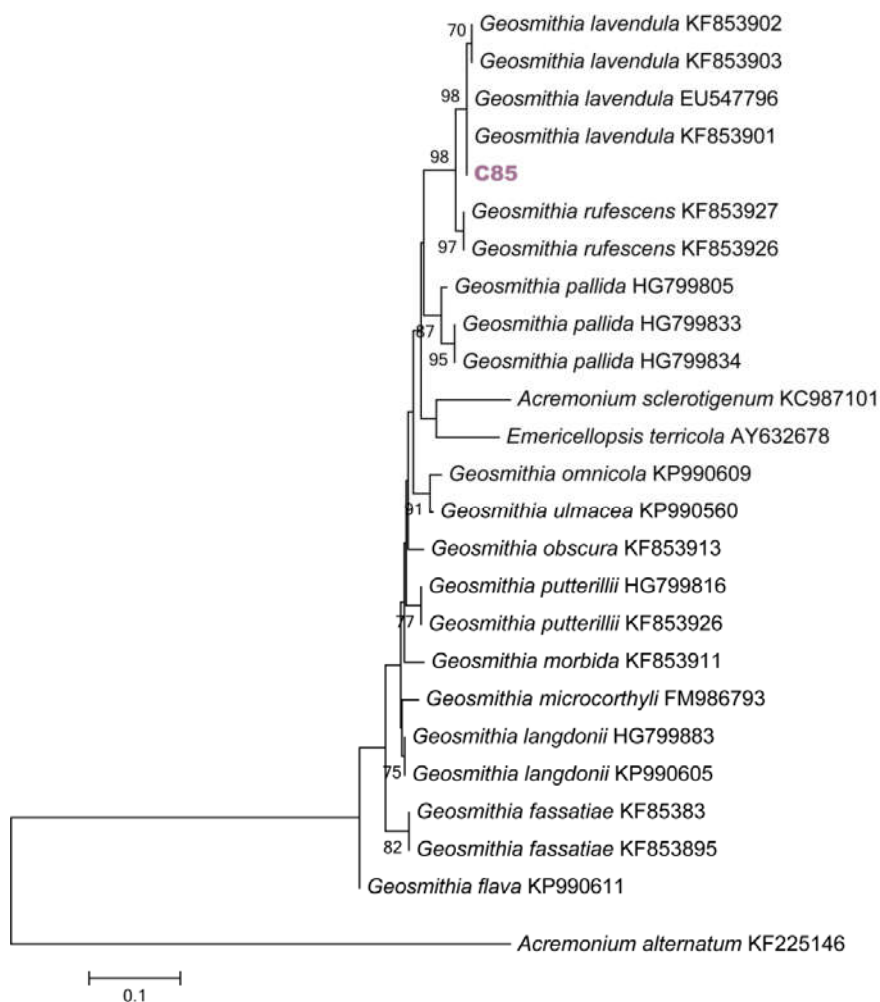
**Anexo 2.** Árvore filogenética do gênero *Cladosporium*. A figura mostra os isolados C60, C61, C63 (em roxo) dentro do clado de *Cladosporium oxysporum*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 34 sequências de Beta tubulina. O alinhamento final compreendeu 383 pb. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (valores abaixo de 70% foram excluídos). A sequência com o código de acesso JQ408381 foi utilizada como *outgroup*.



