

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Estudo da interação entre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e fungos oportunistas *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides*

Diego Zanardo Gallan

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2019

Diego Zanardo Gallan
Engenheiro Agrônomo

Estudo da interação entre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e fungos oportunistas *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador
Prof. Dr. **MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Gallan, Diego Zanardo

Estudo da interação entre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e fungos oportunistas *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides* / Diego Zanardo Gallan. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

79 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Transmissão vertical 2. Transmissão horizontal 3. Simbiose 4. Podridão vermelha 5. Podridão de Fusarium 6. SUGARWIN 7. RT-qPCR 8. Microscopia confocal 9. Interação planta-inseto-fungo I. Título.

A Deus primeiramente por me conceder força e sabedoria.

Aos meus pais Maria Elizabeth e José Walter por todo apoio e estímulo.

À minha namorada Leila Muriel por sempre estar ao meu lado me incentivando em todas as decisões.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, professor Marcio de Castro Silva Filho, pela recepção, ensinamentos, apoio, pela oportunidade de poder realizar este projeto e sua satisfação por cada ínfimo progresso e resultado que fomos debatendo ao decorrer deste período. Agradeço também por sempre ter um tempo para conversarmos sobre minhas dúvidas, e pelas conversas que procurou passar um pouco de sua vivência e momentos decisivos em sua vida, saiba que sempre serão lembrados e utilizados para meu crescimento pessoal e profissional, meu mais sincero obrigado.

À Profa. Dra. Maria Carolina Quecine Verdi, por sempre me atender em sua sala para sanar minhas dúvidas e me auxiliar em uma etapa muito importante deste projeto.

À Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza e ao Juliano Vilela Fracasso, do Instituto Agrônomo de Campinas – Centro de Cana, pelo fornecimento do fungo *Colletotrichum falcatum* e das lagartas *Diatraea saccharalis* vindas de campo.

Agradeço ao técnico do nosso laboratório Rodinei de Jesus Graciani por toda ajuda prestada. A Neide Graciano Zério e ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra da Universidade de São Paulo pelo fornecimento de *D. saccharalis* e toda dieta utilizada.

Aos amigos de laboratório, Thais Paula, Larissa Spoladore, Karina Lopes, Marcia Leite, Camila Moro, Alex Velasquez e Maressa Henrique que fizeram da rotina de trabalho um lugar mais prazeroso, e em especial a Flavia Franco que me auxiliou em todo decorrer deste projeto, sendo de muita valia para concretização deste trabalho.

Aos colegas do programa de pós-graduação em Genética e melhoramento de Plantas, pelos conhecimentos compartilhados e auxílios nas disciplinas.

À FAPESP, CAPES e CNPq por todo apoio financeiro concedido.

Aos meus pais Maria Elizabeth Zanardo Gallan e José Walter Gallan por todo apoio, incentivo, compreensão pelas minhas decisões e por estarem presente em momentos felizes e não tão agradáveis assim.

A minha namorada Leila Muriel de Souza, por todo carinho e admiração. Sempre estando ao meu lado em minhas decisões, e fazendo com que minhas metas sejam cada vez mais fáceis de alcançar, sou eternamente grato por tudo que faz por mim. Seu amor e companheirismo transformam minha vida.

E finalmente, agradeço a todos que de alguma forma ajudaram para que este projeto se consumasse e fizeram de meus dias um período mais alegre de ser viver.

A Deus meu muito obrigado pela oportunidade de viver e vivenciar tudo que há de bom neste mundo.

“É impossível progredir sem mudança, e aqueles que não mudam suas mentes não podem mudar nada.”

George Bernard Shaw

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Cana-de-açúcar	15
2.2 Broca-da-cana	16
2.3 <i>Fusarium verticillioides</i> e a Podridão de Fusarium	17
2.4 <i>Colletotrichum falcatum</i> e a podridão vermelha	19
2.5 <i>Aspergillus nidulans</i>	21
2.6 Respostas de plantas a herbívoros	23
2.7 Respostas de plantas a patógenos.....	24
2.8 Proteínas SUGARWIN	27
2.9 Compostos voláteis presentes em fungos oportunistas de cana-de-açúcar	28
2.10 Simbiose.....	29
2.11 Perpetuação de simbioses por transmissão horizontal	32
2.12 Perpetuação de simbioses por transmissão vertical	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Lagartas de <i>D. saccharalis</i>	37
3.2 Isolado de <i>Fusarium verticillioides</i>	37
3.3 Isolado de <i>Colletotrichum falcatum</i>	39
3.4 Isolado de <i>Aspergillus nidulans</i> transformados com mRFP e GFP.....	41
3.5 Métodos de extração de DNA genômico.....	41
3.5.1 <i>F. verticillioides</i> , <i>C. falcatum</i> e <i>A. nidulans</i>	41
3.5.2 <i>D. saccharalis</i> na presença dos fitopatógenos.....	42
3.6 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	42

