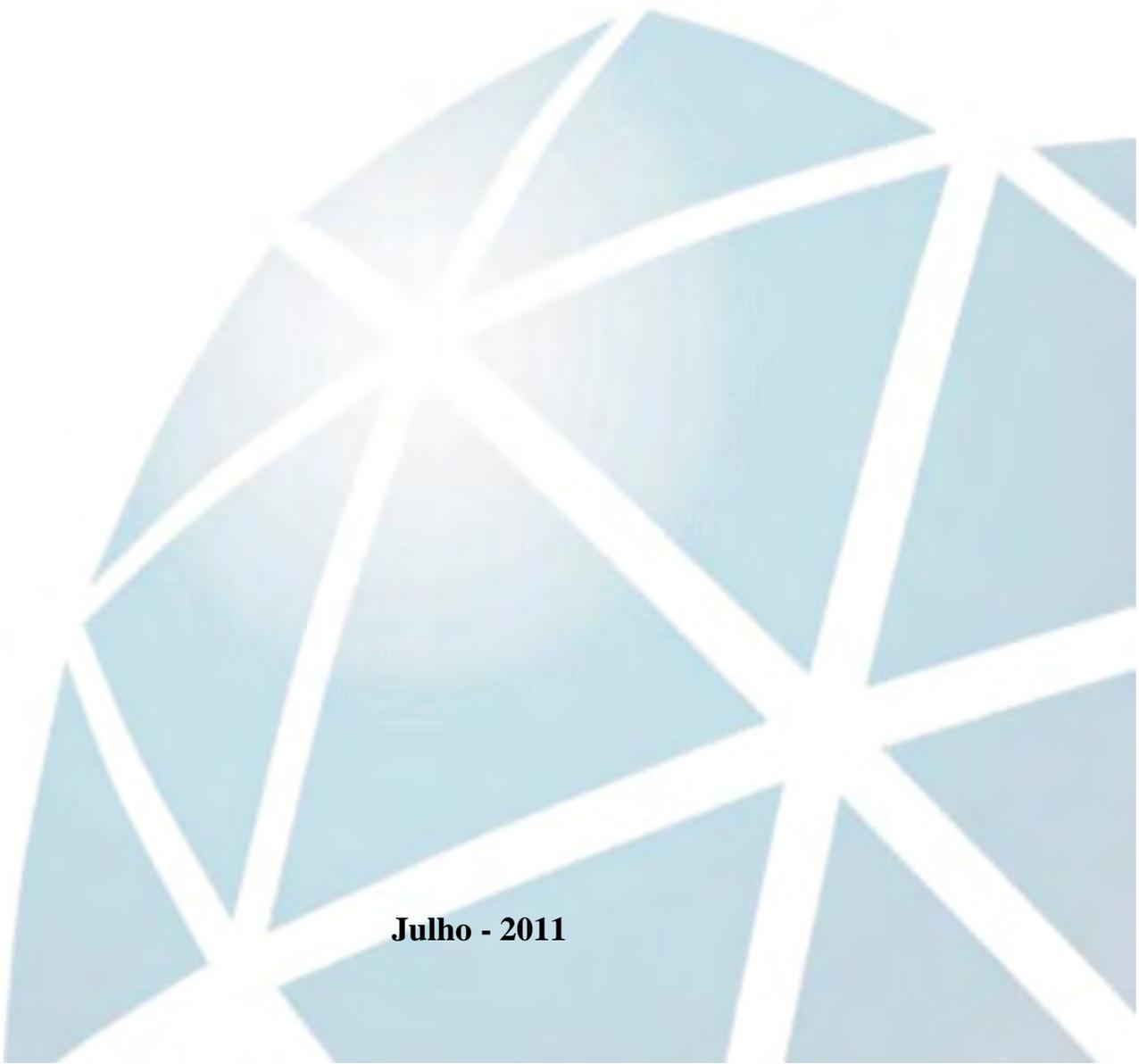

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DE *Polybia
ignobilis* (HYMENOPTERA: VESPIDAE)**

Julho - 2011



PAULA SANCHEZ DE SOUSA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DE
Polybia ignobilis (HYMENOPTERA: VESPIDAE)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Julho - 2011

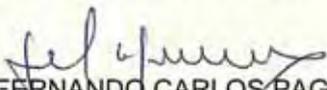
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

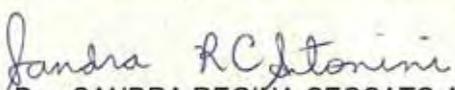
TÍTULO: Isolamento e caracterização de leveduras de *Polybia ignobilis* (Hymenoptera: Vespidae)

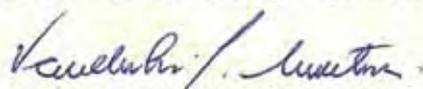
AUTORA: PAULA SANCHEZ DE SOUSA

ORIENTADOR: Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biotecnologia de Rio Claro


Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI
Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de São Carlos


Prof. Dr. VANDERLEI GERALDO MARTINS
CEIS / Unesp - IB - Rio Claro

Data da realização: 29 de abril de 2011.

Aos meus pais, Romeu e Izilda, e aos meus queridos amigos
Dedico...

AGRADECIMENTOS

Agradeço meus pais, Izilda e Romeu por todo apoio desde o começo até o fim do Mestrado, por toda dedicação e por acreditarem junto comigo nesse sonho, por todo o esforço que fizeram e têm feito para que eu me torne uma pessoa realizada. Agradeço meu irmão André que me guiou aos estudos e com seus conselhos centrados sempre me fez ver além do que estava a minha frente, mostrando que com dedicação e esforço conseguimos o que queremos. Agradeço à minha tia e madrinha Rita que sempre foi um porto seguro para mim; com sua paciência me ajudou a colocar planos e anseios em prática, sossegando meus pensamentos em turbilhão. Mais do que uma pessoa da família, sempre foi minha verdadeira amiga.

Ao meu namorado Denis, não tenho palavras para agradecer toda dedicação, paciência e companheirismo; pelos finais de semanas a fio...me acompanhando no laboratório, pelo conforto nas horas de dificuldade, por me fazer rir com qualquer besteira enquanto estava preocupada com alguma “levedura rebelde” ou até mesmo em silêncio, me dar um abraço reconfortante que vale mais do que mil palavras.

Aos meus amigos que sempre torceram pelo meu sucesso, Andrezza, Bruna, Fernanda, que mesmo com a distância e minha ausência, sempre estiveram de alguma forma comigo tentando entender o que é essa tal de microbiologia...rsrs. Agradeço a elas por fazerem da minha volta para casa sempre muito agradável, por me aconselharem e me fazer renovar para a próxima batalha a ser travada durante a semana de trabalho.

Aos amigos que fiz em Rio Claro, Jéssie, meu vizinho dedicado, obrigada por me socorrer quando precisei, pelas risadas, ao meu amigo Denny, agradeço a assessoria mecânica com a máquina de lavar, a me ajudar no laboratório nos finais de semana e também pelas risadas ao longo de tantos dias; aos dois, muito obrigada por me apoiarem sempre.

Aos amigos que fiz no laboratório: Aline Cruz, Ana Paula, Fábio (Ietchi), Noemi, Thais, Ife, Virgínia, Liu, Lídia, Sadala, Dirce, Weilan, Silvio, Mara, Castanha, Tate. Aos agregados Rafael (Paraná), Daiana (Tim). Sem eles tudo seria muito mais difícil. Obrigada pelo companheirismo no laboratório, pelos cafés na cozinha do CEIS, pelas risadas e pelas ajudinhas enquanto eu estava com muito trabalho.

Não posso deixar de agradecer ao amigo, Sebastião Zanão do laboratório de produtos apícolas, que se transformou em conselheiro profissional, por me ajudar com assuntos relacionados à química, conserto dos equipamentos do laboratório e por estar sempre pronto a dar uma opinião otimista.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Wanderlei Martins por toda sabedoria, por me ajudar inclusive nos finais de semana com minhas sequências de DNA, por estar sempre disponível para me ajudar.

Ao Prof. Cláudio José Von Zuben, meus agradecimentos pela atenção e colaboração com a análise dos meus dados.

Agradeço também a oportunidade dada pelo Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, por me passar tantos conhecimentos e por disponibilizar um laboratório equipado para que minha pesquisa fosse desenvolvida. Sem esquecer dos Pós-Docs, Derlene Atilli e André Rodrigues, meu muito obrigada por seus conselhos cheios de experiência.

Em minha busca por novos ninhos de vespas, agradeço imensamente ao Prof. Dr. Osmar Malaspina e Sérgio Pascon.

Por fim, agradeço às agências de fomento e ao CNPq pela bolsa concedida através do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, ao Depto. de Bioquímica e Microbiologia da UNESP de Rio Claro e principalmente ao laboratório de Microbiologia do CEIS.

A todos, meu imenso carinho e gratidão pela contribuição que cada um teve em meu Mestrado e também em minha vida. Com certeza hoje tem um pedacinho de cada um junto comigo que vou levar para sempre com muito orgulho de ter encontrado pessoas tão boas em minha vida.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

Chico Xavier

RESUMO

Polybia ignobilis é uma vespa social que apresenta uma alimentação variável e inespecífica, consumindo outros insetos, pedaços de animais mortos, néctar, polpa de madeira e água. Dentro do ninho ocorre a trofalaxia, onde o alimento é distribuído entre os indivíduos da colônia através de secreção labial, podendo ocorrer entre adulto e larva ou apenas entre adultos, propiciando a dispersão de micro-organismos. A associação entre leveduras e insetos pode ser considerada transitória, onde os insetos podem atuar como vetores na dispersão desses micro-organismos sem benefício nutricional; por outro lado, também pode ser considerada como uma associação benéfica, onde o inseto utiliza as leveduras como complemento alimentar. O presente estudo teve como objetivos: caracterizar a comunidade de leveduras associadas à *P. ignobilis*; verificar se há relação entre a distribuição das leveduras nas diferentes castas da vespa e contribuir com a formação de um banco temático de leveduras isoladas de insetos sociais. Indivíduos do ninho de *P. ignobilis* e amostras de mel foram coletados no campus da UNESP - Rio Claro. O isolamento e identificação das estirpes foi feita de acordo com a metodologia clássica descrita em YARROW (1998). Foram isoladas 167 estirpes, sendo 59 do primeiro ninho e 108 do segundo. Após uma seleção baseada em análises morfológicas, bioquímicas e perfil de bandas de microsátélites (MSP-PCR) estirpes representativas de cada grupo, bem como as estirpes únicas foram identificadas pelo sequenciamento da região D1/D2 do rDNA 26S. Os resultados revelaram a prevalência no primeiro ninho dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora* e *Rhodotorula*, compreendendo 45% do total das estirpes, sendo as espécies mais frequentes *Candida azyma*, *Candida chrysomelidarum*, *Cryptococcus liquefaciens* e *Rhodotorula mucilaginosa*. No segundo ninho, as espécies que prevaleceram foram *Aureobasidium pullulans* e *Meyerozyma guillermondii*.

Algumas estirpes podem se constituir em novas espécies, pois foram encontradas seqüências com identidade inferior a 98% quando comparadas ao banco de dados NCBI-Genbank. Nesses casos, outros genes (ITS) foram sequenciados para a confirmação dos resultados. Aparentemente, não foram encontradas relações entre a ocorrência das estirpes de leveduras e as castas da vespa.

PALAVRAS CHAVE: leveduras, *Polybia ignobilis*, diversidade microbiana.

ABSTRACT

Polybia ignobilis is a social wasp that features a variable and unspecific alimentation, eats other insects, bits of dead animals, nectar, wood pulp and water. Inside the nest occurs trophallaxis, where food is distributed among individuals of the colony through labial secretion, it can occur between adult and larva or adults only, being vectors in the dispersion of micro-organisms. The association between yeasts and insects can be considered temporary, where the insects serve as vectors in the dispersal of these micro-organisms without nutritional benefit; on the other hand, can also be regarded as a beneficial association, where the insect uses the yeasts as a food supplement. This present study aimed to characterize the yeast community associated with *P. ignobilis*; verify whether exists a relation between the distribution of yeasts in different varieties of wasp and contribute to the formation of a thematic database of yeasts isolated from social insects. Individuals from the nest of *P. ignobilis* and honey samples were collected on the campus of UNESP - Rio Claro. The isolation and identification of strains was made according to classical methodology described in YARROW (1998). We isolated 167 strains, 59 and 108 of the first and second nest. After a selection based on morphological, biochemical and microsatellite band profiles (MSP-PCR) representative strains of each group as well as unique strains were identified by sequencing the D1/D2 region of 26S rDNA. The results revealed the prevalence in the first nest of *Candida*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora* and *Rhodotorula*, comprising 45% of all strains, being the most frequent species *Candida azyma*, *Candida chrysomelidarum*, *Cryptococcus liquefaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. In the second nest of the species that prevailed were *Aureobasidium pullulans*, *Meyerozyma guillermondii*. Some strains may constitute new species, because sequences were found with identity less than 98% when compared to the NCBI-Genbank database. In such cases, other genes (ITS) were sequenced for confirmation of the results. Apparently, there was no relationship between the occurrence of yeast strains and varieties of wasp.

KEY WORDS: yeast, *Polybia ignobilis*, microbial diversity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. <i>Polybia ignobilis</i>	11
1.2. Estrutura dos ninhos	11
1.3. Atividade Forrageira.....	12
2. LEVEDURAS	13
2.1. Associações entre insetos e micro-organismos	14
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Amostragem	16
4.2. Isolamento e estocagem das leveduras	18
4.3. Caracterização morfológica e fisiológica das estirpes.....	18
4.4. Análise Molecular	18
4.1.1. Extração de DNA genômico.....	18
4.1.2. Agrupamento das estirpes por MSP-PCR.....	19
4.1.3. Purificação dos produtos de amplificação	19
4.1.4. Preparo das amostras para sequenciamento da região D1/D2	20
4.1.5. Análise das sequências de DNA	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. NOVAS ESPÉCIES	28
6. CONCLUSÕES.....	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
8. APÊNDICE A -Tabela 1.1 – Espécies identificadas no ninho 1.....	40
9. APÊNDICE B - Tabela 1.2 - Relação de leveduras identificadas do ninho 2.....	42
10. APÊNDICE C – Árvore filogenética de W3a2/W7 e estirpes próximas.....	44
11. APÊNDICE D – Árvore filogenética de Larva 5a e estirpes próximas.....	45
12. APÊNDICE E – Árvore filogenética de W12B, B30 e estirpes próximas.....	46
13. APÊNDICE F – Árvore filogenética de MW17a e estirpes próximas	47
14. APÊNDICE G – Árvore filogenética YS3 e MS3 e estirpes próximas.....	48
15. APÊNDICE H – Árvore filogenética YL1a e estirpes próximas.	49
16. APÊNDICE I: Assimilação de compostos de carbono das possíveis novas espécies.....	50
17. APÊNDICE J - Assimilação de compostos de nitrogênio das possíveis novas espécies.....	51
18. APÊNDICE K – Imagens da morfologia da colônia e da célula da estirpe B30	52

19. APÊNDICE L – Imagens da morfologia da colônia e da célula da estirpe larva 5a	53
20. APÊNDICE M – Imagens da morfologia da colônia e da célula da estirpe w3a2	54
21. APÊNDICE N – Imagens da morfologia da colônia e da célula da estirpe w12b	55
22. APÊNDICE O – Imagens da morfologia da colônia e da célula da estirpe w7	56
23. APÊNDICE P – Imagens da morfologia da colônia e da célula da estirpe mw17a	57
24. APÊNDICE Q – Imagem da morfologia da célula das estirpe YS3 e MS3	58

1. INTRODUÇÃO

A ordem Hymenoptera é um dos maiores grupos dentre os insetos, compreendendo as vespas, abelhas e formigas. Possui atualmente cerca de 115.000 espécies descritas, distribuídas em 99 famílias taxonômicas, dentre elas, a Vespidae (SHARKEY, 2007). De acordo com Gaston et al., (1991) a ordem dos Hymenoptera provavelmente constitui quase 10 por cento das espécies. Acredita-se que há entre 300.000 e 3.000.000 de espécies de Hymenoptera; entretanto, Sharkey e colaboradores (2007) estimaram que esse número pode atingir a um milhão.