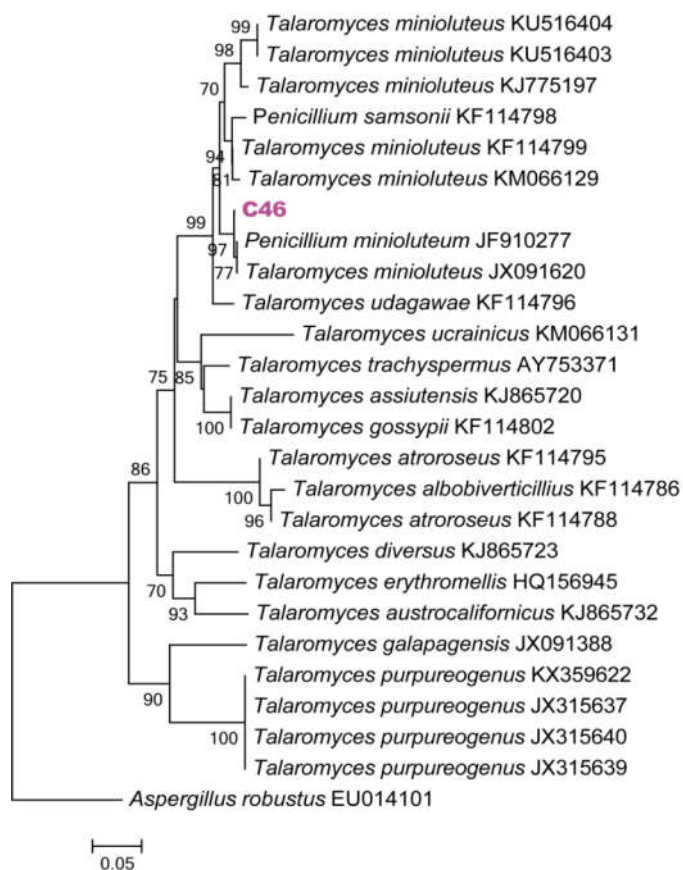
**Anexo 3.** Árvore filogenética do gênero *Fusarium*. A figura mostra o isolado C06 (em roxo) dentro do clado de *F. solani*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 47 seqüências de ITS. O alinhamento final compreendeu 565 pb. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (valores abaixo de 70% foram excluídos). A seqüência com o código de acesso KP859008 foi utilizada como *outgroup*.



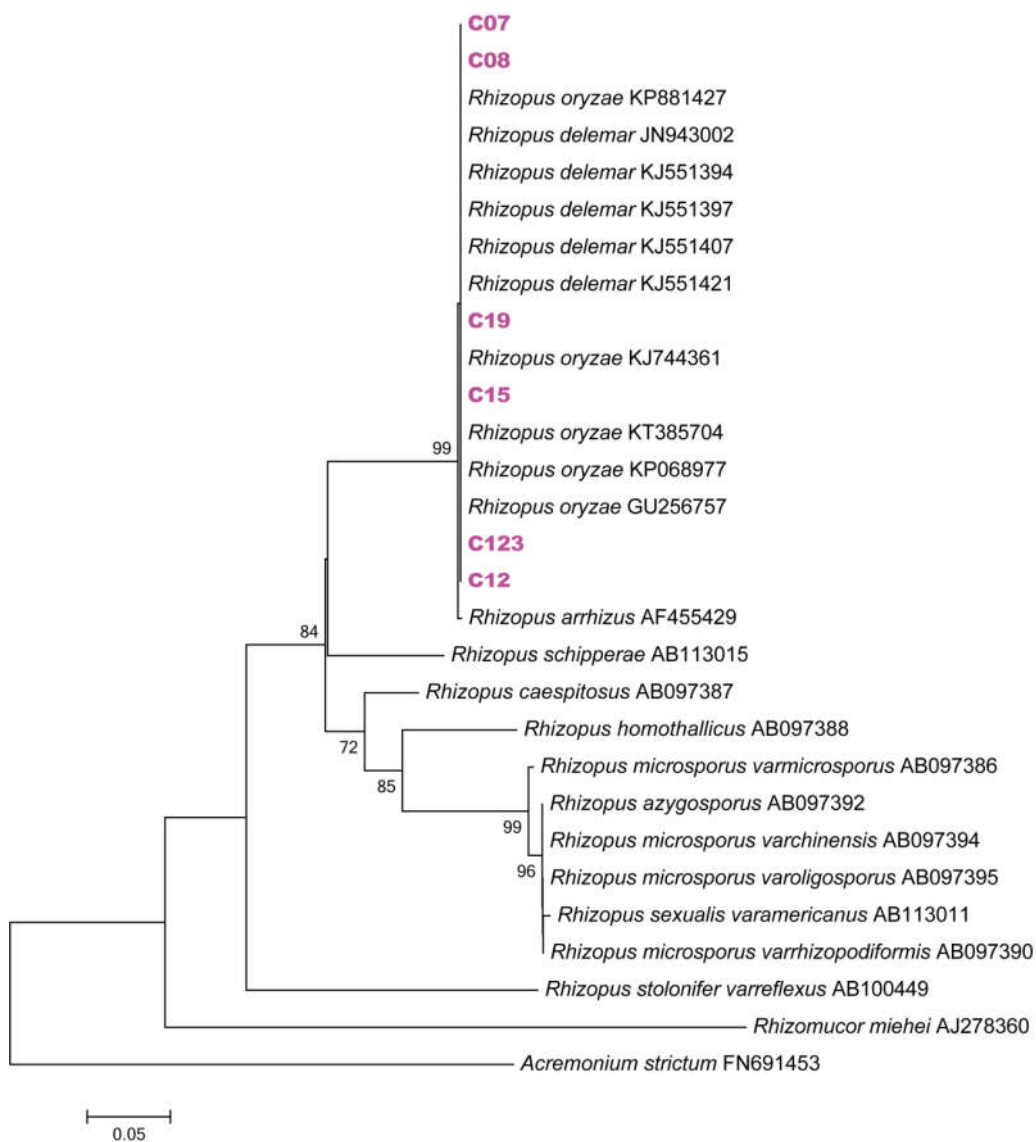
**Anexo 4.** Árvore filogenética do gênero *Geosmithia*. A figura mostra o isolado C85 (em roxo) dentro