3.6.1 Obtenção da curva padrão para PCR em tempo real	42
3.6.2 Quantificação absoluta por PCR em tempo real	42
3.7 Transformação genética de <i>F. verticillioides</i> com o gene DsRed	43
3.7.1 Linhagens, vetor de transformação e condições de cultivo	43
3.7.2 Teste de sensibilidade à higromicina-B	43
3.7.3 Preparo dos conídios	44
3.7.4 Transformação de <i>F. verticillioides</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..	44
3.7.5 Confirmação da transformação	45
3.7.6 Avaliação das características culturais e estabilidade mitótica.....	46
3.7.7 Avaliação do desenvolvimento de <i>D. saccharalis</i> na presença do <i>F. verticillioides</i> transformado.....	46
3.8 Experimento de quantificação da presença de <i>F. verticillioides</i> , <i>C. falcatum</i> e <i>A. nidulans</i> durante o período de desenvolvimento da broca-da-cana.....	47
3.8.1 Inoculação de fungos e de <i>D. saccharalis</i> em dietas artificiais	47
3.8.2 Fases de análise	47
3.8.3 Método de avaliação	48
3.9 Experimento de identificação da presença de <i>F. verticillioides</i> DsRed em intestinos de <i>D.</i> <i>saccharalis</i>	48
4. RESULTADOS.....	51
4.1 Avaliação da presença de <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Colletotrichum falcatum</i> em <i>Diatraea</i> <i>saccharalis</i> da geração inoculada.....	51
4.2 Avaliação da presença dos fungos <i>F. verticillioides</i> e <i>C. falcatum</i> em geração subsequente de <i>D. saccharalis</i>	54
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS	65

RESUMO

Estudo da interação entre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e fungos oportunistas *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides*

Em cana-de-açúcar, a colonização do caule por fungos oportunistas, como *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*, está diretamente ligada ao ataque da lagarta *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Duas proteínas, SUGARWIN1 e SUGARWIN2 são produzidas em cana-de-açúcar, em resposta ao dano mecânico e ao ataque de *D. saccharalis*, porém estas proteínas não afetam o inseto, e sim ocasionam alterações fisiológicas e morfológicas em *F. verticillioides* e *C. falcatum*, ocasionando a morte destes fungos por apoptose. Dietas artificiais suplementadas com estes fungos oportunistas ocasionaram o ganho de peso da *D. saccharalis*. Esses dados indicam uma interação mais íntima entre o inseto e estes patógenos de cana, sendo que, neste estudo procuramos identificar relações simbióticas entre os indivíduos, analisando se a forma de transmissão desses fungos é mediado pela *D. saccharalis*. Os resultados mostraram a presença do *F. verticillioides* em todas as fases de desenvolvimento da *D. saccharalis* após contato com o fungo, ou seja, depois de se alimentarem em dieta suplementada por *F. verticillioides* no 4º instar, permaneceram infectadas pelo fungo ao longo de toda a fase pupal e adulta, em ambos os sexos. Além disso, o *F. verticillioides* foi transmitido para os descendentes de *D. saccharalis*, sendo que o fungo foi detectado nos ovos, ou seja, um caso original de transmissão vertical. Por meio de microscopia, também foi possível verificar a alta intensidade de *F. verticillioides* no interior do intestino de lagartas. Estes dados inferem em uma relação simbiótica entre *F. verticillioides* e *D. saccharalis*, onde o simbiote é transferido verticalmente para as gerações subsequentes. As respostas obtidas com o fungo *C. falcatum* diferiram daquelas obtidas com *F. verticillioides*, uma vez que não se detectou a presença do fungo a partir da fase pupal. Neste caso, a relação de simbiose entre o fungo e o inseto pode resultar em uma transmissão horizontal. Com este estudo foi possível identificar diferentes formas de transmissão por *D. saccharalis* para dois fungos envolvidos em podridão de colmo em cana-de-açúcar. Estes dados mudam a forma como é vista a transmissão de *F. verticillioides* por *D. saccharalis* em cana-de-açúcar, podendo influenciar a forma de manejo da podridão de Fusarium e da broca nos canaviais.