A Família Vespidae é uma grande e diversificada família de vespas, com cerca de 5.000 espécies, que inclui quase todas as vespas eussociais e muitas das vespas com hábitos solitários (HERMES; KÖHLER, 2004).

De acordo com Carpenter (1993) a família Vespidae é constituída por seis subfamílias monofiléticas (Euparagiinae, Masarinae, Eumeninae, Stenogastrinae, Polistinae, Vespinae), sendo que espécies eussociais ocorrem apenas nas três últimas subfamílias e apenas Masarinae, Eumeninae e Polistinae ocorrem nos Neotrópicos (CARPENTER & MARQUES, 2001).

Pesquisadores que estudaram ambientes temperado e tropicais argumentam que se as espécies de vespas desses locais que ainda não foram estudadas fossem descritas, estas seriam incluídas na família dos Vespidae; assim, a ordem dos Hymenoptera seria mais rica em espécies do que todas as outras ordens (GRISSELL, 1999).

As subfamílias Polistinae e Vespinae são compostas unicamente por espécies eussociais, caracterizadas por apresentarem castas tipicamente distintas, sendo a rainha muito maior que as operárias. Cada colônia de vespas inclui uma rainha e uma determinada quantidade de fêmeas operárias, as quais poderão substituir a rainha em determinadas circunstâncias, como por exemplo, quando há necessidade de mudar rapidamente o local do ninho frente a alguma perturbação (DESUÓ, 2008).

1.1. *Polybia ignobilis*

Polybia ignobilis é uma vespa social pertencente à subfamília Vespinae, havendo registros em toda a América do Sul tropical, desde o Panamá até o Paraguai e Argentina. É comumente encontrada nas áreas rurais do Brasil e em todo o estado de São Paulo. Ela é considerada um bom agente para controle biológico de pragas na agricultura por ser um predador de lepidópteros (GOBBI & MACHADO, 1986). Além da sua importância ambiental, também representa um grupo importante para os estudos da evolução do comportamento social pelo fato de apresentar mais de uma rainha. Tal fato pode contribuir para aumentar o sucesso na propagação da espécie, principalmente no período de multiplicação da colônia por enxameamento. Seu perfil de diferenciação morfológica de castas (operárias, intermediárias e rainhas) (DESUÓ, 2008), pode indicar maior divisão reprodutiva de trabalho e, conseqüentemente, um maior grau de socialidade (BOURKE, 1999) o que evidencia grande flexibilidade adaptativa frente a diferentes situações enfrentadas pela espécie ao longo de seu desenvolvimento (EVANS & WEST-EBERHARD, 1970).

1.2. Estrutura dos ninhos

O comportamento construtor de ninhos em vespas sociais é regido por padrões. Os ninhos de *P. ignobilis* apresentam um ou mais favos envolvidos por uma cobertura denominada envelope (BARRAVIERA, 1994) e estão sempre em lugares abrigados do vento e da chuva, sendo classificados como fragmocítaro caliptódromo. Fragmocítaro refere-se ao fato do favo inicial ser amplamente fixado ao substrato e caliptódromo porque o invólucro protetor está ao redor do favo e em contato com as laterais do mesmo (fig. 1a), e assim, o segundo favo é construído pela adição de células (fig. 1b) na parte inferior do envelope, o qual é expandido, cobrindo o novo favo (CARPENTER; MARQUES, 2001).

O tamanho médio dos ninhos é de 20 cm de altura e 30 cm de base e o acesso se dá por orifícios no invólucro. A cobertura compõe-se de câmaras de 5 mm de espessura com lacunas, dando um aspecto rugoso e ondulado. Normalmente os ninhos são pouco resistentes e piramidais (HÖFLING, 1982).

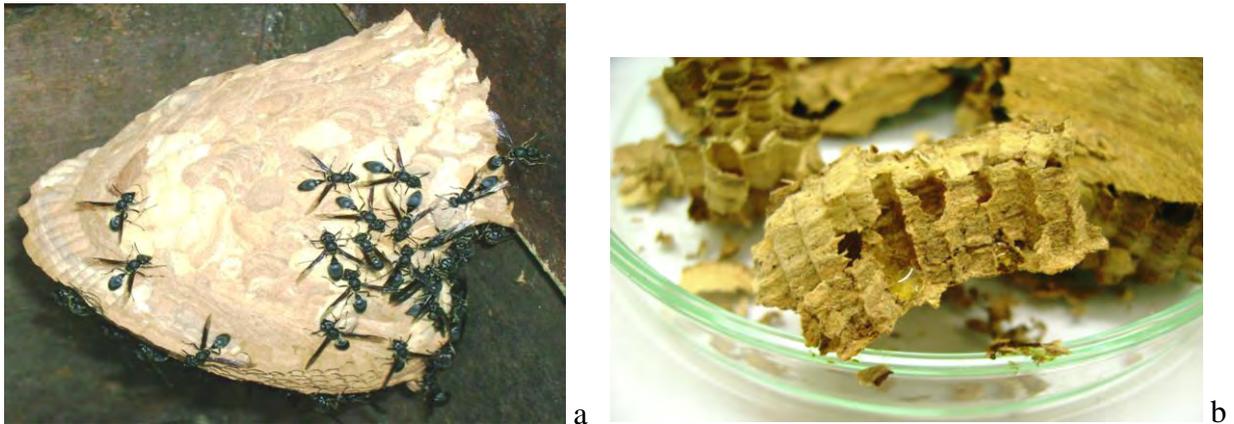


Foto 1: (a) primeiro ninho de *Polybia ignobilis* abrigada em uma caixa de madeira; (b) Foto dos alvéolos internos do ninho 1, nota-se presença de “mel”.

1.3. Atividade Forrageira

A atividade forrageira está intimamente ligada à capacidade de vôo das vespas. Segundo Santos et al., (2000), pode-se estimar que *Polybia occidentalis occidentalis* desenvolve as suas atividades mais eficazmente dentro de um raio de 62 m a partir do ninho. Os mesmos autores indicaram que cada colônia pode forragear uma área de aproximadamente 12.500 m².

Fatores ambientais como intensidade luminosa e temperatura podem promover ou inibir o forrageamento, porém este não se altera em decorrência de chuva fina (HÖFLING, 1982).

O fato das vespas sociais construírem seus ninhos associados a construções humanas confere a elas uma maior chance de sucesso, pois no ambiente urbano ocorre uma grande redução da pressão de predação e há maior oferta de ambientes propícios para construção de ninhos, além de maior proteção em relação às intempéries climáticas (FOWLER, 1983).

A dieta e os materiais utilizados para sua alimentação são variados, compreendendo proteínas (presas de insetos, animais mortos, carnes expostas), carboidratos (néctar, secreção de plantas e afídeos “pulgões”), polpa de madeira, conteúdos celulares e água. (HÖFLING, 1982 e CARPENTER; MARQUES, 2001).

De acordo com GOBBI & MACHADO (1986), observa-se que *P. ignobilis* tem uma alimentação muito variável, semelhante ao observado com *Polybia occidentalis occidentalis* (SANTOS et al., 2000). Esses autores relacionam a não especificidade dos recursos alimentares dessas espécies com a garantia de maior sobrevivência e à maior permanência do ninho por um longo tempo no mesmo local.

Segundo HÖFLING (1982) dentro do ninho ocorre um comportamento chamado de trofalaxis, onde o alimento é distribuído entre os indivíduos da colônia de boca a boca, podendo ser entre adulto e larva ou apenas entre adultos. A glândula labial produz uma secreção atrativa que alimentam as larvas com proteínas, carboidratos, proteases, açúcares, aminoácidos e água.

2. LEVEDURAS

O termo levedura é muitas vezes empregado, de maneira errônea, como sinônimo de fermento, fazendo referência a processos fermentativos de produção de cerveja e de pão, bem como com a espuma formada nesses processos. Por esse motivo as leveduras são frequentemente associadas a fermentações, embora se saiba que cerca de 50% das espécies não são fermentadoras (KURTZMAN & FELL, 1998).

Leveduras são fungos que na maior parte de seu ciclo de vida se apresentam como unicelulares e se reproduzem vegetativamente por brotamento, na maioria das vezes. Muitas espécies podem produzir esporos assexuados e sexuados; nesse último caso não existe um corpo de frutificação. Como fungos, elas são classificadas nos grupos Ascomycota e Basidiomycota (ALMEIDA, 2005), embora ainda persista a denominação “imperfeitas” para aquelas onde não se conhece a reprodução sexuada. Atualmente os estágios sexuados são conhecidos como “teleomorfos” e os assexuados como “anamorfos” (KURTZMAN & FELL, 1998).

Leveduras são encontradas em plantas, exsudatos, água, solo, trato intestinal dos animais e outros substratos naturais, podendo existir associações específicas entre as leveduras e os seus habitats, mas de um modo geral, a associação com plantas representa o habitat mais importante para uma grande variedade de espécies onde os nectários, superfície das folhas e os frutos são considerados habitats ideais para as leveduras por oferecerem nutrientes com alto teor de açúcar (HAGLER, et al.,1995). LACHANCE & STARMER (1998) evidenciam que as leveduras formam comunidades de espécies e não ocorrem ao acaso através da biosfera, selecionando os habitats conforme suas necessidades ecológicas e nutricionais.

Os membros de uma comunidade podem ter nichos diferentes que se sobrepõem em um determinado habitat, dessa forma é importante distinguir entre as espécies encontradas em uma habitat, aqueles que são componentes essenciais da comunidade daqueles que são transitórios ou estão presentes por acaso; da mesma forma, espécies de leveduras que

sobrevivem em um nicho amplo ocupam diversos habitats e são consideradas como generalistas (LACHANCE; STARMER, 1998).

2.1. Associações entre insetos e micro-organismos

Segundo ROSA; PÉTER (2006), o solo é o repositório para materiais orgânicos e inorgânicos e constitui um meio favorável para a manutenção e desenvolvimento de certas espécies de leveduras, sendo os insetos os mais importantes vetores desses micro-organismos na natureza. Dessa maneira, micro-organismos e insetos podem manter algumas associações mutualísticas estáveis, onde ocorrem adaptações de ambas as partes, que facilitam a perpetuação desta associação e promovem relações de interdependência (ERTHAL JUNIOR; SILVA; SAMUELS, 2007). Nessas associações, os fungos, além de encontrarem um ambiente adequado para o seu desenvolvimento, também são favorecidos com recursos nutricionais, umidade e ausência de competidores. Além disso, podem ter a sua propagação facilitada e promovida pelos insetos. Em alguns casos os insetos utilizam os fungos não apenas como fonte nutricional, mas também para a aquisição de enzimas digestivas que ficam ativas em seus intestinos, contribuindo para a degradação de polímeros de plantas. Estas associações foram descritas nas ordens Isopoda, Homoptera, Coleoptera, Díptera e Hymenoptera (Vespidae e Formicidae) (ERTHAL JUNIOR; SILVA; SAMUELS, 2007).

A associação entre leveduras e insetos pode ser considerada uma relação puramente mecânica, onde os insetos servem como vetores na sua dispersão sem nenhum benefício nutricional, ou como uma associação benéfica, onde o inseto não somente age como vetor mas também se beneficia das leveduras como complemento alimentar (ROSA; PÉTER, 2006).

Segundo Morais & Rosa (2000), leveduras e drosófilas formam uma associação mutualística, onde os micro-organismos são fonte de nutrientes para adultos e larvas das moscas; por outro lado, de uma forma mecânica, as moscas dispersam as leveduras entre os diferentes microhabitats. Larvas e adultos de drosófilas apresentam, na maioria das vezes, forrageamento seletivo com preferência por uma ou mais espécies de leveduras.

Com relação aos micro-organismos associados ao mel produzido por *Apis mellifera*, as atenções geralmente são voltadas apenas para os prejuízos que os micro-organismos podem trazer para a colônia e para a produção do mel, porém, Gillian (1997), argumenta sobre os benefícios da microbiota não patogênica (leveduras, bactérias, fungos filamentosos), onde essa microbiota contribui para o desenvolvimento da colônia das abelhas.

Assim como nas vespas, a microbiota das abelhas é adquirida durante o forrageamento. Dentro da colméia, esses micro-organismos são selecionados pelas abelhas operárias, a fim de não prejudicarem o equilíbrio da colônia (GILLIAN, 1997).

Suh et. al. (2005) encontraram uma diversidade muito alta de leveduras (cerca de 650 espécies) no trato intestinal de diversas (27) famílias de besouros. Observou-se que aproximadamente 200 espécies desses isolados eram espécies ainda não descritas.

Um estudo sobre a dispersão de microfungos filamentosos e leveduras por formigas Attini na natureza foi recentemente publicado (PAGNOCCA et al., 2008), porém, não há relatos específicos na literatura sobre o papel das vespas nessa atividade. Estudos como esse mostram a importância de se realizar pesquisas com insetos, pois eles são importantes para o estudo ecológico de leveduras.

Considerando-se a diversidade de forrageamento, o hábito da trofalaxis, a ampla distribuição da vespa *P. ignobilis*, bem como a escassez de informações sobre a dispersão de micro-organismos que ela pode promover, torna-se importante estudar este último aspecto tendo como foco as leveduras.

3. OBJETIVOS

1. Caracterizar a comunidade de leveduras associadas à vespa *Polybia ignobilis*.
2. Verificar a distribuição das leveduras nos diferentes estágios de desenvolvimento da vespa e também em amostras de “mel”.
3. Constituir e manter um banco temático de leveduras associadas a esses insetos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Dois ninhos foram coletados em duas cidades distintas: o primeiro foi coletado em março de 2008 no biotério do campus da UNESP – Rio Claro situado a $22^{\circ}23'49.13''\text{S}$; $47^{\circ}32'36.87''\text{O}$, e o segundo ninho foi coletado em outubro de 2009, proveniente da refinaria da REPLAN (Paulínia –SP) $22^{\circ}43'51.40''\text{S}$; $47^{\circ}06'40.64''\text{O}$,

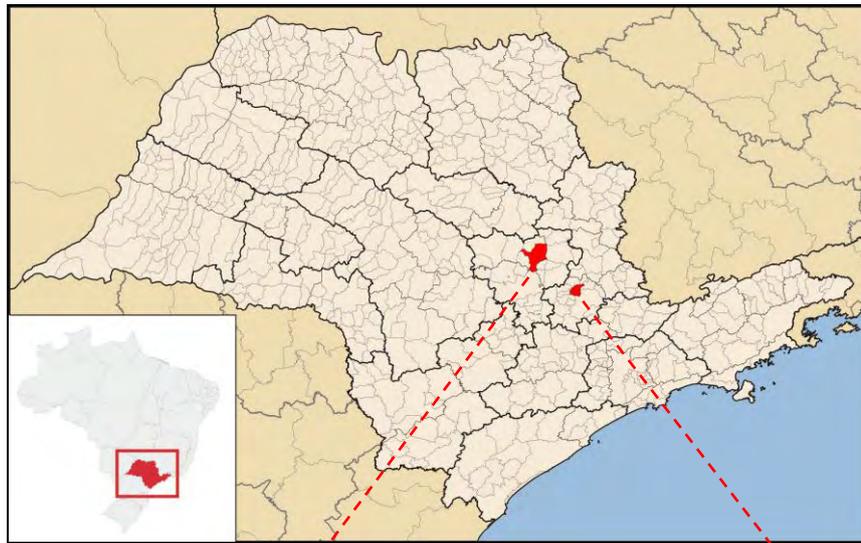


Imagem 1: área de coleta dos ninho estado SP (a) 1° na cidade de Rio Claro (b) e 2° na cidade de Paulínia (c) (fonte: adaptado de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/65/SaoPaulo_Municip_Paulinia.svg, b, c Google earth).

Após a captura que ocorreu utilizando sacos plásticos esterilizados, os ninhos foram colocados em freezer a -20°C por aproximadamente 5 minutos para facilitar a manipulação.

A abertura dos ninhos foi feita em laboratório com a máxima assepsia e indivíduos de diversos estágios de desenvolvimento foram retirados dos alvéolos de forma aleatória com auxílio de uma pinça estéril. Amostras de “méis” também foram obtidas com auxílio de uma alça de inoculação estéril.

Para o isolamento das estirpes, foram utilizados os meios sólidos YMA (Yeast Malt Agar) e MYP (Malt Yeast Peptone Agar) além do meio YMB (Yeast Malt Broth), todos adicionados de $10\text{ mg}\cdot 100\text{ ml}^{-1}$ de cloranfenicol e pH ajustado para 4,0 (YARROW, 1998).

