

***Aureobasidium* spp. ASSOCIADAS A *Polybia paulista* (VESPIDAE).**

Nayla Fabiana Ananias, Fernando Carlos Pagnocca – Microbiologia – Ciências Biológicas -
Departamento de Bioquímica e Microbiologia - Instituto de
Biociências - Campus de Rio Claro

Os insetos são importantes vetores de leveduras na natureza (PHAFF & STARMER, 1987, p.123-180) e, cada vez mais, novos estudos confirmam a estreita relação entre alguns insetos e leveduras. Muitas vezes esses estudos levaram ao descobrimento de novas espécies. (ROSA, 2003, p. 271-275; SUH et al, 2004).

Os insetos sociais, e dentre eles as vespas, pelos seus hábitos alimentares, estão constantemente em contato com folhas, frutos, flores e nectários e assim, além de contribuir para veicular leveduras na natureza (LACHANCE et al, 2001, p. 1-8), representam uma fonte potencial para isolamento desses microrganismos.

Nesta pesquisa foram isoladas leveduras a partir de insetos adultos, larvas e de substâncias de reserva existentes em ninhos da vespa *Polybia paulista*. O meio YMA adicionado de cloranfenicol na concentração de 10 mg% (KURTZMAN & FELL, 1998; LACHANCE et al., 1998, p. 1-5), foi utilizado para os isolamentos. Para a identificação utilizou-se a metodologia proposta por Barnett (2000) e Kurtzman & Fell (1998), além da chave disponibilizada na página eletrônica do Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) ([http:// www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl)).

De um total de 110 estirpes isoladas, 39 (34,4%) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Aureobasidium*, sendo o grupo de maior ocorrência, seguido de *Cryptococcus* (18,1%), *Pichia* (15,4%) e *Candida* (9,0%), *Coniochaeta* (5,45%), *Pseudozyma* (4,54%), *Rhodotorula* (4,54%), *Mrakia* (2,72%) e *Bullera* (0,90%).

As 39 estirpes de *Aureobasidium* apresentaram variações quanto à fisiologia e morfologia (Quadro 2), com a cor variando de branco a vermelho-escuro, passando por tons de creme, salmão e, em alguns casos, com escurecimento acentuado da colônia. Estas mesmas variações morfológicas e fisiológicas também foram observadas por Urzi et al (1999) e são comuns neste grupo. A taxonomia deste grupo é geralmente difícil, devido ao alto pleomorfismo do mesmo, pois elas podem mudar sua morfologia de acordo com o estress ambiental (URZI et al, 1999, p. 95-105). Ainda, *A. pullulans* forma um grupo heterogêneo de fungos dematiáceos, bastante distante taxonomicamente de outros grupos (DE HOOG, 1993, p. 105-109). Assim como a maioria das leveduras ascomicetas pretas, esta espécie apresenta um alto potencial para se adaptar às diferentes condições ambientais (BRAAMS, 1993) e a variabilidade fenotípica reflete sua habilidade para colonizar diferentes substratos (DE HOOG AND YURLOVA, 1994, p.41-54).

Com o objetivo de melhor caracterizá-las, algumas estirpes (n=10) foram selecionadas para o seqüenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA (KURTZMAN & ROBNETT, 1998; O'DONNEL, 1993).

Dentre as 10 estirpes seqüenciadas (Quadro 1), apenas uma (N23PP3P1) apresentou resultado idêntico a outras estirpes depositadas no GenBank como *A. pullulans*, confirmando assim a identificação. Algumas (N12PPM1, N9PPM3a-2 e N6PPM1) apresentaram poucas diferenças nas seqüências e devem ser espécies-irmãs, enquanto outras (N9PPM3a-1, N10PPM3, N12PPM2, N23PPM1P5, N8PPM2 e N15PPM3) podem representar novas espécies devido ao grande número de diferenças observadas nas seqüências, principalmente as estirpes N23PPM1P5 e N8PPM2. Vega et al (2003, p. 19-24) consideraram suficiente três divergências nas bases nucleotídicas dos domínios D1/D2 para separar as espécies *C. fermentati* e *P. guilliermondii* em espécies distintas, apesar de bastante próximas fenotipicamente. Segundo Kurtzman & Robnett (1998) variações superiores a 1% na seqüência nucleotídica dessa região entre duas estirpes pode ser suficiente para considerá-las espécies distintas. Nossos resultados sugerem que a situação de elevada variabilidade fenotípica e mesmo genotípica, observada na pequena amostra selecionada, pode ser uma constante nas demais estirpes. É preciso portanto prosseguir a análise genotípica das demais estirpes e ao mesmo tempo utilizar outra região para os seqüenciamentos, para uma análise mais detalhada. Nesse caso, a região mais provável a ser estudada é a região ITS, a qual é relatada como um ótimo recurso para auxiliar na classificação desses microorganismos (YURLOVA, 1999, p. 63-69). Marcadores taxonômicos usados para distinção de um grande número de táxon foram desenvolvidos através de RFLP do ITS2 e a parte

LSU do rRNA (YURLOVA et al, 1999, p. 63-69). *DdeI* e *HhaI* foram particularmente usados por Yurlova et al (1996, p. 323-329) para distinguir os gêneros *Aureobasidium*, *Kabatiella* e *Selenophoma*.

Os resultados obtidos até o momento, ou seja, a grande variabilidade entre as estirpes de *Aureobasidium* encontradas junto a essas vespas e seus habitats confirmam que os insetos podem ser um excelente fonte para o isolamento de leveduras, muitas vezes podendo abrigar novas espécies cujas características são desconhecidas. O melhor exemplo disso é a demonstração da ocorrência de aproximadamente 200 novas espécies encontradas no trato intestinal de besouros, relatado por Suh et al, 2004, p. 261-265.