Palavras-chave: Transmissão vertical; Transmissão horizontal; Simbiose; Podridão vermelha; Podridão de Fusarium; SUGARWIN; RT-qPCR; Microscopia confocal; Interação planta-inseto-fungo

ABSTRACT

Study of sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and opportunist fungi *Colletotrichum falcatum* and *Fusarium verticillioides* interaction

In sugarcane, stem colonization by opportunistic fungi, such as *Fusarium verticillioides* and *Colletotrichum falcatum*, is directly linked to the attack of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) caterpillar. Two proteins, SUGARWIN1 and SUGARWIN2 are produced in sugarcane, in response to mechanical damage and attack of *D. saccharalis*, however these proteins do not affect the insect, but cause physiological and morphological changes in *F. verticillioides* and *C. falcatum*, causing the death of these fungi by apoptosis. Artificial diets supplemented with these opportunistic fungi caused the weight gain of *D. saccharalis*. These data indicate a more intimate interaction between the insect and the sugarcane pathogens. In this study, we sought to identify symbiotic relationship among individuals, analyzing whether the transmission of these fungi is mediated by *D. saccharalis*. The results showed the presence of *F. verticillioides* in all stages of *D. saccharalis* development after contact with the fungus, in the 4th instar. The caterpillars remained infect by the fungus throughout the pupal and adult phase, in both sexes. In addition, *F. verticillioides* was transmitted to *D. saccharalis* offspring, being detected in eggs, an original case of vertical transmission. Through the microscopy results, it was also possible to verify the high intensity of *F. verticillioides* inside the intestines of caterpillar. These data infer in a symbiotic relationship between *F. verticillioides* and *D. saccharalis*, where the symbiont is transferred vertically to the offspring. The responses obtained with *C. falcatum* differed from those obtained with *F. verticillioides*, since the presence of the fungus was not detected from the pupal phase. In this case, the symbiont relationship between fungus and insect can result in a horizontal transmission. With this study was possible to identify different forms of fungi transmission by *D. saccharalis*. These data change the way the transmission of *F. verticillioides* by *D. saccharalis* in sugarcane is viewed, and may influence the management of Fusarium rot and sugarcane borer attack in sugarcane.

Keywords: Vertical transmission; Horizontal transmission; Symbiosis; Red rot; Fusarium rot; SUGARWIN; RT-qPCR; Confocal microscopy; Plant-insect-fungus interaction

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar é de grande importância nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo plantada em mais de 100 países com cerca de 24 milhões de hectares (FAO, 2010), No Brasil são plantados aproximadamente 9 milhões de hectares (CONAB, 2018), tornando-o o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com 43% de toda produção global, voltada, principalmente, a produção de açúcar e etanol (FAO, 2010; Bargas *et al.*, 2016).

Uma das principais pragas da cultura é a *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), popularmente conhecida como broca-da-cana (Silva-Brandão *et al.*, 2015). Sua infestação pode acarretar, tanto danos diretos quanto indiretos (Dinardo-Miranda, 2010).

Os danos diretos são causados pelas lagartas, que ao se alimentarem do tecido do colmo, formam galerias com até 36 cm de comprimento, provocando perdas de 70 à 90% de produtividade (Flores *et al.*, 2016). O ataque da broca causa diminuição da massa e de valores nutritivos da planta, gerando redução da qualidade dos produtos finais (Dinardo-Miranda, 2010). Além disso, pode ocasionar a diminuição da quantidade de suco e pureza, reduzindo a sacarose de 10% a 20% (Showler, 2016). Os danos indiretos, são aqueles causados sobretudo pela presença de fungos fitopatogênicos *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, que penetram nas plantas a partir de galerias abertas pela *D. saccharalis*, causando as doenças conhecidas por podridão vermelha e podridão de Fusarium, respectivamente (Mckraig, 1936; Ogunwolu, 1991). O dano gerado por esses fungos diminui o rendimento na produção de açúcar, levando a uma redução no teor de açúcar nos colmos devido à inversão da sacarose armazenada na planta e sua transformação em glicose e frutose, que não se cristalizam no processo industrial (Dinardo-Miranda, 2010).