do clado de *Geosmithia lavendula*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 25 sequências de Beta tubulina. O alinhamento final compreendeu 1025 pb. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (valores abaixo de 70% foram excluídos). A sequência com o código de acesso KF225146 foi utilizada como *outgroup*.



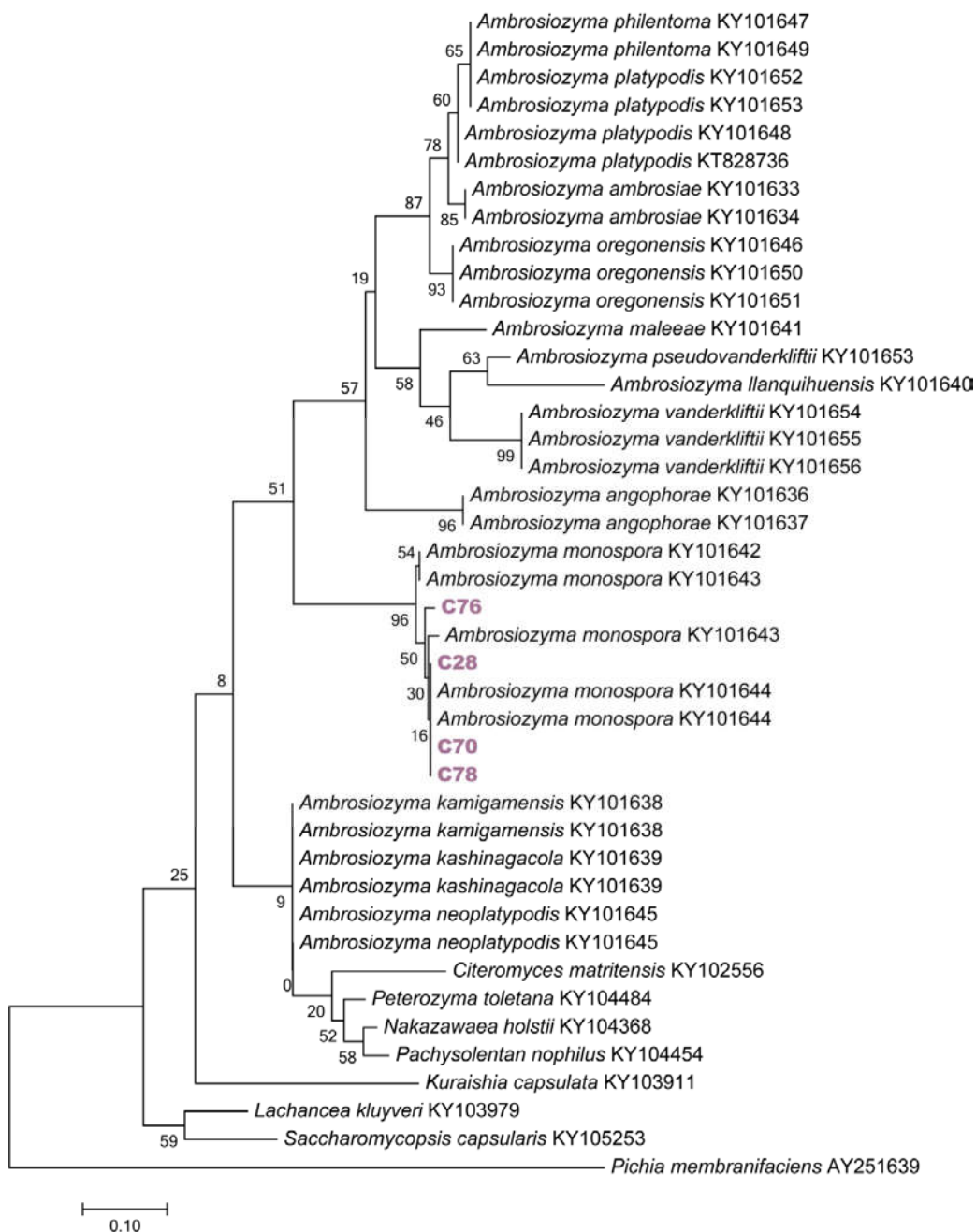
**Anexo 5.** Árvore filogenética do gênero *Penicillium*. A figura mostra o isolado C46 (em roxo) dentro do clado de *Penicillium minioluteus*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 26 sequências de Beta tubulina. O alinhamento final compreendeu 452 pb. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (valores abaixo de 70% foram excluídos). A sequência com o código de acesso EU014101 foi utilizada como *outgroup*.



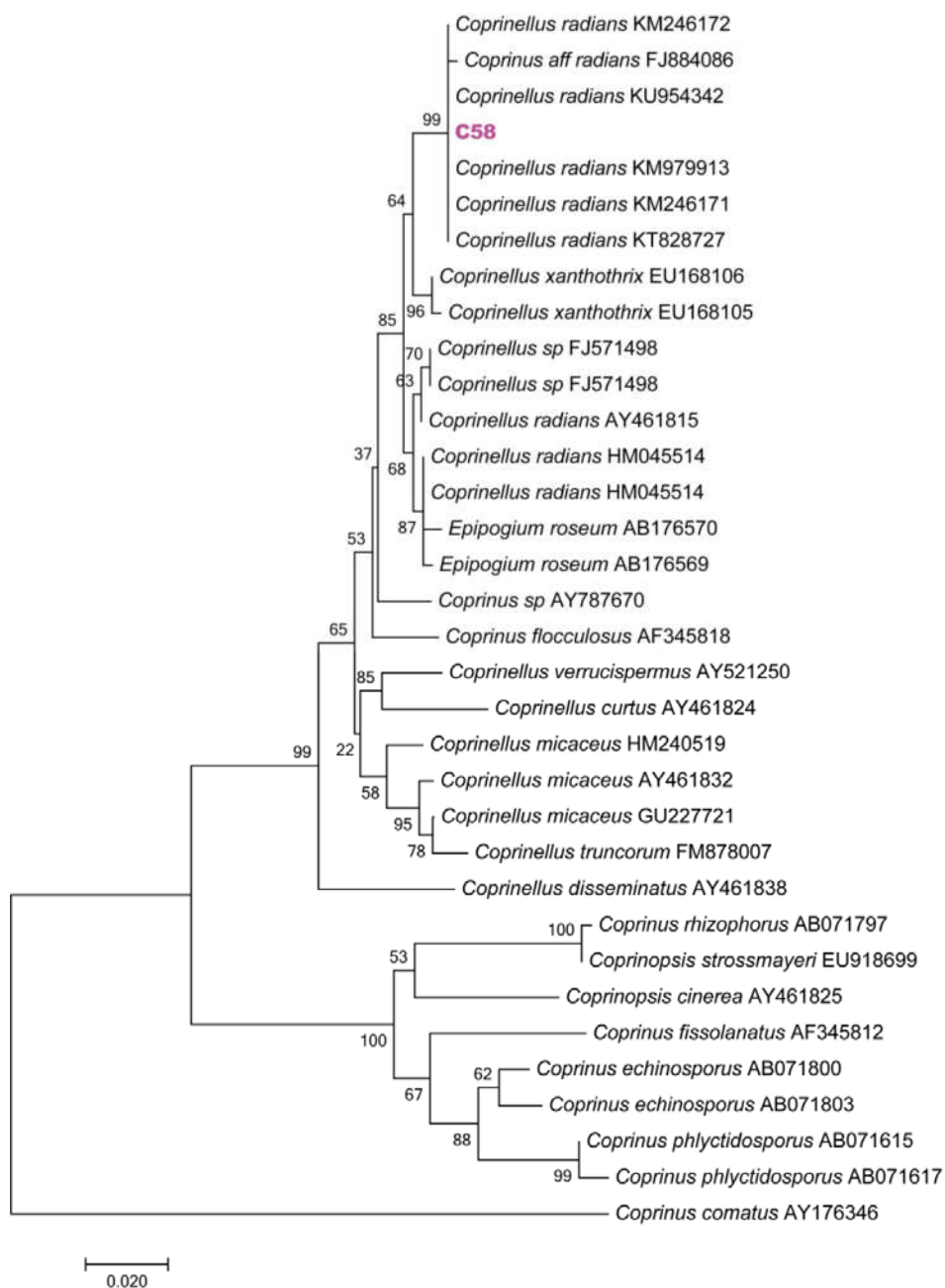
**Anexo 6.** Árvore filogenética do gênero *Rhizopus*. A figura mostra os isolados C07, C08, C12, C15, C19 e C123 (em roxo) dentro do clado de *R. delemar* e *R. oryzae*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 29 sequências de ITS. O alinhamento final compreendeu 822 pb. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (valores abaixo de 70% foram excluídos). A sequência com o código de acesso FN691453 foi utilizada como *outgroup*.



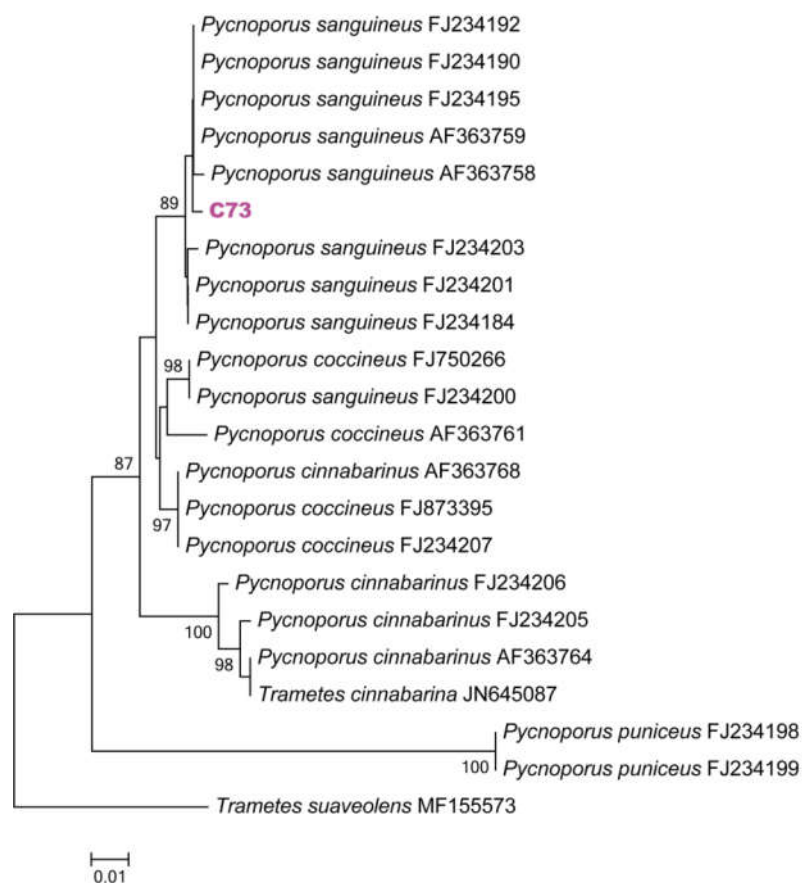
**Anexo 7.** Árvore filogenética do gênero *Ambrosiozymba*. A figura mostra os isolados C28, C70, C76 e C78 (em roxo) dentro do clado de *Ambrosiozymba*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 42 sequências de ITS. O alinhamento final compreendeu 577 pb. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (valores abaixo de 70% foram excluídos). A sequência com o código de acesso AY251639 foi utilizada como *outgroup*.