As estirpes foram amostradas e codificadas segundo a origem, a saber: W, B, S, PU, LA, RE e M. Assim:

W: colônias obtidas após a vespa adulta ter caminhado sobre a superfície do meio de cultura.

As pupas (**PU**) e larvas (**LA**) foram colocadas isoladamente na superfície dos meios MYP e YMA e roladas cuidadosamente, a fim de se isolar eventuais leveduras presentes na superfície externa de seus corpos. Os indivíduos **RE** (recém-emergidos) foram colocados para andar nas placas contendo os meios sólidos supracitados. As amostras de “mel” (**M**) foram retiradas aleatoriamente dos alvéolos, com o auxílio de uma alça de inoculação e semeadas nos meios MYP e YMA.

O meio líquido foi utilizado para indivíduos mergulhados e esmagados em YMB da seguinte forma:

B: indivíduos adultos foram mergulhados em tubos contendo 5,0 ml de YMB, pH 4,0, cloranfenicol e incubados a 25°C por 48hs (YARROW, 1998). Os tubos com as vespas imersas foram monitorados por 7 dias. Sinais de turvação do meio foram considerados presuntivamente positivos. Após confirmação microscópica da presença de leveduras, seguiu-se a metodologia padrão de isolamento, recuperando o meio líquido com auxílio de alças de inoculação e o mesmo foi semeado em meio sólido.

S: colônias obtidas após esmagamento dos indivíduos adultos, com auxílio de um bastão de vidro previamente esterilizado, dentro de um tubo contendo YMB, pH 4.0 + antibiótico. As vespas foram tratadas previamente com solução desinfetante de etanol 70% por 1 minuto, água sanitária por 2 minutos, etanol 70% por 30 segundos e uma lavagem final com água destilada para uma desinfecção externa (COLLADO; PLATAS; PELÁEZ, 1996). Pretendeu-se com o esmagamento verificar a ocorrência de leveduras nas partes internas do corpo do inseto. Alíquotas dessas suspensões também foram semeadas em placas de Petri.

4.2. Isolamento e estocagem das leveduras

As placas foram incubadas a 22°C no escuro e monitoradas diariamente para isolamento das colônias, as quais foram selecionadas com base em seus diferentes morfotipos. Usando o critério de semelhança morfológica, dessa forma, foram coletadas 4 colônias por placa enquanto que as de morfologia única foram todas coletadas. Após codificação, foram estocadas em meio Gymp a 4° C e também preservadas em glicerol 15% a -80°C. (CBS, 2009).

4.3. Caracterização morfológica e fisiológica das estirpes

As estirpes foram classificadas quanto à aparência da colônia, morfologia celular e através de testes fisiológicos, utilizando metodologia descrita em BARNETT et al., (2000) e Yarrow (1998). Foi utilizada também a chave disponibilizada na página eletrônica do Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), disponível em <http://www.cbs.knaw.nl/>.

Com base nessas análises as estirpes foram reunidas em grupos semelhantes. Representantes desses grupos foram utilizados nas etapas seguintes, visando à identificação taxonômica, baseada em técnicas moleculares.

4.4. Análise Molecular

4.1.1. Extração de DNA genômico

O DNA genômico de cada isolado foi extraído seguindo a metodologia de Sampaio et al., (2001): duas alçadas da levedura cultivada em meio YMA por 48 h a 25°C foram suspendidas em 500 µl do tampão de lise TNES (50 mmol Tris l⁻¹; 250 mmol de NaCl l⁻¹; 50 mmol EDTA l⁻¹; 0,3%, w/v, SDS; pH 8) e o equivalente a 200 µl de micro-esferas de vidro (Sigma-Aldrich ®, 425 – 600µm de diâmetro) esterilizadas foram adicionadas. Em seguida, foram levadas ao vórtex por 4 minutos e os tubos foram incubados por 1 hora a 65°C, repetindo esse procedimento duas vezes. A suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante (~400 µl), o qual contém o DNA genômico bruto, o qual foi separado e armazenado a -20° C. Antes do congelamento, o sucesso da extração do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,0%. Após a corrida do gel, este foi corado

em uma solução de brometo de etídeo diluído em TBE 1X por, aproximadamente, 15 minutos, e então, o gel foi fotografado com auxílio do software Vision WorksLS.

4.1.2. Agrupamento das estirpes por MSP-PCR

Estirpes representantes dos vários agrupamentos realizados com base nas características fenotípicas e bioquímicas foram utilizadas para um segundo agrupamento através do método de “fingerprinting” utilizando microsátélites (MSP-PCR) (modificado de Meyer et al., (1993).

Nesta etapa, mistura-se 4,0µL de dNTPs (1,25 nM), 2,5µL de Buffer 10X, 1,0µL de MgCl₂ (50mM), 0,2µL de Taq (5U/ µL), 10,3µL de H₂O purificada para PCR, 2,0µL de GTC(5x) – 10µM; 5,0µL de DNA (1:750). A amplificação foi realizada no termociclador (PTC-100TM Programmable Thermal Controller), com a seguinte programação: 95°C por 3 min, 93°C – 45s-40 ciclos, 50°C – 1 min, 72°C – 1min, 72°C – 6min, 10°C - ∞. Para verificar o padrão de bandas, foi realizada uma corrida em gel de agarose 1,4% em TBE 0.5X a 90V e 50 mA por 3 horas. Em seguida, o gel foi corado por 25 minutos em uma solução de Brometo de Etídeo e descorado na sequência por 5 minutos. Após esta etapa foi possível reavaliar e reagrupar os isolados. Os agrupamentos anteriores foram confirmados ou redistribuídos. A partir desse segundo agrupamento, foram selecionadas estirpes representantes de cada grupo para o seqüenciamento da região D1/D2 da subunidade maior (26S) do rDNA (KURTZMAN & ROBNETT, 1998). O mesmo procedimento foi aplicado às estirpes únicas ou que não foram agrupadas nas etapas anteriores.

4.1.3. Purificação dos produtos de amplificação

Usando o kit de purificação de DNA (*GFX PCR DNA and gel band purification kit* - GE Healthcare), As colunas de purificação foram colocadas nos tubos coletores previamente identificados com os códigos das amostras. Posteriormente foram pipetados nas colunas 350 µL da solução “Capture Buffer” type 3 e adicionados 150 µL da solução “Capture Buffer” type 3 nos microtubos com o DNA amplificado. Todo o volume da coluna de purificação foi transferido, misturado e centrifugado por 30 segundos a 13.000 rpm. O líquido filtrado foi descartado e a coluna recolocada no tubo coletor onde o DNA fica retido. Em seguida foram adicionados 500 µL da solução “Wash Buffer” type 1 no centro de cada coluna, centrifugado por 30 segundos a 13000 rpm e a coluna transferida para um tubo eppendorf de 1,5 ml

(previamente identificado). Foram adicionados 25 – 30 μL de “Elution buffer type 6”, incubado por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugado por 1 minuto a 13.000 rpm. Posteriormente, as colunas foram removidas e o DNA purificado armazenado a -20°C .

A eficácia da purificação foi confirmada em um gel de agarose 1% (em TBE 1X), juntamente com o marcador “DNA Ladder 1 kb” (utilizando 5 μL do Ladder) e o DNA purificado foi quantificado no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) procurando manter a quantidade de DNA entre 5-20 ng, adequada para o sequenciamento de fragmentos de 500 - 1000pb.

4.1.4. Preparo das amostras para sequenciamento da região D1/D2

A amplificação por reação de PCR foi realizada usando os iniciadores forward (NL1) e reverse (NL4), conforme descrito em Inácio et al., (2005). Para confirmar a presença e tamanho do fragmento de DNA, os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% (em TBE 1X).

As seqüências foram obtidas com o equipamento ABI 3130 (Applied Biosystems).

Para a reação de sequenciamento foram utilizados os seguintes reagentes (por amostra): 1,75 μL de Save Money, 0,5 μL primer NL1 (3 pmol), 0,5 μL primer NL4 (3 pmol), 20 ng DNA purificado; 5,65 μL de água Milli-Q esterilizada, 0,5 μL de Big DYE, com volume final de 10,0 μL . Em seguida o material foi levado ao termociclador (PTC-100TM Programmable Thermal Controller), com a seguinte programação: $96^{\circ}\text{C} - 2\text{min}$, $96^{\circ}\text{C} - 45\text{s} - 28\text{ciclos}$, $50^{\circ}\text{C} - 30\text{s}$, $60^{\circ}\text{C} - 4\text{min}$, $10^{\circ}\text{C} - \infty$.

Para a purificação da reação de sequenciamento, foram adicionados 1 μL de acetato de sódio (1,5M), 1 μL de EDTA 125mM, 25 μL de etanol 100% e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos, no escuro. (Adaptado do manual de instruções: DYEnamicTM ET Dye Terminator Kit - GE Healthcare).

As amostras foram centrifugadas por 25 min a 15.000g para a formação do “pellet” de DNA, o líquido sobrenadante foi removido invertendo o tubo e também com auxílio de uma ponteira estéril (capilaridade). Posteriormente, foram adicionados 35 μL de etanol 70% para lavar o “pellet”. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 15.000g, o sobrenadante removido e os tubos foram levados ao SpeedVac (10-15 min) para secar o “pellet” de DNA, deixando os tubos abertos.

As amostras foram ressuspensas em formamida Hi-DiTM Applied Biosystems para aplicar na placa do sequenciador.

4.1.5. Análise das sequências de DNA

As sequências “consenso” dos fragmentos de DNA sequenciados foram geradas, utilizando o programa Bioedit v.7.0.5.3 e comparadas com as homólogas obtidas do banco de dados do GenBank/NCBI através da ferramenta de busca BLASTn disponível no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Sequências apresentando 99% de similaridade foram consideradas co-específicas enquanto que aquelas cuja similaridade foi menor ou igual a 98% foram analisadas também quanto ao segmento ITS, pois quando as sequências apresentam similaridade $\leq 98\%$, considera-se que há grande probabilidade de ser uma espécie ainda não descrita. Nesses casos, esta deverá ser descrita segundo os padrões internacionais estabelecidos, o que implica numa descrição detalhada abordando características morfológicas coloniais e celulares, perfil fisiológico/nutricional, além das análises genéticas (moleculares) pertinentes. Deve-se também incluir uma análise filogenética para mostrar onde a espécie que está sendo descrita se acomoda.

As sequências consenso das prováveis espécies novas encontradas neste trabalho foram comparadas com aquelas mais próximas recuperadas do GenBank através da ferramenta BLASTn, as quais foram editadas no software BioEdit e em seguida analisadas utilizando-se o software PAUP versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) as quais foram inferidas utilizando o algoritmo Neighbor-joining com modelo de substituição Kimura 2-parâmetros (KIMURA,1980), com suporte de valores de bootstrap de 1000 pseudo-réplicas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do primeiro ninho foram isoladas 59 leveduras, listadas na tabela 1.1 (Apêndice A), cujas origens foram: 20 de indivíduos adultos (W); 9 recuperadas de meio líquido (B); 8 após esmagamento (S); 3 das larvas (L); 3 de pupas (P); 5 de recém-emergidos (RE) e 11 de “méis” (M). Destas, 70,7% são ascomicetas e 29,3% são basidiomicetas. O gênero *Rhodotorula* foi predominante, seguido por *Candida*, *Cryptococcus* e *Metschnikowia*.

Parte das espécies de leveduras com afinidade basidiomicética possui um potencial assimilativo amplo com relação às fontes de carbono quando comparada com as leveduras com afinidade ascomicética, que se restringem a poucas fontes de carbono (KURTZMAN & FELL, 1998). Estas são frequentemente encontradas em substratos ou fontes ricas em açúcares simples, como frutos, enquanto que as leveduras basidiomicéticas são ricamente encontradas em substratos que possuam componentes mais complexos, como folhas e solo (Santos *et al.*, 1997).

As leveduras basidiomicéticas possuem algumas características que favorecem a permanência na superfície de folhas, tais como produção de clamidósporos resistentes à dessecação e a de balitosporos. Entre os gêneros de leveduras basidiomicéticas comumente encontradas associados ao filoplano das plantas pode-se destacar *Cryptotoccus* e *Rhodotorula* (LANDELL, 2006). Tais dados confirmam a tendência de termos encontrado grande parte das leveduras ascomicéticas, possivelmente pelo fato das leveduras serem isoladas de um ninho onde as vespas forrageiam no ambiente e em nectários, abundantes em fontes de açúcares simples.

Das vespas que caminharam sobre a superfície dos meios (W), houve prevalência de *Meyerozyma guilliermondii* (n=5), seguida de *Candida chrysomelidarum* (n=3). Nas amostras “B” que foram mergulhadas em meio líquido, prevaleceram as espécies *Candida cf. azyma* (n=3) e *Candida chrysomelidarum* (n=2), enquanto que, nas amostras que foram esmagadas “S”, houve prevalência de *Candida cf. azyma* (n=3) seguida de *Hanseniaspora opuntiae* (n=2). Nos estágios iniciais de desenvolvimento dos indivíduos (“L”, “P”, “RE”), houve predominância acentuada de *Rhodotorula mucilaginosa*, sendo em larvas (n=2), em R. emergidas e pupas (n=3). Em amostras de mel *Rhodotorula mucilaginosa* também foi predominante (n=4) seguida de *Candida chrysomelidarum* (n=3) (Tabela1).

Tabela 1 – Espécies de leveduras segundo a origem

Espécies	Ninho														Total
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
	W*		B*		S*		RE*	P*		L*		M*			
<i>Aureobasidium pullulans</i>		7		2		4						1	8	22	
<i>Aureobasidium</i> sp						2						1		3	
<i>Candida</i> sp		2	1			2				1				6	
<i>Candida</i> cf. <i>azyma</i>	1		3		3		1							8	
<i>Candida chrysolidarum</i>	3		2									3		8	
<i>Candida haemulonii</i>				1										1	
<i>Candida kofuensis</i>						1								1	
<i>Candida apícola</i>			1											1	
<i>Candida</i> cf. <i>apícola</i>							1					1		2	
<i>Coniocheta</i> sp	2													2	
<i>Cryptococcus luteolus</i>		4				1					2		4	11	
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>				5							1			6	
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	1											2		3	
<i>Cryptococcus</i> sp				1		1					1			3	
<i>Cryptococcus flavescens</i>						2								2	
<i>Cryptococcus</i> aff. <i>laurentii</i>		1												1	
<i>Filobasidium floriforme</i>													1	1	
<i>Geotrichum fragrans</i>						1								1	
<i>Hanseniaspora vineae</i>						9								9	
<i>Hanseniaspora</i> sp						1								1	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>						1	4							5	
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	2													2	
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>					2									2	
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	2		1											3	
<i>Metschnikowia koreensis</i>	1													1	
<i>Moniliella suaveolens</i> var. <i>suaveolens</i>			1											1	
<i>Occultifur externus</i> (anamorfo <i>rhodotorula</i>)		1												1	
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	5	2		7		6					6		7	33	
<i>Pichia caribbica</i>				1										1	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1					1	3	3		2		4		14	
<i>Rhodotorula</i> sp						1								1	
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>					1									1	
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	1													1	
<i>Sporisorium bursum</i>	1													1	
<i>Starmerella</i> cf. <i>bombicola</i>		1												1	
<i>Starmerella meliponinorum</i>				2										2	
<i>Symbiotaphrina kochii</i>		1												1	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>						3								3	
<i>Togninia vibratilis</i>				1										1	
Total	20	19	9	20	8	38	5	0	3	0	3	10	12	20	167

Legenda: *Sendo W e RE indivíduos que andaram em meio sólido, B indivíduos mergulhados em meio líquido, S indivíduos que foram esmagados em meio líquido, P e L indivíduos rolados em meio sólido e M, amostras de mel que foram estriadas em meio sólido.