Estudos realizados previamente mostraram que quando atacada por *D. saccharalis*, a planta induz a produção de proteínas de defesa com atividade antifúngica (Medeiros *et al.*, 2012; Franco *et al.*, 2014). Curiosamente, essas proteínas chamadas SUGARWIN1 e SUGARWIN2, mostraram afetar a morfologia de *C. falcatum* e *F. verticillioides*, causando a morte desses fungos. Porém, não afetaram o *Aspergillus nidulans*, que não é um fungo patogênico de cana-de-açúcar, indicando uma interação estreita e específica entre *D. saccharalis* com *C. falcatum* e *F. verticillioides* em cana-de-açúcar (Medeiros *et al.*, 2012; Franco *et al.*, 2014).

Uma pesquisa recente feita pelo grupo mostrou que a taxa de crescimento de *D. saccharalis* em dieta colonizada por *C. falcatum* e *F. verticillioides* é cerca de 42% e 58% maior do que em dieta com ausência de fungos, respectivamente. Esse mesmo ensaio foi realizado com o fungo *A. nidulans*, que não está relacionado com doenças em cana-de-açúcar, no qual as lagartas apresentaram um crescimento 10% menor do que o controle, indicando uma especificidade para a interação inseto-fungo (Franco *et al.*, 2017). Ensaio de escolha olfativa mostraram que lagartas de *D. saccharalis* são atraídas por compostos voláteis emitidos por *C. falcatum* e *F. verticillioides*. O fungo *A. nidulans* não atraiu lagartas de *D. saccharalis* e mostrou um perfil de emissão de compostos voláteis totalmente diferente de *F. verticillioides* e *C. falcatum*, confirmando a especificidade desta interação (Franco *et al.*, 2017).

Em revisão recente, Franco *et al.* (2017) apresentaram vários estudos sobre os efeitos de microrganismos na interação planta-inseto. Em grãos de trigo, espécies de *Fusarium*, como *F. proliferatum*, *F. poae* e *F. culmorum* são capazes de atrair larvas de *Tenebrio molitor*. Por outro lado, *F. avenaceum* repele o mesmo inseto. Neste caso, os voláteis podem representar uma ameaça para as larvas, resultando na rejeição dos insetos (Guo *et al.*, 2014). Além disso, a atração de insetos por voláteis fúngicos pode demonstrar uma interação benéfica para ambos, nos quais os insetos encontram uma fonte de alimento e os fungos uma forma de se alimentar (Thompson *et al.*, 2013). Não obstante, insetos não possuem a capacidade de produzir esteróis, podendo utilizar micélios e esporos de fungos como fonte dessas moléculas (Nasir; Noda, 2003; Thompson *et al.*, 2013). Em contrapartida, insetos também podem promover uma infecção fúngica, por exemplo, fungos necrotróficos podem crescer mais rápido em tecidos previamente atacados por insetos, devido à ruptura celular (Hatcher; Paul, 2000).

Relações simbióticas em diferentes reinos, filos, e suas subclassificações, com microrganismos são descritos, rotineiramente, e encontradas em todo o globo, sendo essa associação, fortemente evidenciada com indivíduos da classe Insecta (Buchner, 1965; Margulis, 1991; Bourtzis; Braig; Karr, 2003; Ruby, 2004). Há variados locais que os insetos abrigam os organismos simbiotes, como em intestinos, exoesqueletos, hemocoel, tripas, túbulos de Malpighi, tecidos periféricos, região abdominal, citoplasma e até mesmo no núcleo celular (Kikuchi; Hosokawa; Fukatsu, 2008; Kikuchi; Hosokawa; Fukatsu, 2011; Sato, 2014; Douglas, 2015; Simonet *et al.*, 2016; Morioka *et al.*, 2018). Alguns organismos nessa simbiose apresentam comportamento mutualista, como formigas *Attini* com fungos *Escovopsis* e escaravelhos *Lagriinae* com bactérias

Burkholderia gladioli, havendo uma associação benéfica entre ambos (Weber, 1966; Chapela *et al.*, 1994; Currie *et al.*, 1999; Flórez *et al.*, 2017). Por outro lado, há a relação parasítica, como a joaninha *Harmonia axyridis* com o nematoide *Parasitylenchus bifurcatus* e formigas *Camponotus leonardi* com o fungo *Ophiocordyceps unilateralis*, onde apenas um organismo se beneficia na relação (Bourtzis; Braig; Karr, 2003; Evans; Elliot; Hughes, 2011; Gegner *et al.*, 2018).