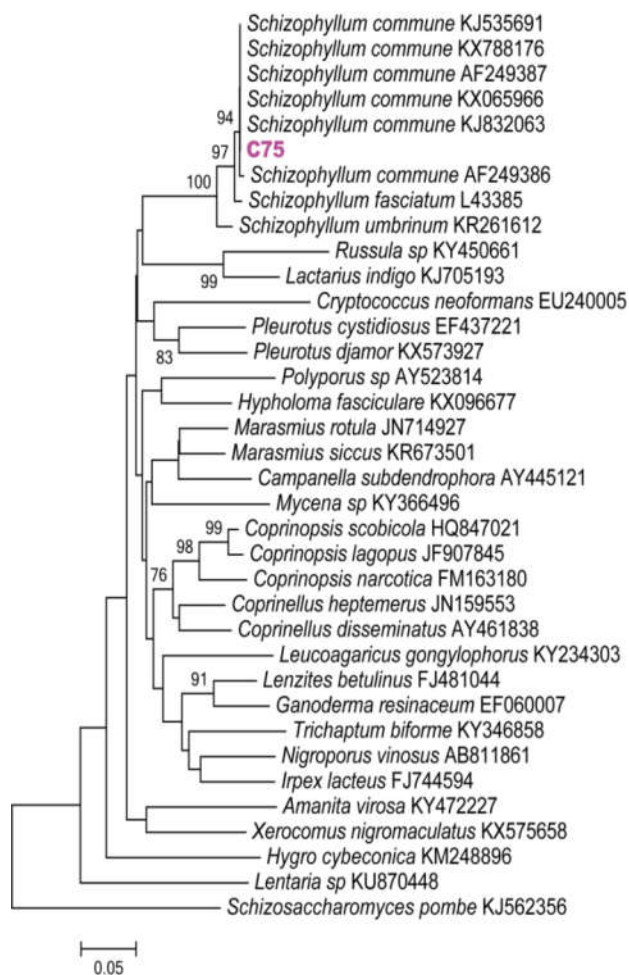
**Anexo 8.** Árvore filogenética do gênero *Coprinellus*. A figura mostra o isolado C58 (em roxo) dentro do clado de *Coprinellus radians*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 34 sequências de ITS. O alinhamento final compreendeu 739 pb. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (valores abaixo de 70% foram excluídos). A sequência com o código de acesso AY176346 foi utilizada como *outgroup*.



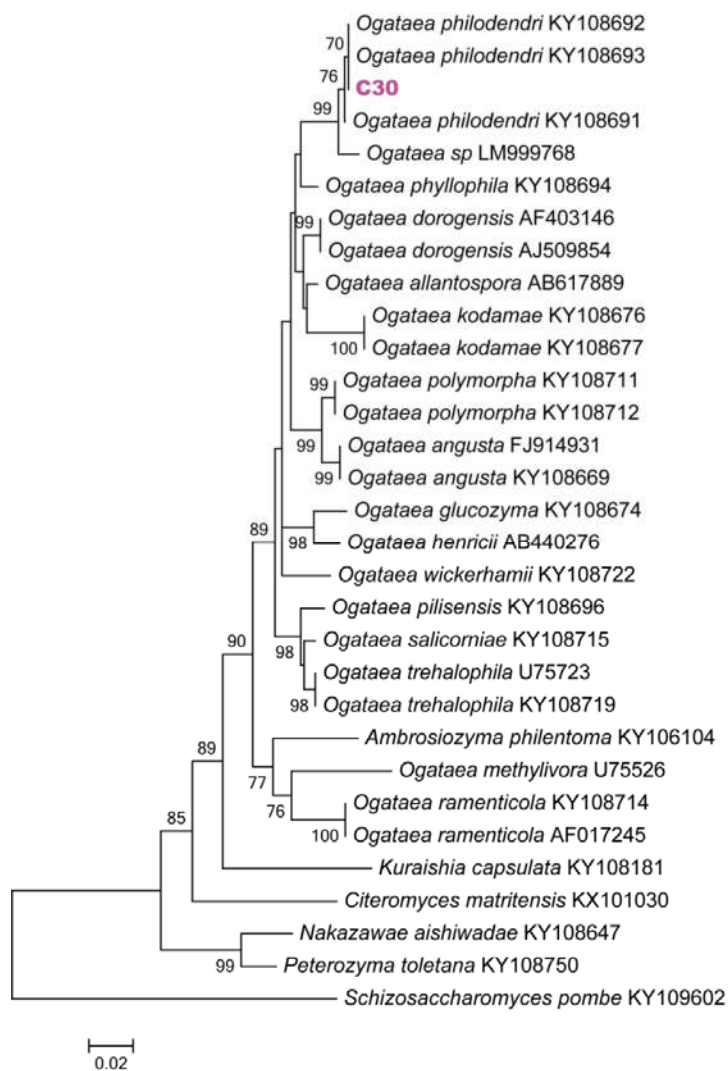
**Anexo 9.** Árvore filogenética do gênero *Pycnopus*. A figura mostra o isolado C73 (em roxo) dentro do clado de *Pycnopus sanguineus*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 22 sequências de ITS. O alinhamento final compreendeu 580 pb. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (valores abaixo de 70% foram excluídos). A sequência com o código de acesso MF155573 foi utilizada como *outgroup*.



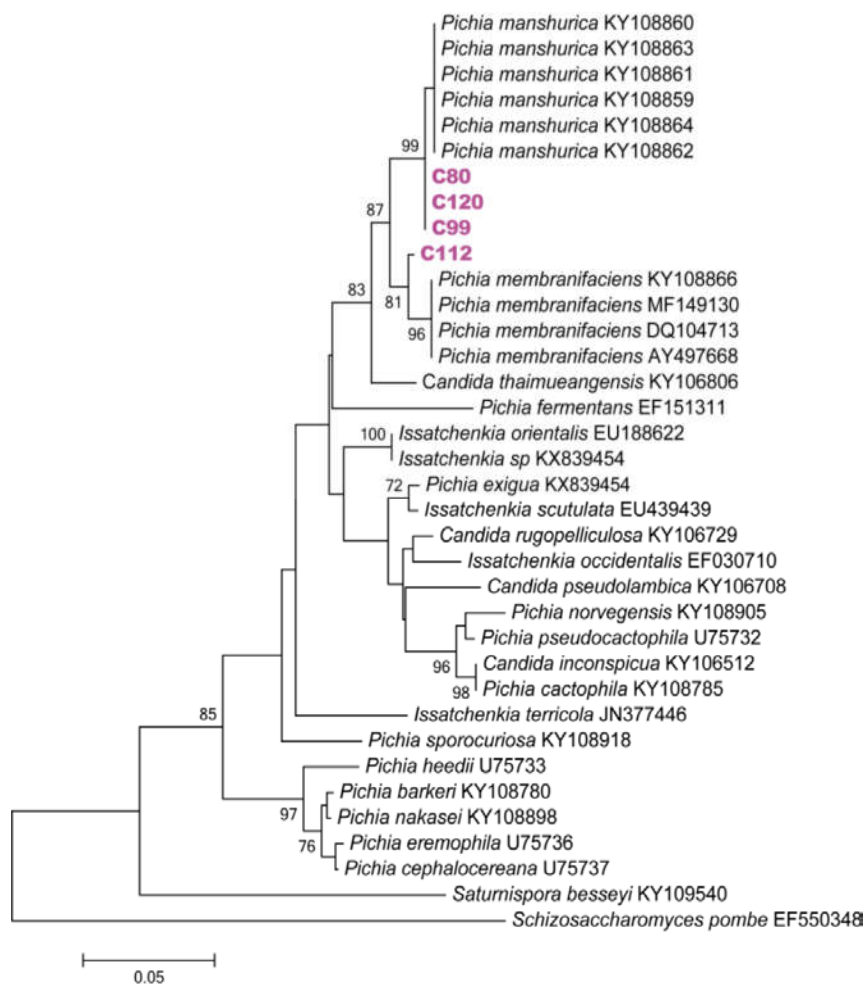
**Anexo 10.** Árvore filogenética do gênero *Schizophyllum*. A figura mostra o isolado C75 (em roxo) dentro do clado de *Schizophyllum commune*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 26 sequências de ITS. O alinhamento final compreendeu 835 pb. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (valores abaixo de 70% foram excluídos). A sequência com o código de acesso KJ562356 foi utilizada como *outgroup*.