Um dos gêneros mais frequentes no ninho 1 foi *Candida*, representado por *Candida* cf *azyma* e *Candida chrysomelidarum*. A espécie *C. azyma* foi recentemente descrita a partir de filoplano de *Cyclobalanopsis championii*, planta encontrada nas montanhas de Taiwan (YANG; WANG, 2003), no rizoplano de cana-de-açúcar no Rio de Janeiro (RIBEIRO, 2009) e também foi isolada de frutos de pimenta malagueta apresentando antagonismo ao fungo parasita (*Colletotrichum capsici*) da pimenta (CHANCHAICHAOVIVAT; RUENWONGSA; PANIJPAN, 2007). O mesmo acontece com *C. chrysomelidarum* que foi isolada somente a partir do intestino de adultos de um inseto (crisomelídeos) do Panamá (RAMÍREZ & GONZÁLES, 1984). Por estar associada a plantas e outros insetos, possivelmente a *C. chrysomelidarum* foi transportada para o ninho após contato com vespas durante o forrageamento.

Foram encontradas seis representantes de *Cryptococcus rajasthanensis*, espécie descrita recentemente e que recebeu esse nome por ter sido isolada de flores e folhas de *Eucalyptus* pela primeira vez no estado de Rajasthan, Índia. Essa levedura foi encontrada apenas no segundo ninho e a partir do corpo dos indivíduos “B” (SALUJA; PRASAD, 2007). Assim como a *C. azyma* e *C. chrysomelidarum*, tudo indica que foi carregada ocasionalmente para dentro do ninho.

As baixas concentrações de nitrogênio, característica de nectários (NICOLSON et al., 2007) e a habilidade de algumas espécies em tolerar altas pressões osmóticas é uma forma de selecioná-las em um substrato específico (HERRERA et al., 2010). Assim, espécies como *Metschnikowia reukaufii* e *Metschnikowia gruessii*, foram abundantes em amostras de néctar de abelhas *Bombus* da Europa Central. Segundo Nozaki et al., 2003, *Metschnikowia reukaufii* é capaz de produzir grandes quantidades de arabitól quando sujeita a stress osmótico, sendo este composto, essencial para a regulação osmótica em leveduras (Grant 2004). Entretanto, em nosso trabalho isolamos apenas 3 estirpes de *Metschnikowia reukaufii* e ainda dos indivíduos (adultos W e B do primeiro ninho) e não do substrato açucarado.

Do segundo ninho foram isoladas 108 leveduras, listadas na tabela 1.2 (Apêndice B), sendo 75% ascomicetas e 25% basideomicetas. As estirpes estavam distribuídas da seguinte maneira: 19 de indivíduos adultos “W”, 20 foram recuperadas de meio líquido “B”, 38 obtidas pós esmagamento “S”, 10 das larvas “L” e 21 de “méis” “M”. Deste ninho, que aparentava ser mais velho, não foi possível coletar amostras de pupas e de recém-emergidas.

Das vespas que caminharam em meio sólido, houve prevalência de *Aureobasidium pullulans* (n=7) seguida de *Cryptococcus luteolus* (n=4). Nas amostras “B”, prevaleceram as espécies *Cryptococcus rajasthanensis* (n=5) e *Meyerozyma guilliermondii* (n=7) enquanto que

nas “S”, houve prevalência de *Hanseniaspora vineae* (n=9) e *Meyerozyma guilliermondii* (n=6). Nas amostras “L” houve prevalência de *Meyerozyma guilliermondii* (n=6) seguido de *Cryptococcus luteolus* (n=2).

Hanseniaspora guilliermondii é uma levedura apiculada frequentemente encontrada na fase inicial da fermentação de frutos em geral, sendo que a fermentação espontânea da uva para produção de vinho se dá por uma sucessão de populações de leveduras, caracterizada por uma fase inicial com o crescimento de determinadas leveduras, inclusive a *H. guilliermondii*, *H. uvarum* e *H. vineae*.

Ao contrário do esperado, No presente trabalho foram encontradas apenas três estirpes de *Hanseniaspora*, todas do primeiro ninho o que consideramos uma frequência muito baixa pois as vespas estão constantemente usando os frutos para o forrageamento.

Um dado que chamou nossa atenção foi a ausência de *Cryptococcus laurentii* no ninho 1 bem como a baixa ocorrência de *C. liquefaciens*. Esse gênero é um dos mais abundantes na natureza e essa prevalência se dá, possivelmente, pela presença de uma cápsula protetora que permite resistência a condições adversas do ambiente, como escassez de nutrientes e períodos de seca (GATES; THORKILDSON; KOZEL, 2004). Além disso, essas leveduras também são altamente heterogêneas em relação às habilidades nutricionais, permitindo a utilização aeróbica de uma ampla diversidade de compostos orgânicos (RHODE, 2005). *C. laurentii* ocorre também com frequência em pastos, savanas, solos úmidos e ricos em nutrientes, porém também são encontradas em solos pobres em material orgânico e com baixa umidade (SPENCER; SPENCER, 1997).

Segundo Barnett et al. (2000), a descrição do *C. luteolus* foi feita a partir de amostras do filoplano de plantas do Japão e lama ácida na Holanda. Esta espécie foi encontrada com onze representantes no segundo ninho, porém pouco se sabe sobre ela.

Segundo Valarini et al. (2007) *Aureobasidium*, *Cryptococcus* e *Candida* constituem gêneros característicos de ambientes degradados. A presença desses gêneros em abundância no segundo ninho sugere que o ambiente do entorno encontrava-se alterado, o que de fato pode justificar a presença da *Symbiotaphrina kochii* no ninho 2. Esta espécie pode se associar com o coleóptero *Lasioderma serricorne* e auxiliá-lo a utilizar farinha de trigo contaminada com resíduos químicos (MAHROOF e PHILLIPS, 2007). Os mesmos autores discutem que *S. kochii* pode converter aleloquímicos em fontes de carbono que o inseto pode utilizar como alimento.

O ambiente próximo aos ninhos condiciona a qualidade do substrato utilizado para forrageamento dos insetos e, assim, a biodiversidade das populações de leveduras que ai se

desenvolvem (LANDELL, 2006). Este ninho foi coletado nas dependências da refinaria de petróleo de Paulínia, SP, município onde situam-se importantes indústrias químicas e de papel o que pode ter contribuído para as variações quantitativas e qualitativas observadas em comparação com o ninho 1.

A espécie mais encontrada no ninho 2 e também considerando-se o total das estirpes, foi *Aureobasidium pullulans* que é um fungo dimórfico amplamente distribuído no ambiente. É saprófita e encontra-se frequentemente na filosfera, podendo tolerar ambientes extremos, tais como água hipersalina e geleira. *A. pullulans* é de grande importância biotecnológica pela capacidade de produção de polissacarídeos extracelularmente; esta espécie é também conhecida por ser um patógeno humano que pode causar infecções sistêmicas (GOSTINCAR et al., 2008). Em pessegueiro, *A. pullulans* causa danos à colheita como a podridão parda (MOREIRA et al., 2002). É também um patógeno floral de *Eupatorium*, uma erva daninha; o *A. pullulans* causa má formação e esterilidade das sementes do *Eupatorium*, prejudicando assim a disseminação dessa erva nas plantações, podendo ser usado para controle da erva daninha no campo (PRASHANTHI; KULKARNI, 2005).

De acordo com BETTIOL et al. (2009) e DROBY et al. (2009), diversas leveduras (*Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus albidus* e *Metschnikowia fructicola*) são registradas, em muitos países, como agentes de biocontrole de fitopatógenos (*Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Sclerotinia* e *Erwinia amylovora*). As leveduras agem principalmente por competição de nutrientes e indução de resistência (FIALHO, 2004; ZANARDO et al., 2009). Por serem eficientes colonizadoras de superfícies foliares, são capazes de consumir nutrientes mais rapidamente do que os fungos fitopatogênicos (DROBY & CHALUTZ, 1994). De acordo com Castoria et al. (1997), além da competição por nutrientes, as leveduras interagem diretamente com as hifas fúngicas e produzem enzimas líticas da parede celular.

Segundo Kurtzman & Fell (2010), *Pichia guilliermondii* a espécie encontrada em maior número no ninho 2 foi reclassificada e agora pertence ao gênero *Meyerozyma*, portanto o novo nome de *Pichia guilliermondii* é *Meyerozyma guilliermondii*. Esta espécie de levedura está amplamente distribuída na natureza sendo encontrada em exudatos de árvores, insetos (ARAÚJO et al., 1995), solo, plantas, atmosfera e água do mar; além disso, é comumente isolada de amostras clínicas e relacionada à doenças como otites, endocardites e infecções articulares (MARTINI et al., 2005). O gênero *Pichia* tem sido observado constantemente em associação com insetos, podendo ser encontrado no interior do corpo e no intestino de moscas (*Drosophila* sp e *Suilla* sp), tesourinhas (*Labidura* sp), abelhas (*Andrena* sp) e formigas (*Iridomyrmex humilis*), coletados em áreas agrícolas na Itália (ZACCHI; VAUGHAN-

MARTINI, 2002). Num levantamento de leveduras associadas com ninhos da formiga *A. sexdens*, Carreiro et al., (1997) encontraram *Pichia guilliermondii* como espécie dominante.

Essa forte interação entre diferentes espécies de *Pichia* com insetos é possivelmente facilitada pela presença de ascósporos com formatos redondos, hemisféricos ou em forma de chapéu, o que pode auxiliar na dispersão do esporo pelos insetos (SPALAFORA, 2002).

A prevalência de *Rhodotorula mucilaginosa* nos indivíduos na fase de desenvolvimento inicial, como pupas, larvas, recém emergidas e também nos “méis” pode estar relacionada com o alimento fornecido para a prole. Segundo Jeanne (1972), os ovos são colocados nas células que contém pequenas gotas de “mel” que servirão como primeira alimentação da larva. Em alguns casos, porém, esse alimento poderá ser fornecido à larva por trofalaxis, intermediado por um indivíduo adulto.

Aksu e Eren (2005) destacaram a capacidade de adaptação da *R. mucilaginosa* em grande variedade de fontes de carbono complexas, como: resíduos industriais e agrícolas; melação de beterraba, sacarina e soro de leite. Sendo esta uma espécie que produz pigmentos carotenóides, faz com que este seja um dos micro-organismos mais promissores para a produção comercial desses pigmentos. Considerando que os animais necessitam adquirir carotenóides através da alimentação, podemos pensar que a presença maciça desta espécie pode ser benéfica nesta fase de desenvolvimento dos indivíduos. Entretanto, considerando a flexibilidade metabólica de *R. mucilaginosa*, não podemos excluir a possibilidade da mesma ter encontrado neste microhabitat um substrato propício para sua sobrevivência e multiplicação, sem que isso resulte em benefício para a colônia.

Outras espécies como *Togninia vibratilis*, *Torulaspora delbrueckii* e *Starmerella cf. bombicola* foram encontradas nos ninhos, porém, por estarem distribuídas unicamente nos indivíduos que mais forrageiam (W, B e S), deduz-se que elas foram carreadas ocasionalmente até o ninho.

Em amostras de mel, no primeiro ninho, *Rhodotorula mucilaginosa* foi prevalente (n=4) seguida de *Candida chrysomelidarum* (n=3). No segundo ninho a espécie de levedura isolada com maior frequência foi *Aureobasidium pullulans* (n=8), junto com *Meyerozyma guilliermondii* (n=7) e *Cryptococcus luteolus* (n=4).

Entende-se por mel a substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do néctar ou das secreções de plantas. A composição do mel é variável e depende da fonte floral usada na coleta do néctar, do clima, das condições ambientais e sazonais (PEREIRA, 2008).

Sendo assim, devido ao pioneirismo do nosso trabalho com esta espécie de vespa e, por extensão, com os habitats por elas utilizados para forrageamento, não foi possível fazer uma comparação com trabalhos específicos prévios. Deste modo, esperamos que novos estudos semelhantes sejam desenvolvidos para que novos conhecimentos sobre a relação entre esses dois grupos possa ser melhor estabelecida.

5.1. NOVAS ESPÉCIES

Após a identificação das estirpes do ninho 1, foi constatado que cinco dentre elas representavam espécies não descritas pois (Tabela 2), pois, segundo a metodologia adotada neste trabalho, apresentaram $\leq 98\%$ de similaridade genética na região 26S do rDNA com espécies conhecidas. Dentre elas, as estirpes W12b e B30 são idênticas entre si (pelos resultados do sequenciamento e testes fisiológicos (APENDICE I). O mesmo podemos dizer para as estirpes W3a2 (Apêndice M – figuras 5 e 6) e W7 (Apêndice O – figuras 9 e 10). A estirpe “larva 5a” (Apêndice L - figuras 3 e 4) possivelmente também é espécie ainda não descrita (tabela 2).

Na árvore filogenética (Apêndice E) gerada pelo programa PAUP versão 4.0b10, verificamos que as estirpes W12b (Apêndice N - figuras 7 e 8) e B30 (Apêndice K – figuras 1 e 2) tem *Metschnikowia reukaufii* (código GenBank FJ455114.1) como espécie mais próxima. Quando comparamos a sequência consenso de W12b/B30 com *Metschnikowia reukaufii*, notamos que existem diferenças em 46 pares de bases, o que representa apenas 92% de identidade e portanto trata-se de uma nova espécie de *Metschnikowia*.

De modo semelhante, as estirpes W3a2 e W7 foram consideradas representantes de uma nova espécie, tendo como espécie mais próxima uma estirpe ainda não descrita (*Coniochaeta* sp. AY346275.1 (Apêndice C). Ambas diferem entre si em 37 pares de base dessa nova espécie, conferindo identidade de 94% entre os dois taxa.

A estirpe “larva 5a” foi classificada como *Candida* sp 1 e tem como espécie mais próxima *Candida* sp FJ613525.1 (Apêndice D). As sequências de ambas as leveduras foram comparadas e foi constatada diferença de 17 pares de bases entre elas. Tendo como referência a árvore filogenética (Apêndice D), podemos inferir que no ramo onde se encontra a estirpe Larva 5a, a espécie mais próxima pertence ao gênero *Candida*, sendo uma espécie ainda não descrita, portanto, existem grandes chances de ser uma espécie não catalogada até o momento.

Em relação à estirpe MW17a, isolada do segundo ninho (Apêndice P – figuras 11 e 12), podemos dizer que estamos diante de uma possível nova espécie, pois ela difere em 13 pares

de bases na região ITS comparada com a espécie mais próxima *Debaryomyces hansenii* (DQ683113.1). Foi inferida uma árvore filogenética com um fragmento de 592 pares de base do domínio D1/D2 da região 26S do rDNA utilizando o critério de Neighbour-Joining com os números nos 1000 pseudo-réplicas (Apêndice – F), esta nos mostra que a estirpe MW17a possui 15 pares de bases diferentes da estirpe mais próxima *Pichia Mexicana* (DQ409143.1).

Tabela 2. Prováveis novas espécies de leveduras com após sequenciamento da região D1/D2 do rDNA 26S e da região ITS.

	Estirpes	Cobertura	Identidade	Similares
ninho 1	W3a2	100%	93%	<i>Coniochaeta</i> sp
	W7	100%	93%	<i>Coniochaeta</i> sp
	W12b	100%	91%	<i>Metschnikowia reukaufii</i>
	B30	100%	91%	<i>Metschnikowia reukaufii</i>
	Larva 5a	99%	88%	<i>Candida</i> sp
ninho 2	MW17a	100%	97%	<i>Debaryomyces hansenii</i>
	YS3	100%	95%	<i>Starmerella</i> sp
	MS3	100%	95%	<i>Starmerella</i> sp
	YL1a	100%	97%	<i>Cryptococcus</i> sp

Também, após uma análise preliminar das sequências das estirpes YS3 e MS3, ambas são candidatas a serem descritas como novas espécies. Entretanto, esses dados ainda deverão ser confirmados.

6. CONCLUSÕES

- I. Houve predominância de *Rhodotorula mucilaginosa* em estágios iniciais de desenvolvimento de indivíduos no ninho mais jovens (ninho 1).
- II. *Meyerozyma guilliermondii* e *Aureobasidium pullulans* predominaram no ninho 2, (mais velho), sem aparente correlação com nenhum estágio de desenvolvimento da vespa.
- III. Apenas três espécies, *Pichia guilliermondii*, *Candida chrysomelidarum*, e *Hanseniaspora uvarum* foram encontradas nos 2 ninhos.
- IV. O estudo mostrou que ninhos de *P. ignobilis* podem servir como um local apropriado para a manutenção de leveduras na natureza, inclusive abrigando espécies desconhecidas até o momento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2985-2991, Sep 2005. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://000231841800009 >.

ARAUJO, F.V., Soares, CA., Hagler, A.N. and Mendonca-Hagler, L.C. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a southeast Brazilian mangrove ecosystem. **Antonie van Leeuwenhoek** 68, 91-99, 1995.