Quadro 1 – Relação das estirpes sequenciadas e respectiva identificação.

Estirpes (n=10)	Identificação por sequenciamento	Código de acesso no Genbank	% de semelhança	Número de bases iguais entre a sequência obtida e sua homóloga	Número de diferenças na região D1/D2
N9PPM3a-1	<i>Aureobasidium cf. pullulans</i>	HB1133	98	556/564	8
N10PPM3	<i>Aureobasidium pullulans</i>	N10	99	638/641	3
N12PPM1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	N10	99	517/518	1
N23PP3P1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	VR-8	100	456/456	0
N9PPM3a-2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	AB104687	99	564/565	1
N12PPM2	<i>A. pullulans/ Aureobasidium sp.</i>	AB104687/ KCTC 26210	99/ 99	493/496-	3
				485/489	4
N6PPM1	<i>A. pullulans/ Aureobasidium sp.</i>	VR-8/ YS67	99/ 99	493/495-	2
				493/495	2
N23PPM1P5	<i>Aureobasidium sp. nova 1</i>	HB1133	91	398/436	38
N8PPM2	<i>Aureobasidium sp. nova 2</i>	VTT D-1013	96	482/501	19
N15PPM3	<i>Aureobasidium sp.</i>	KCTC 26210	99	503/508	5

Identificação proposta através da comparação das sequências obtidas com suas homólogas, disponibilizadas na página eletrônica do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Quadro 2 – Padrão de fisiologia nutricional nas estirpes de *Aureobasidium spp.* sequenciadas.

	N9PPM3a-1	N23PPM1P5	N10PPM3	N12PPM1	N23PP3P1	N6PPM1	N9PPM3a-2	N12PPM2	N15PPM3	N8PPM2
Galactose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Lactose	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Melibiose	+	-	w	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Melezitose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Amido sol.	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-xilose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	-	w	w	-	+	+	+	+	+
D-ribose	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
D-glicosamina	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
N-acetil D-glicosamina	+	+	-	+	+	w	+	+	+	-
Etanol	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Glicerol	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Eritritol	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	w	+	-	-	+	+	+	+
Galactitol	-	+	-	w	-	-	-	+	-	+
D-manitol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
α -metil D-glicosídeo	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Salicina	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
DL-lactato	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Succinato	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Citrato	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Inositol	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
2-ceto-D-gluconato	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
5-ceto-D-gluconato	+	-	W	-	-	+	+	-	-	+
Sacarato	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
D-glucoronato	+	+	+	+	-	+	+	+	w	+
Xilitol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
L-arabinitol	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Nitrato	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Nitrito	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
10% NaCl/Glic.5%	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

+, positivo; w, fraco; -, negativo.

Referências bibliográficas:

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3a ed. Cambridge: Cambridge University Press, p.1139, 2000.

BRAAMS, J., Ecological studies on the fungal microflora inhabiting historical sandstones monuments. **Ph. D. Thesis**, Old-enburg., 1993

HOOG, G. S. DE. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**. 63, 105-109, 1993.

HOOG, G.S. DE & YURLOVA, N.A. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium pullulans* and *Hormonema*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 65: 41-54, 1994.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **Definition, classification and nomenclature of yeasts**. In: KURTZMAN, C. P., FELL, J. W. The Yeasts – A Taxonomy Study. 4th ed., Amsterdam: Elsevier Science B.,cap.1, 1:5, 1998.

LACHANCE, M.A. & STARMER, W.T. **Ecology of yeasts**. In: KURTZMAN, C. P., FELL, J. W. The Yeasts – A Taxonomy Study. 4th ed., Amsterdam: Elsevier Science B.,cap.1, 1:5, 1998

LACHANCE, M.A.; STAMER, W.T.; ROSA, C.A.; BOWLES, J.M.; BARKER, J.S.F.; JANZEN, D.H. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. **FEMS Yeast Research** , v. 1, p. 1-8, 2001.

O'DONNELL, K. **Fusarium and its near relatives**. In REYNOLDS D. R.; TAYLOR J. W.: The fungal holomorph: mitotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Wallingford: CAB international, p 225-233, 1993.

PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. **Yeasts associated with plants insects and soil**. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Eds). *The yeasts*, London: Academic Press, p.123-180, 1987.

ROSA, C.A.; LACHANCE, M.A.; SILVA, J.O.C.; TEIXEIRA, A.C.P.; MARINI, M.M.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R.P. Yeasts communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 271-275, 2003.

SUH, S.-O.; MCHUGH, J. V.; POLLOCK, D. D.; BLACKWELL, M., 2004. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **The British Mycological Society**, vol. 3, 261-265.

URZI, C.; LEO, F. DE; PASSO, C. LO; CRISEO, G. Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Journal of Microbiological Methods**. v. 36:95-105, 1999.

VEGA, F.E.; BLACKBURN, M.B.; KURTZMAN, C.P. & DOWD, P. F. Identification of a coffee berry borer-associated yeasts: does it break down caffeine? **The Netherlands Entomological Society**. v. 107: 19-24, 2003.

YURLOVA, N.A.; UIJTHOF, J.M.J. & HOOG, G.S. DE. Distinction of species in *Aureobasidium* and related genera by PCR robotyping. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 69: 323-329, 1996.

YURLOVA, N.A.; HOOG, G.S. DE; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. **Studies in Mycology**. v. 43:63-69, 1999.

Bolsa: CNPq/PIBIC