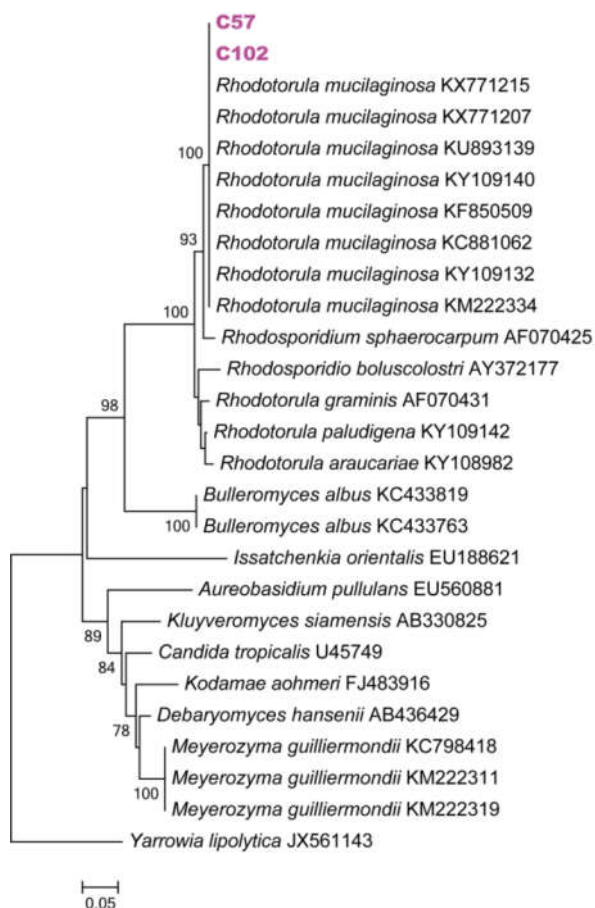
**Anexo 11.** Árvore filogenética do gênero *Ogataea*. A figura mostra o isolado C30 (em roxo) dentro do clado de *Ogataea philodendri*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 31 sequências de D1D2. O alinhamento final compreendeu 569 pb. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (valores abaixo de 70% foram excluídos). A sequência com o código de acesso KY109602 foi utilizada como *outgroup*.



**Anexo 12.** Árvore filogenética do gênero *Pichia*. A figura mostra os isolados C80, C99, C112 e C120 (em roxo) dentro do clado de *Pichia manshurica*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 36 sequências de DID2. O alinhamento final compreendeu 669 pb. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (valores abaixo de 70% foram excluídos). A sequência com o código de acesso EF550348 foi utilizada como *outgroup*.



**Anexo 13.** Árvore filogenética do gênero *Rhodotorula*. A figura mostra os isolados C57, C102 (em roxo) dentro do clado de *Rhodotorula mucilaginosa*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 22 sequências de DID2. O alinhamento final compreendeu 640 pb. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (valores abaixo de 70% foram excluídos). A sequência com o código de JX561143 foi utilizada como *outgroup*.



**Anexo 14.** Árvore filogenética do gênero *Yamadazyma*. A figura mostra os isolados C47, C54, C89 e C96 e C119 (em roxo) dentro do clado de *Yamadazyma mexicana*. A árvore foi inferida seguindo o método de *neighbor-joining* com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, com total de 28 sequências de D1D2. O alinhamento final compreendeu 530 pb. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (valores abaixo de 70% foram excluídos). A sequência com o código de acesso U45848 foi utilizada como *outgroup*.