BANDONI, R. J. Terrestrial occurrence of some aquatic hyphomycetes. *Canadian Journal of Botany*, v. 50, p. 2283-2288, 1972.

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

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; PINTO, Z.V.; PAULA JUNIOR, T.J. de; CORREA, E.B.; MOURA, A.B.; LUCON, C.M.M.; COSTA, J. de C. do B.; BEZERRA, J.L. Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.17, p.111-147, 2009.

BOURKE, A. F. G. Colony size, social complexity and reproductive conflict in social insects. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 12, n. 2, p. 245-257, 1999.

CARPENTER, J.M. Biogeograph patterns in the Vespidae (Hymenoptera): two views of Africa and South America. In: P. Goldblatt. *Biological Relationships between Africa and South America*. Yale University Press: New Haven, 1993. p.139-155.

CARPENTER, J. M.; MARQUES, O. M. (2001) Contribuição ao Estudo dos Vespídeos do Brasil. Série Publicações Digitais, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal da Bahia, 3, CD-ROM. 2001.

CARREIRO, S. C. et al. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 71, n. 3, p. 243-8, Mar 1997. ISSN

0003-6072 (Print) 0003-6072 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111918>>.

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; DE CICCIO, V. β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. **Postharvest Biology and Technology**, v.12, p.293-300, 1997.

CBS (Netherlands) (Ed.). **CBS Yeast Collections: Maintenance and storage of cultures**. Disponível em: <<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/Defaultpage.aspx>>. Acesso em: 05 maio 2009.

CHANCHAICHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANIJPAN, B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). **Biological Control**, v. 42, n. 3, p. 326-335, 2007. ISSN 10499644.

COLLADO, J.; PLATAS, G.; PELAEZ, F. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from Central Spain. **Nova Hedwigia**, v. 63, n. 3-4, p. 347-360, 1996. ISSN 0029-5035. Disponível em: <<Go to ISI>://A1996VU16500005 >.

CRANE, E. Honey- a comprehensive survey. Heineman, London, 1979. Apud: SNOWDON, J.A. & CLIVER, D.O. Microorganisms in honey. *Int. J. Food Microbiol.*, v.31, p.1-26, 1996.

DESUÓ, Ivan Cesar. **Variação Morfofisiológica das Castas da Vespa Enxameante Neotropical *Polybia (Trichothorax) ignobilis* Durante sua Ontogenia Colonial (HYMENOPTERA, VESPIDAE, EPIPONINI)**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia, Unesp, Rio Claro, 2008.

DROBY, S.; CHALUTZ, E. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. In: WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. (Ed.). **Biological control of postharvest diseases: theory and practice**. Boca Raton: CRC, 1994. p.63-75.

ERTHAL, M., JR.; PERES SILVA, C.; IAN SAMUELS, R. Digestive enzymes in larvae of the leaf cutting ant, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini). **Journal of insect physiology**, v. 53, n. 11, p. 1101-11, Nov 2007. ISSN 0022-1910 (Print)0022-1910 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681527>>.

EVANS, H.E. & M.J. WEST-EBERHARD. The wasps. University of Michigan Press Ann. Arbor: Michigan, 265 p. 1970.

FIALHO, M.B. **Efeito in vitro de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta - preta dos citros.** 2004. 60p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FOWLER, H. G. Human Effects on Nest Survivorship of Urban Synanthropic Wasps. **Urban Ecology**, v. 7, n. 2, p. 137-143, 1983. ISSN 0304-4009. Disponível em: < <Go to ISI>://A1983PZ89400003 >.

GANTER, Philip F.. Yeast and Invertebrate Associations. In: ROSA, Carlos A.; PÉTER, Gábor (Eds.). **The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts.** Berlin: Springer, 2006. Cap. 14, p. 339-342. (cap 14)

GASTON, K. J. The Magnitude of Global Insect Species Richness. **Conservation Biology**, v. 5, n. 3, p. 283-296, Sep 1991. ISSN 0888-8892. Disponível em: < <Go to ISI>://A1991GC70200006 >.

GATES, M. A.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T. R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Molecular microbiology**, v. 52, n. 1, p. 13-24, Apr 2004. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15049807> >.

GILLIAM, M. MiniReview - Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. **Fems Microbiology Letters**, Tucson, Usa, n. 155, p.1-10, July 1997.

GILLIAM, M., Morton, H.L., Prest, D.B., Martin, R.D. and Wickerham, L.J. (1997) The mycoflora of adult worker honey- bees, *Apis mellifera*: effects of 2,4,5-T and caging of bee colonies. **J. Invertebr. Pathol.** 30, 50-54.

GOBBI, N. & V.L.L. Machado. 1986. Material capturado e utilizado na alimentação de *Polybia (Trichothorax) ignobilis* (Haliday, 1836) (Hymenoptera, Vespidae). **An. Soc. Entomol. Brasil.** v 15: 117-124.

GOSTINCAR, C. et al. Expression of fatty-acid-modifying enzymes in the halotolerant black yeast *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud under salt stress. **Studies in mycology**, v. 61, p. 51-9, 2008. ISSN 0166-0616 (Print) 0166-0616 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287526> >.

GRANT, W. D. Life at low water activity. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 359, n. 1448, p. 1249-66; discussion 1266-7, Aug 29 2004. ISSN 0962-8436 (Print) 0962-8436 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306380> >.

GRISSELL, E. E. Hymenoptera biodiversity: some alien notions. *American Entomologist* 45:235–244, 1999.

HAGLER A.N., MENDONÇA-HAGLER LC., ROSA C.A., DE MORALS P.B.: **Yeasts as an example of microbial diversity of Brazil, pp. 189-206 in** *Oecologia Brasiliensis, Vol. I Estrutura, Funcionamento e Manejo de Ecossistemas* (F.A. Esteves, Ed.). UFRJ, Rio de Janeiro 1995.

HASEGAWA, Takezi; BANNO, Isao; YAMAUCHI, Sakae. ATAXONOMIC STUDY ON THE GENUS RHODOTORULA. **The Journal Of General And Applied Microbiology**, Osaka, p. 196-215. jun. 1960.

HERMES, Marcel G.; KÖHLER, Andres. Chave Ilustrada para as Espécies de Vespidae (INSECTA, HYMENOPTERA) Ocorrentes no Cinturão Verde de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, Santa Cruz do Sul, 2004. p. 66-115. Disponível em: <www.bionlie.org.br>. Acesso em: 27 maio 2009.

HERRERA, C. M. et al. Inhospitable sweetness: nectar filtering of pollinator-borne inocula leads to impoverished, phylogenetically clustered yeast communities. **Proc Biol Sci**, v. 277, n. 1682, p. 747-54, Mar 7 2010. ISSN 1471-2954 (Electronic) 0962-8452 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19889702> >.

HÖFLING, J. C. Aspectos biológicos de *Polybia ignobilis* (Haliday, 1936) (Hymenoptera – Vespidae). Rio Claro/SP, UNESP, 103p. (Dissertação de Mestrado), 1982.

INACIO, J. et al. Phylloplane yeasts from Portugal: Seven novel anamorphic species in the Tremellales lineage of the Hymenomycetes (Basidiomycota) producing orange-coloured colonies. **Fems Yeast Research**, v. 5, n. 12, p. 1167-1183, Dec 2005. ISSN 1567-1356. Disponível em: <<Go to ISI>://000233691700007 >.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, n. 2, p. 111-20, Dec 1980. ISSN 0022-2844 (Print) 0022-2844 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7463489>>.

KORDA, A. et al. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** Berlin, n. 48, p. 677-686, 1997.

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

KURTZMAN, C.P., FELL, J.W., Boekhout, T. **Definition, classification and nomenclature of the yeasts.** In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., editors. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Volume 1, 5th edition. New York, NY: Elsevier. p. 3-5, 2011.

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.

LANDELL, Melissa Fontes. **BIODIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES ASSOCIADOS AO FILOPLANO DE BROMÉLIAS DO PARQUE DE ITAPUÃ-VIAMÃO/RS.** 2006. 136 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Pós-graduação Em Microbiologia Agrícola E Do Ambiente Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

LIMA, M. A. P; LIMA, DE J. R; PREZOTO, F. Levantamento dos gêneros, flutuação das colônias e hábitos de nidificação de vespas sociais (HYMENOPTERA, VESPIDAE) no Campus da UFJF, Juiz de Fora, MG. **Revista Brasileira de Zoociências de Juiz de Fora**, Juiz de Fora, n. 12, p.69-80, 2000.

MAHROOF, R. M.; PHILLIPS, T. W. Life history parameters of *Lasioderma serricorne* (F.) as influenced by food sources. **Journal Of Stored Products Research**, Stillwater, Usa, p. 219-226. 24 Dec. 2007. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/jspr>. Acesso em: 08 jul. 2010.

MEYER, W. M., T.G; FREEDMAN, E.Z; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the PCR to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal Clin Microbiology**, v. 31, p. 2274-2280, 1993.

MORAIS, P.B & ROSA, C. A. Interações entre *Drosophila* e leveduras em ambientes tropicais. pp. 321-336. In Martins, R. P., Lewinsohn, T. M. & Barbeitos, M. S. (eds). *Ecologia e comportamento de Insetos*. Série Oecologia Brasiliensis. vol. VIII. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro. Brasil, 2000.

MORAIS, V.A. D.; MADEIRA, J.E.G.C; DIAS, E.C.; BONCOMPAGNI, A.C.; GONÇALVES, R.C.P.; CARVALHO, E. Avaliação microbiológica de amostras de refrigerantes comercializados no Estado de Minas Gerais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 62(1): 1-4, 2003.

MORAIS, P. B.; PAGNOCCA, F. C.; ROSA, C. A.; Yeasts Communities in Tropical Rain Forest in Brazil and other South American Ecosystems. In: ROSA, Carlos A.; PÉTER, Gábor (Eds.). **The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Berlin: Springer. Cap. 18, p. 461-480, 2006.

MORAN, N. A.; JARVIK, T. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. **Science**, v. 328, n. 5978, p. 624-7, Apr 30 2010. ISSN 1095-9203 (Electronic)0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431015>>.

MOREIRA, L. M. et al. CONTROLE EM PÓS-COLHEITA DE *Monilinia fructicola* EM PÊSSEGOS. **Fitopatologia Brasileira**, Bento Gonçalves, Rs, p. 395-398. 18 abr. 2002.

NETTO, J. C.; GOBBI, N.; MALASPINA, O.; *Biologia e Técnicas de Manejo de Abelhas e Vespas*. In: BARRAVIERA, Benedito. **Venenos Animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Epuc: Editora de Publicações Científicas. Cap. 12, p. 173-193, 1994.

NICOLSON, S. W., Nepi, M. & Pacini, E. (eds) *Nectaries and nectar*. Dordrecht, The Netherlands: Springer-Verlag, 2007.

NOZAKI, H. et al. Production of D-arabitol by *Metschnikowia reukauffii* AJ14787. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 67, n. 9, p. 1923-9, Sep 2003. ISSN 0916-8451 (Print) 0916-8451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14519977> >.

PAGNOCCA, F.C. et al. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*. Amsterdam, n. 94, p. 517–526, 2008.

PEREIRA, A. P. R.; **Caracterização de Mel com vista à Produção de Hidromel**. 2008. 81 f. Dissertação (Mestre) - Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2008.

PIÃO, A.C.S. et al. Modelo estatístico para avaliar tendências mediante análise dos parâmetros do cálculo do índice de qualidade de água. **8th Brazilian Conference on Dynamics, control and applications**. 2009.

PRASHANTHI, S. K. K., S. *Aureobasidium pullulans* a potencial mycoherbicide for biocontrol of eupatorium (*Chromolaena odorata*) weed. **Current Science**, v. 88, n. 1, p. 18-21, 2005.

RAMIREZ, C.; GONZALEZ, A. 2 New Species and One Variety of Nitrate-Utilizing Mycelial *Candida* Isolated from Decayed Wood in the Evergreen Rainy Valdivian Forest of Southern Chile. **Mycopathologia**, v. 88, n. 1, p. 55-60, 1984. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <Go to ISI>://A1984TW69500010 >.

RHODE, O.H.J. Intraspecies diversity of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) C.E. Skinner and *Cryptococcus podzolicus* (Bab'eva & Reshetova) originating from a single soil sample. 2005. 99f. Tese (Mestrado) – Department of Microbiology, University of Stellenbosch, Stellenbosch

RIBEIRO, J. R. A.; **Diversidade e ecofisiologia de leveduras em plantio orgânico de Cana-de-açúcar.** 2009. 167 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Agronomia - Ciências do Solo, Departamento de Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SALUJA, P.; PRASAD, G. S. *Cryptococcus rajasthanensis* sp. nov., an anamorphic yeast species related to *Cryptococcus laurentii*, isolated from Rajasthan, India. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 57, n. Pt 2, p. 414-8, Feb 2007. ISSN 1466-5026 (Print)1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17267989> >.

SAMPAIO, J. P. et al. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, n. Pt 2, p. 687-97, Mar 2001. ISSN 1466-5026 (Print)1466-5026 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11321116>>.

SANTOS, M.G.G.R. et al. Yeast in Biotechnology. In: PROGRESS in Microbial Ecology. Rio de Janeiro : Sociedade Brasileira de Microbiologia. p. 571-576, 1997.

SANTOS, G. M. M. et al. Flying capacity of swarm-founding wasp *Polybia occidentalis occidentalis* Oliver, 1791(HYMENOPTERA, VESPIDAE). **Revista Brasileira de Zoociências de Juiz de Fora**, Juiz de Fora, v. 2, n. 2, p.33-39, 2000.

SHARKEY, M. J. Phylogeny and Classification of Hymenoptera. **Zootaxa**, p. 521-528, 2007.

SMITH, M. T.; POOT, G. A. Conspecificity of *Hanseniaspora-Nodinigri* and *Hanseniaspora-Vineae* - Comparison by DNA Reassociation. **Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 151-153, 1985. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <Go to ISI>://A1985AQA9500003 >.

SPALAFORA, J.W. Evolution of ascomycota-arthropoda symbioses. In: SECKBACH, J. Symbiosis: Mechanisms and model systems. Dordrecht: Kluwer, p. 589-610, 2002.

SPENCER, J.F.T.; SPENCER, D.M. Yeasts in natural and artificial habitats. Berlin: Springer. p.33-58, 1997.

SUH, S. O. et al. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycol Res**, v. 109, n. Pt 3, p. 261-5, Mar 2005. ISSN 0953-7562 (Print) 0953-7562 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15912941> >.

SWOFFORD, D. L. PAUP*: **Phylogenetic analysis using parsimony** (*: and other methods). Version 4. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

VALARINI, G.A.; MELO, I.S.; VALARINI, M.J.; VALARINI, P.J. Leaf yeasts as bioindicators of air pollution in southeastern Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 10., 2007, Kos Island. **Proceedings**. [S.l.]: Global NEST: University of the Aegean, 2007. p.863-867.

YARROW, D (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: CP Kurtzman JW Fell (eds), The yeasts. A taxonomic study. Elsevier, Amsterdam, pp 77–100

ZACCHI, L.; VAUGHAN-MARTINI, A. Yeast associated with insects in agricultural areas of Perugia, Italy. **Annals of Microbiology**, Milan, v.52, p.237-244, 2002.

ZANARDO, N.M.T.; PASCHOLATI, S.F.; FIALHO, M.B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1499-1503, 2009.

8. APÊNDICE A -Tabela 1.1 – Espécies identificadas no ninho 1

Estirpe	Cobertura	Identidade	Descrição
W1b	93%	99%	<i>Candida chrysomelidarum</i>
W1Bb	*	*	<i>Candida chrysomelidarum</i>
W2b1	100%	99%	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
W2b2.1	*	*	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
W2b2.2	100%	99%	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
W3	96%	97%	<i>Metschnikowia koreensis</i>
W3a2	91%	97%	<i>Lecythophora sp</i>
W4	100%	100%	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
W7	93%	97%	<i>Lecythophora sp</i>
W12a	95%	99%	<i>Candida chrysomelidarum</i>
W12b	100%	91%	<i>Metschnikowia reukaufii</i>
W13a1a	100%	100%	<i>Pichia guilliermondii</i>
W13a1b	99%	98%	<i>Pichia guilliermondii</i>
W13a1c	*	*	<i>Pichia guilliermondii</i>
W14	100%	100%	<i>Pichia guilliermondii</i>
W14a	98%	99%	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>
W14b	100%	99%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
W16a	*	*	<i>Metschnikowia reukaufii</i>
W19	100	100%	<i>Candida cf. azyma</i>
B22a1	94%	94%	<i>Moniliella suaveolens var. suaveolens</i>
B22a2	99%	99%	<i>Candida cf. azyma</i>
B22b	100%	99%	<i>Candida cf. azyma</i>
B23b	100	97%	<i>Candida apícola</i>
B25	93%	99%	<i>Candida chrysomelidarum</i>
B27a1	*	*	<i>Candida chrysomelidarum</i>
B27b	*	*	<i>Candida cf. azyma</i>
B29	99%	99%	<i>Candida cf. azyma</i>
B30	100%	91%	<i>Metschnikowia reukaufii</i>
S11	96%	100%	<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>
S14	99%	99%	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
S16b	99%	98%	<i>Candida cf. azyma</i>
S16b1	*	*	<i>Candida cf. azyma</i>
S16b2	*	*	<i>Candida cf. azyma</i>
S18a	100%	99%	<i>Hanseniaspora sp</i>
S20a	100%	100%	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
S20b	100%	100%	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
M 1	99%	99%	<i>Candida chysomelidarum</i>
M 6b2	100%	99%	<i>Candida cf. apícola</i>
M 10	100%	100%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
M 11a	98%	99%	<i>Candida chysomelidarum</i>
M 16	100%	99%	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>

Tabela 1.1 (Continuação) – Espécies identificadas da ninho 1

Estirpe	Cobertura	Identidade	Descrição
M 19	99%	99%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
M 20	*	*	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
M 24	99%	99%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
M 26a	95%	99%	<i>Candida chrysomelidarum</i>
M 28	99%	99%	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>
M 27	*	*	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
larva 5a	99%	88%	<i>Candida</i> sp 1
larva 7	100%	100%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
larva 10	*	*	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
PUP7	100%	99%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
PUP8	99%	99%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
PUP9	100%	100%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
RN1b	*	*	<i>Candida</i> cf. <i>apícola</i>
RN3	*	*	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
RN8	*	*	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
RN9	*	*	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
RN10	97%	99%	<i>Candida</i> cf. <i>azyma</i>
Total de estirpes			59

* Leveduras identificadas por similaridade através dos agrupamentos de MSP-PCR

9. APÊNDICE B - Tabela 1.2 - Relação de leveduras identificadas do ninho 2

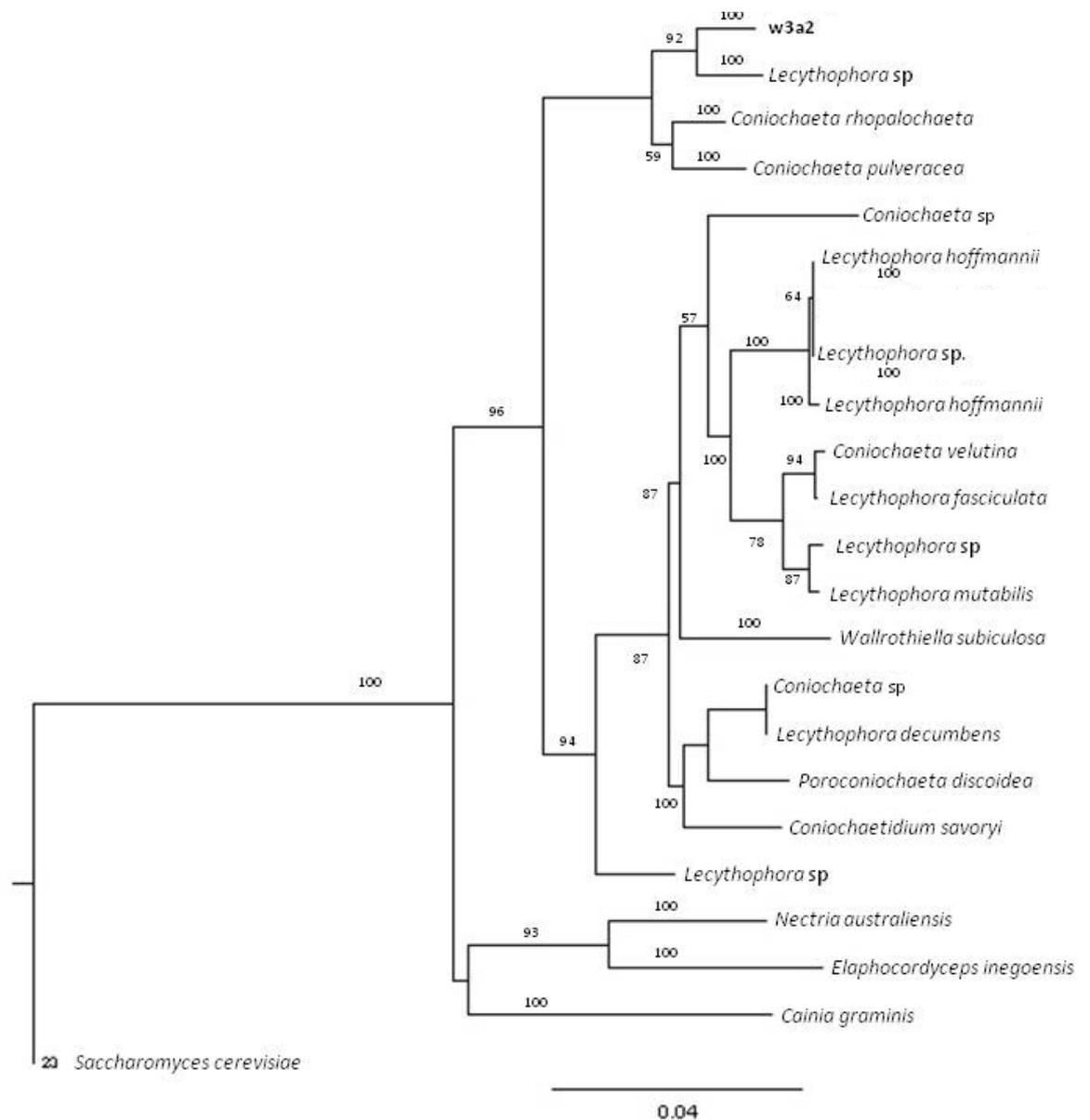
Estirpe	Cobertura	Identidade	Descrição
YW1a	98%	100%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
YW4d	97%	98%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
YW9a	100%	98%	<i>Symbiotaphrina kochii voucher</i>
YW12a	100%	99%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
YW13c	99%	98%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
YW13d	100%	99%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
YW15a	*	*	<i>Cryptococcus luteolus</i>
YW15b	100%	97%	<i>Cryptococcus luteolus</i>
MW17a	97%	89%	<i>Candida</i> sp 2
MW18a1	100%	99%	<i>Cryptococcus luteolus</i>
MW18a2	100%	99%	<i>Candida crysolidarum</i>
MW18a2	100%	99%	<i>Cryptococcus luteolus</i>
MW25a	98%	95%	<i>Starmerella cf. bombicola</i>
MW25f	100%	100%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
MW28a	100%	100%	<i>Pichia guilliermondii</i>
YW29a	100%	98%	<i>Pichia guilliermondii</i>
MW31c	99%	99%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
MW31a	100%	99%	<i>Occultifur externus</i> (anamorfo <i>Rhodotorula</i>)
MW35c	99%	99%	<i>Cryptococcus</i> aff. <i>laurentii</i>
YB5	100%	98%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
YB5b	100%	99%	<i>Pichia guilliermondii</i>
YB7	99%	100%	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>
MB7	99%	99%	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>
MB8a	99%	99%	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>
MB8b	100%	100%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
MB9a	98%	99%	<i>Starmerella meliponinorum</i>
MB9b	93%	99%	<i>Starmerella meliponinorum</i>
MB9b1	100%	100%	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>
MB10b	*	*	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>
YB11	100%	100%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
YB14a	99%	99%	<i>Pichia guilliermondii</i>
YB14b	*	*	<i>Pichia guilliermondii</i>
YB14c	100%	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
YB14c1	97%	98%	<i>Pichia guilliermondii</i>
MB14a	*	*	<i>Cryptococcus</i> sp.
MB14b	99%	99%	<i>Candida haemulonii</i>
MB14c	*	*	<i>Togninia vibratilis</i>
MB16	99%	99%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
YB20	100%	100%	<i>Pichia caribbica</i>
YS2a1	100%	100%	<i>Pichia guilliermondii</i>
YS2a2	99%	98%	<i>Aureobasidium</i> sp.
MS2a2	100%	99%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
MS2b1a	99%	99%	<i>Cryptococcus flavescens</i>
MS2a1	99%	99%	<i>Cryptococcus</i> sp.
MS2b2	99%	99%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
YS3	100%	99%	<i>Candida</i> sp

Tabela 1.2 (Continuação) - Relação de leveduras identificadas do ninho 2

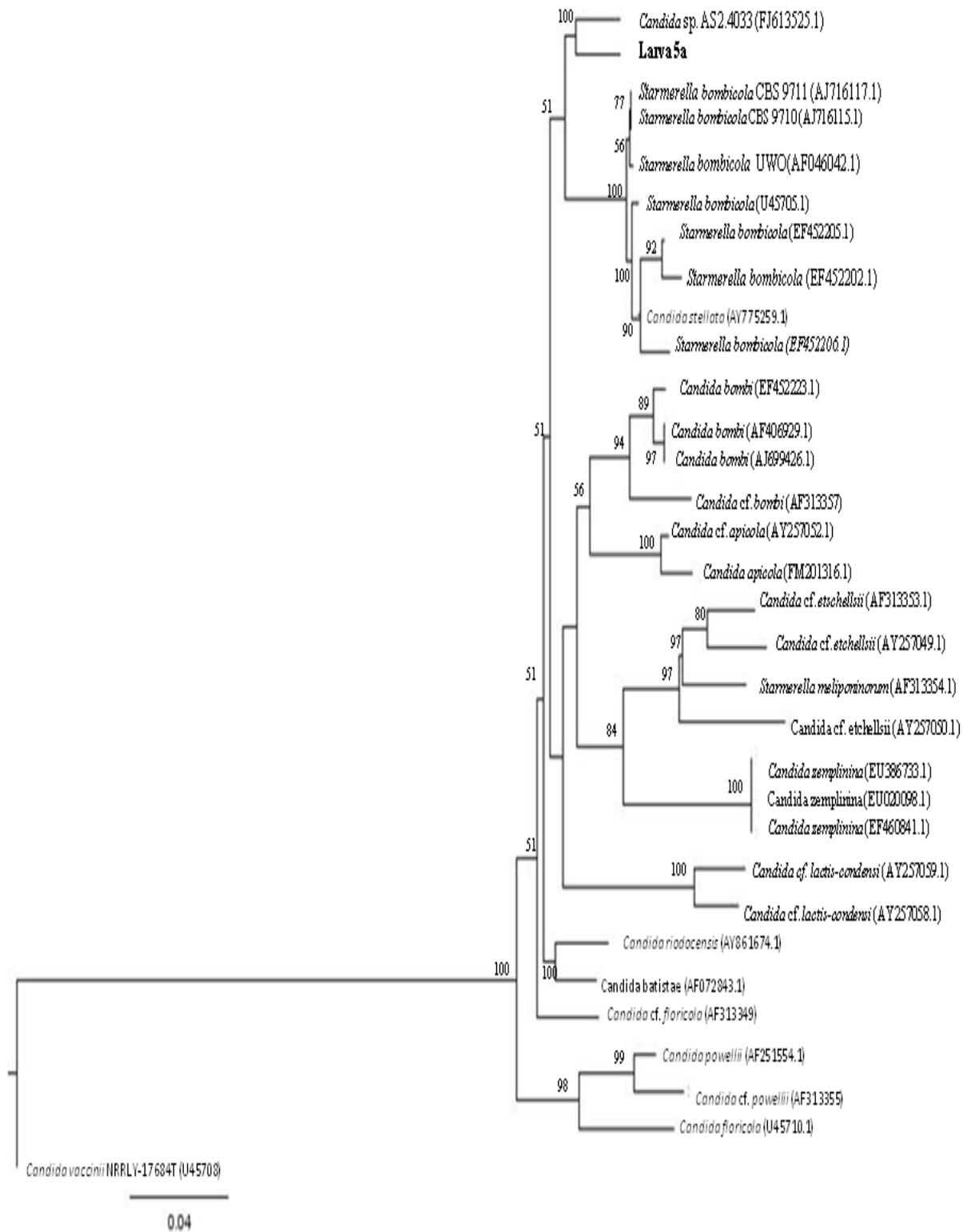
Mmel 8c2	100%	99%	<i>Filobasidium floriforme</i>
Mmel 8d	99%	100%	<i>Cryptococcus luteolus</i>
Mmel 9b	99%	99%	<i>Cryptococcus luteolus</i>
Mmel10b1	100%	99%	<i>Pichia guilliermondii</i>
Ymel12d	99%	98%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Ymel15a1	100%	100%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Ymel18b	100%	98%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Ymel18c	98%	99%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Total de Estirpes			108

* Leveduras identificadas por similaridade através dos agrupamentos de MSP-PCR

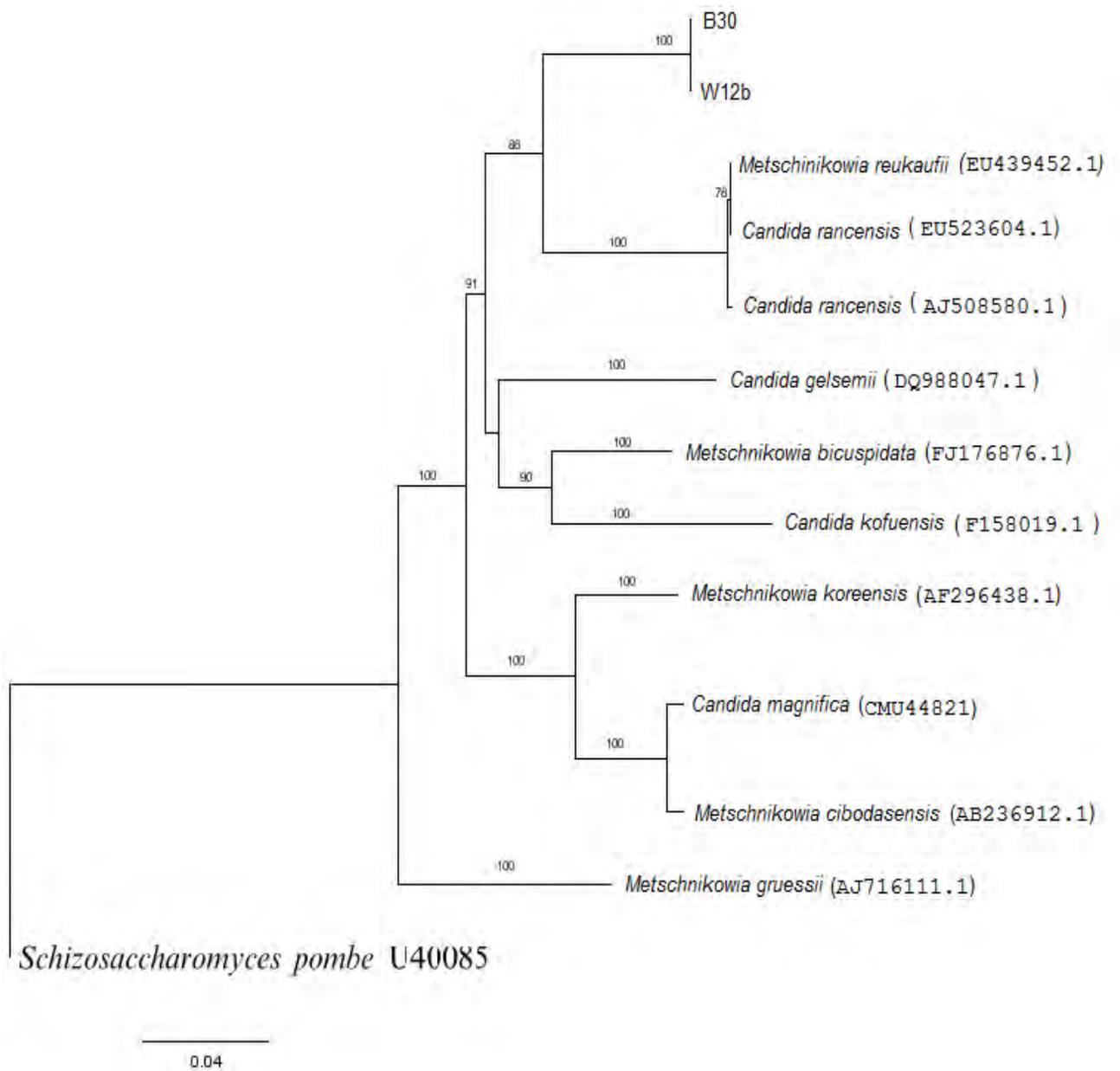
10. **APENDICE C** – Árvore filogenética de W3a2/W7 e estirpes próximas. A árvore foi inferida com um fragmento de 505 pares de base do domínio D1/D2 da região 26S do rDNA utilizando o critério de Neighbour-Joining. Os números nos ramos da árvore são os valores de bootstrap referentes a 1000 pseudo-réplicas (dados abaixo de 50% não foram mostrados)



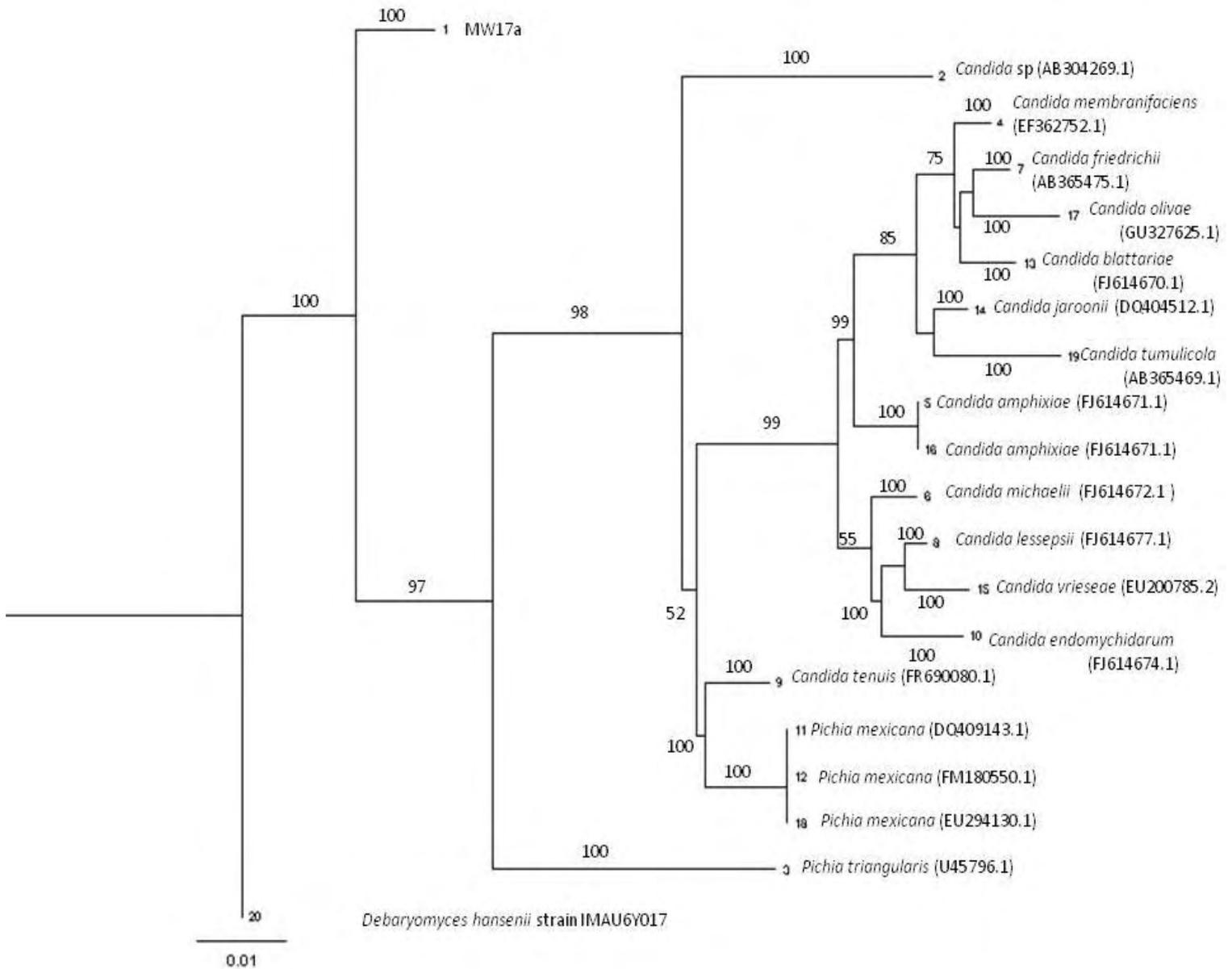
11. **APÊNDICE D** – Árvore filogenética de Larva 5a e estirpes próximas. A árvore foi inferida com um fragmento de 500 pares de base do domínio D1/D2 da região 26S do rDNA utilizando o critério de Neighbour-Joining. Os números nos ramos da árvore são os valores de bootstrap referentes a 1000 pseudo-réplicas (dados abaixo de 50% não foram mostrados)



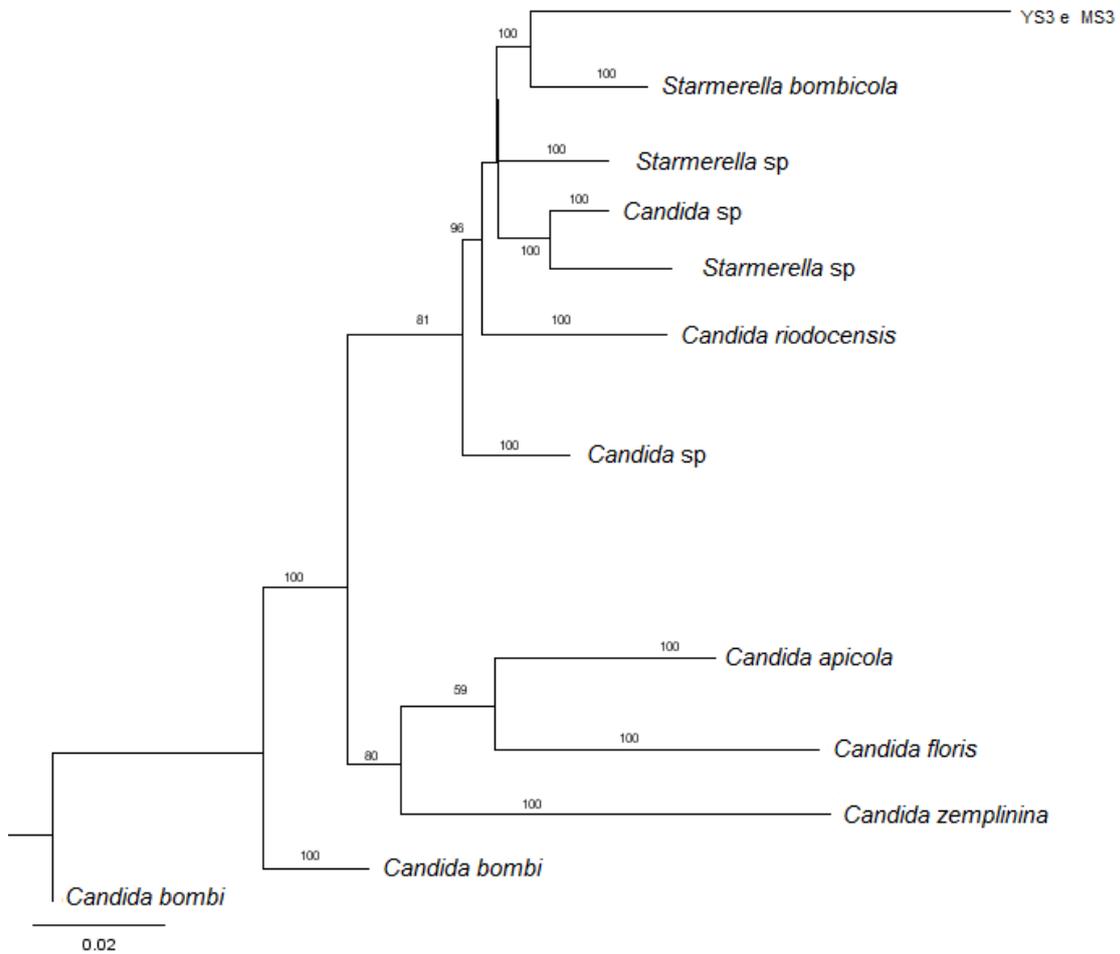
12. **APÊNDICE E** – Árvore filogenética de W12B, B30 e estirpes próximas. A árvore foi inferida com fragmento de respectivamente, 547 e 546 pares de base do domínio D1/D2 da região 26S do rDNA utilizando o critério de Neighbour-Joining. Os números nos ramos da árvore são os valores de bootstrap referentes a 1000 pseudo-réplicas (dados abaixo de 50% não foram mostrados)



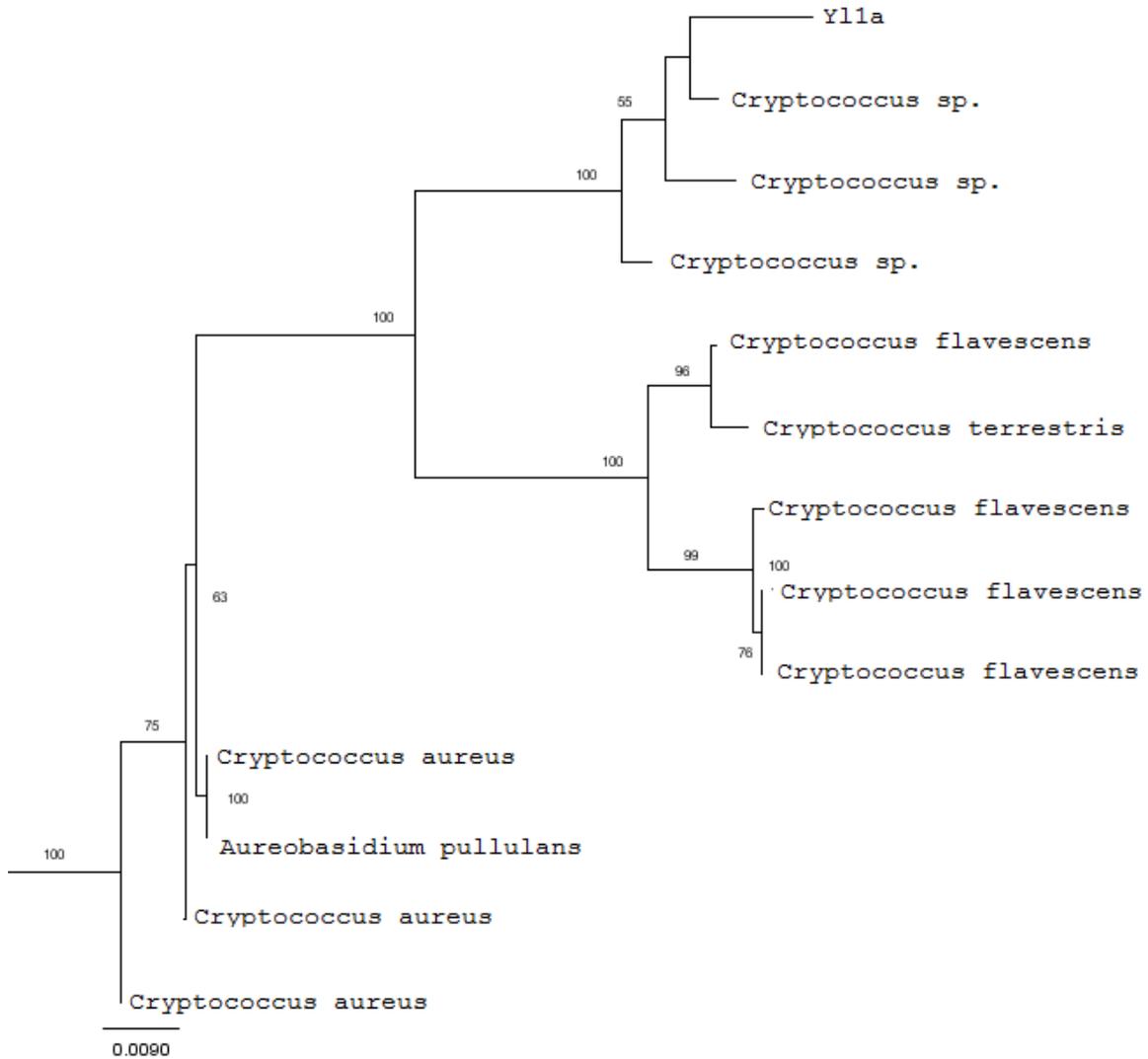
13. **APÊNDICE F** – Árvore filogenética de MW17a e estirpes próximas. A árvore foi inferida com um fragmento de 592 pares de base do domínio D1/D2 da região 26S do rDNA utilizando o critério de Neighbour-Joining. Os números nos ramos da árvore são os valores de bootstrap referentes a 1000 pseudo-réplicas (dados abaixo de 50% não foram mostrados)



14. **APÊNDICE G** – Árvore filogenética YS3 e MS3 e estirpes próximas. A árvore foi inferida com um fragmento de 542 pares de base do domínio D1/D2 da região 26S do rDNA utilizando o critério de Neighbour-Joining. Os números nos ramos da árvore são os valores de bootstrap referentes a 1000 pseudo-réplicas (dados abaixo de 50% não foram mostrados)



15. **APÊNDICE H** – Árvore filogenética Yl1a e estirpes próximas. A árvore foi inferida com um fragmento de 592 pares de base do domínio D1/D2 da região 26S do rDNA utilizando o critério de Neighbour-Joining. Os números nos ramos da árvore são os valores de bootstrap referentes a 1000 pseudo-réplicas (dados abaixo de 50% não foram mostrados)



16. APENDICE I: Assimilação de compostos de carbono das possíveis novas espécies

	w12b	B30	larva 5 a	w3a2	w7
D-Glucose	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	+	-	+	+
Sacarose	+	+	w	+	+
Maltose	+	+	w	+	+
Celobiose	+	+	-	+	+
Trealose	+	+	-	+	+
Lactose	-	-	-	+	+
Melibiose	-	-	-	w	w
Rafinose	-	-	-	w	w
Melezitose	+	+	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-
Amido sol.	w	w	+	w	w
D xilose	+	+	-	-	-
L- Arabinose	n/a	n/a	-	+	+
D Arabinose	w	w	-	w	w
D- ribose	+	+	-	-	-
L – Rahmnose	-	-	-	+	+
D- glucosamina	-	-	-	w	w
N - Acetil D Glucosamina	+	+	w	w	w
Glicerol	+	+	+	+	+
Eritritol	w	w	-	-	-
Ribitol (adonitol)	+	+	-	w	w
Galactitol	-	-	-	w	w
D – Manitol	+	+	+	+	+
D- Glucitol	+	+	w	+	+
Alfa- Metil D Glucosideo	w	w	-	-	-
Salicina	+	+	-	w	w
D- Gluconato	+	+	-	w	w
DL- Lactato	-	-	-	-	-
Succinato	+	+	-	-	-
Citrato	w	w	-	w	w
Inositol	-	-	-	w	w
Hexadecano	+	+	+	+	w
2 ceto D- Glucosideo	w	w	-	w	w
5 ceto D- Glucosideo	-	-	n/a	n/a	n/a
Sacarato	-	-	-	-	-
D- Gluconato	-	-	-	-	-
Xilitol	+	+	w	-	-
L- Arabinitol	-	-	-	+	+
Arbutina	+	+	n/a	n/a	n/a
Propano 1-2 diol	-	-	-	-	-
butanodiol 2-3	-	-	-	-	-
Acetato de etila	-	-	-	-	-
D- Glucono-lactona	+	+	+	w	w

(+): teste com resultado positivo

(-): teste com resultado negativo

(w): teste com resultado fraco (weak)

(n/a): teste não efetuado

17. APENDICE J - Assimilação de compostos de nitrogênio das possíveis novas espécies

	w12b	B30	larva 5 a	w3a2	w7
Nitrato	-	-	-	+	+
Nitrito	-	-	-	+	+
D-glucosamina N	+	+	-	+	+
L – lisina	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	n/a	n/a	n/a
Cadaverina	+	+	+	+	+
Creatinina	-	-	n/a	n/a	n/a
vitamin free	+	+	+	+	+
Síntese de Amido	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
DBB	+	+	-	-	-
Urease	-	-	-	+	+
Glicose(50%)	+	+	+	-	-
Temp. 30 C	n/a	n/a			n/a
10% NaCl	n/a	n/a	+		n/a
licose(5%)					
Ciclo 0,01%	-	-	-	-	-
Ciclo 0,1%	-	-	-	-	-
Fermentação					

(+): teste com resultado positivo

(-): teste com resultado negativo

(w): teste com resultado fraco (weak)

(n/a): teste não efetuado

18. **APÊNDICE K** – Imagens da morfologia da colônia e da célula da estirpe B30

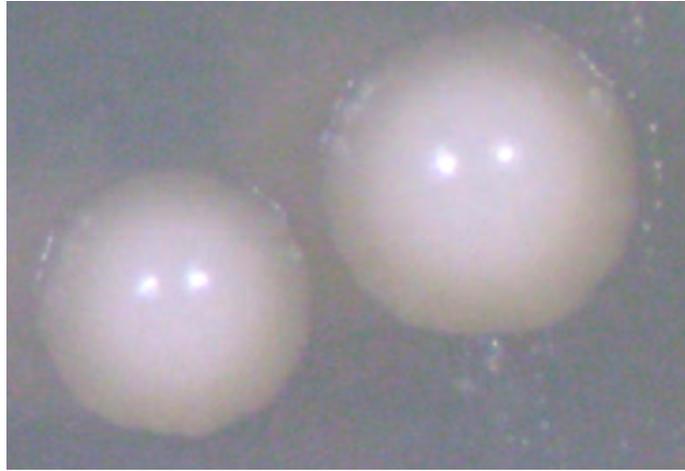


Figura 1: Morfologia da colônia da estirpe B30 em YMA, colônia redonda com bordas lisas, creme e butírica.

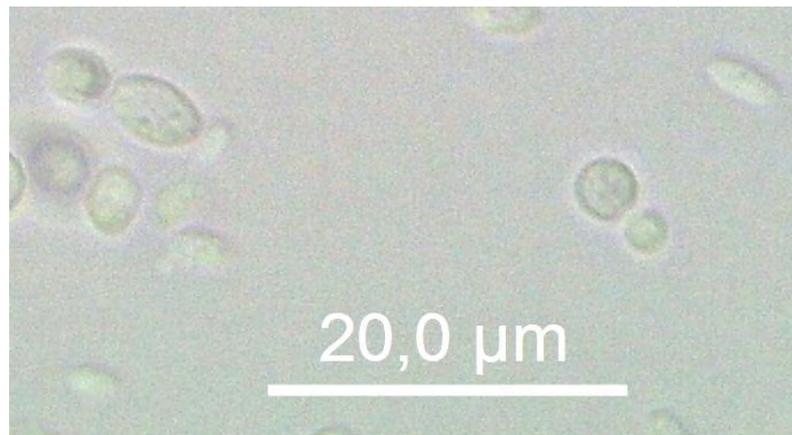


Figura 2: Morfologia celular da estirpe B30. Células ovais e arredondadas, com brotamento multipolar.

19. APÊNDICE L – Imagens da morfologia da colônia e da célula da estirpe larva 5a

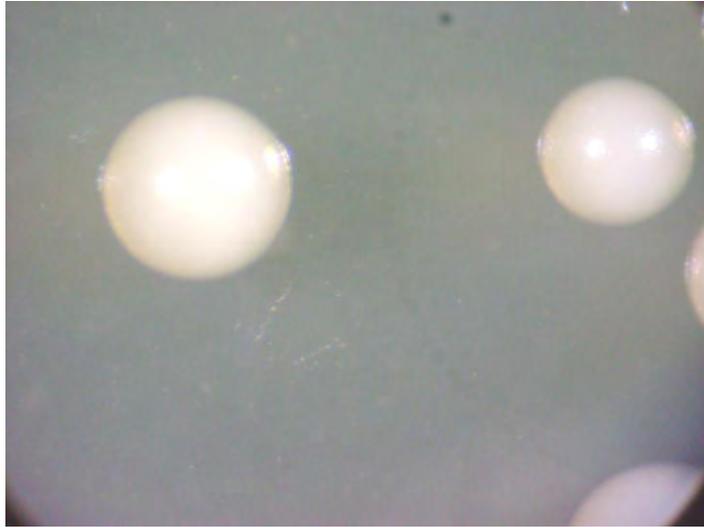


Figura 3: Morfologia da colônia da estirpe Larva 5a em YMA, colônia redonda com bordas lisas, branca e butírica.

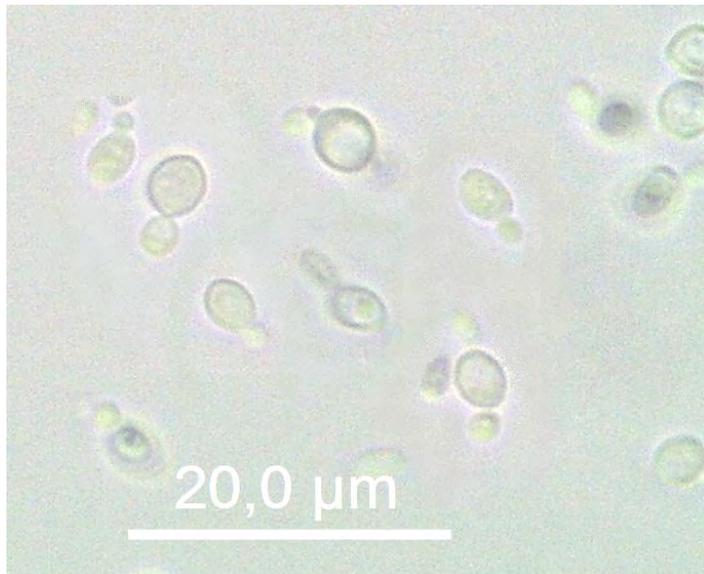


Figura 4: Morfologia celular da estirpe Larva 5a. Células ovóides com brotamento multipolar.

20. **APÊNDICE M** – Imagens da morfologia da colônia e da célula da estirpe w3a2

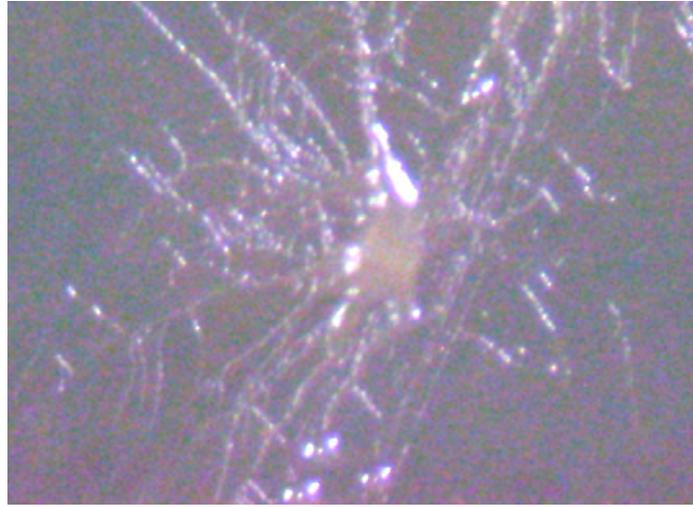


Figura 5: Morfologia da colônia da estirpe W3a2 em YMA, colônia filamentosa, bordas ramificadas, de cor salmão e aspecto brilhante.

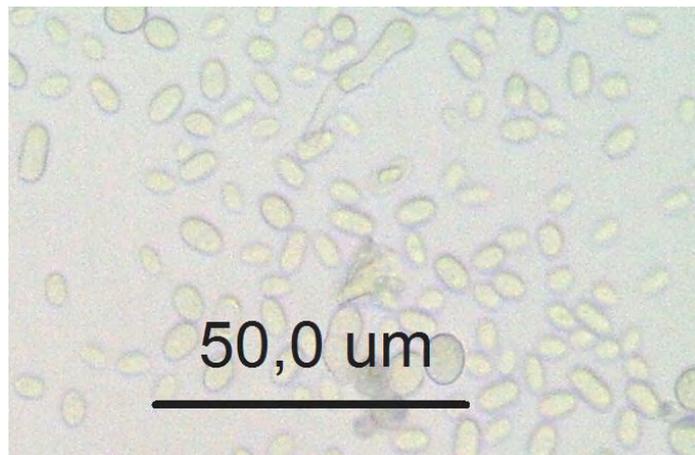


Figura 6: Morfologia celular da estirpe W3a2. Células ovais, alongadas e com presença de pseudo-micélio.

21. **APÊNDICE N** – Imagens da morfologia da colônia e da célula da estirpe w12b

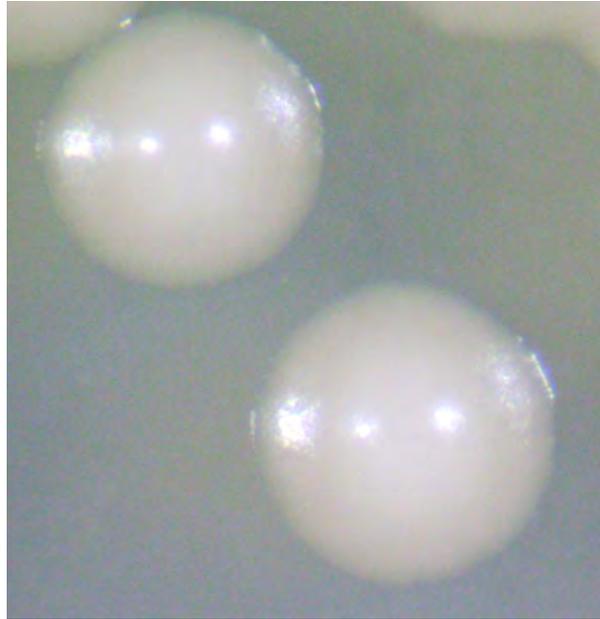


Figura 7: Morfologia da colônia da estirpe W12b em YMA, colônia branca, butírica, redonda com bordas lisas e levemente umbonada.



Figura 8: Morfologia celular da estirpe W12b. Células ovais alongadas com brotamento multipolar.

22. **APÊNDICE O** – Imagens da morfologia da colônia e da célula da estirpe w7



Figura 9: Morfologia da colônia da estirpe W7 em YMA, colônia filamentososa, bordas ramificadas, de cor salmão e aspecto brilhante.

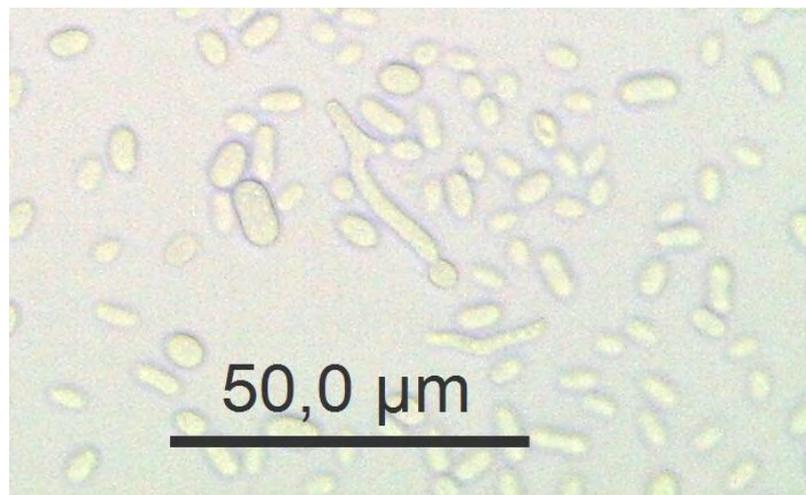


Figura 10: Morfologia celular da estirpe W7. Células ovais, alongadas com presença de pseudo-micélio.

23. **APÊNDICE P** – Imagens da morfologia da colônia e da célula da estirpe mw17a

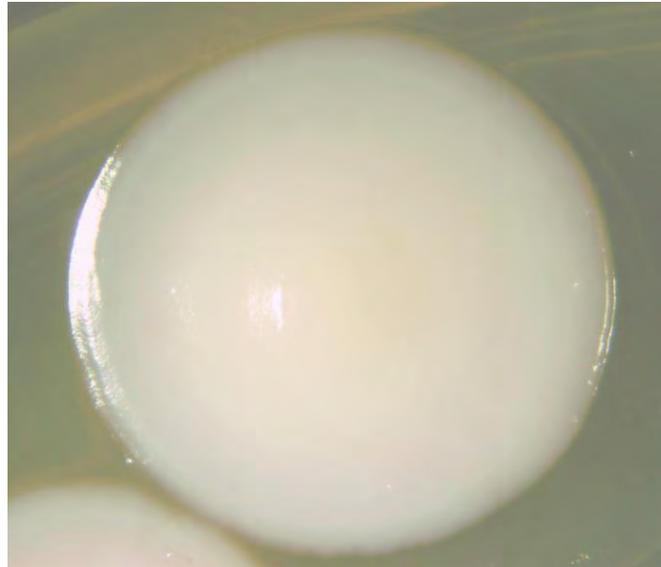


Figura 11: Morfologia da colônia da estirpe MW17a em YMA, colônia redonda, com bordas lisas, de cor creme, aspecto brilhante e com o centro elevado (L-form).

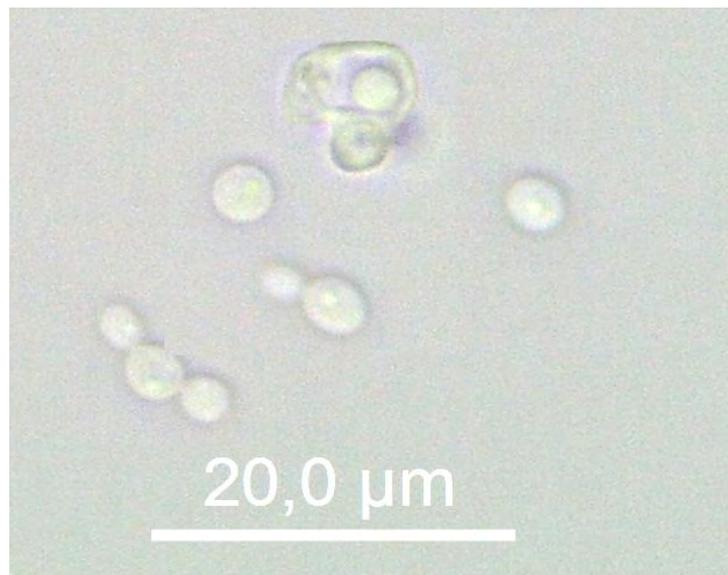


Figura 12: Morfologia celular da estirpe MW17a . Célula redonda com brotamento multipolar.

24. APÊNDICE Q – Imagem da morfologia da célula das estirpe YS3 E MS3

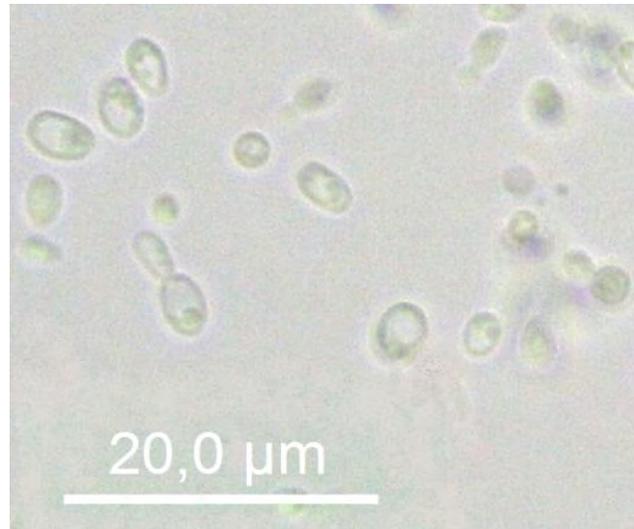


Figura 13: Morfologia celular da estirpe YS3 e MS3. Célula redonda com brotamento multipolar.