A simbiose é uma interação passada para gerações entre organismos correspondentes, sendo esta área, ainda, pouco estudada, limitando-se a estudos relacionados a algumas poucas bactérias e algumas Archeas (Nyholm; McFall, 2004; Bright; Bulgheresi, 2010; Toomey *et al.*, 2013; Bucher *et al.*, 2016; Mondo *et al.*, 2017). Esse modo de transmissão simbiote pode ser passado de duas formas, horizontalmente, por meio de uma fonte ambiental ou, verticalmente, através da herança materna ou, raramente, por ambos os pais, porém, como há uma grande diversidade de organismos, essa transmissão também pode ser de forma mista, ou seja, horizontal e verticalmente (Bright; Bulgheresi, 2010).

D. saccharalis e os fungos fitopatogênicos que estão ligados a ela, acarretam danos inversíveis a cultura da cana-de-açúcar, impactando drasticamente na produção e conseqüentemente na economia. Estudos recentes do nosso laboratório (manuscrito em preparação) mostraram que durante essa interação, tanto a *D. saccharalis* quanto os fungos *C. falcatum* e *F. verticillioides* se beneficiam. Por isso, foi de imensa importância ter um melhor entendimento da interação entre inseto-fungo, buscando estratégias para o controle das doenças por eles causados na cana. Para isso, o presente trabalho teve como objetivo geral avançar no entendimento sobre a interação entre a broca-da-cana, *C. falcatum* e *F. verticillioides*, com foco no mecanismo de transmissão dos patógenos pelo inseto, sendo dois os objetivos específicos.

- Avaliar a presença de *C. falcatum* e *F. verticillioides* em lagartas, intestinos, pupas e adultos sexados, em dieta previamente inoculada com os respectivos fungos, e também na geração seguinte, em ovos, lagartas e intestinos. Observando-se assim a possibilidade de transmissão vertical destes fungos em *D. saccharalis*.

- Avaliar a presença de *F. verticillioides* transformado (DsRed) em intestinos de *D. saccharalis* de 5º instar, criadas em dieta artificial inoculada e na geração seguinte, por meio de microscopia confocal a laser.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana de açúcar é uma planta alógama, pertencente à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*. Originária das regiões tropicais do Sul e Sudeste asiático, foi introduzida nas Américas através da segunda expedição de Cristóvão Colombo, em meados de 1496, e inserida no Brasil em 1502 por Martim Afonso de Souza, sendo as mudas provenientes da Ilha da Madeira (Daniels; Roach, 1987; Cesnik, 2004). Atualmente, utiliza-se híbridos por todo mundo, por terem características agrônômicas superiores aos genitores (Bastos *et al.*, 2003; Cesnik, 2004). As variedades modernas têm suas bases genéticas resultantes dos cruzamentos entre seis espécies de cana-de-açúcar, resultando em híbridos interespecíficos, porém, os híbridos mais utilizados são resultado das espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Irvine, 1999). Estas espécies são contrastantes, sendo *S. officinarum* caracterizada pelo alto teor de açúcar, talos grossos, baixo teor de fibra e baixa resistência a doenças, já a *S. spontaneum* possui baixo teor de açúcar, talos finos, alto teor de fibra e elevada resistência a estresses bióticos e abióticos (Sreenivasan; Ahloowalia; Heinz, 1987; Singh *et al.*, 2010). O resultado que se busca desse cruzamento é o elevado nível de açúcar, vigor vegetativo e resistência a doenças (Irvine, 1999).

No Brasil, a cana-de-açúcar ocupa cerca de 13,44% de toda área cultivada do país, e é considerado o maior produtor mundial da cultura, seguido pela Índia, China e Tailândia (FAO, 2010; CONAB, 2018). Praticamente toda produção de cana-de-açúcar brasileira é destinada a atividade sucroenergética, na safra 2017/18, São Paulo foi o maior produtor nacional (55,14%), seguido por Goiás (11,15%), Minas Gerais (10,27%), Mato Grosso do Sul (7,41%) e Paraná (5,92%), sendo estes cinco estados responsáveis por quase 90% de toda produção nacional (CONAB, 2018). Com um amplo leque de regiões produtoras, é possível obtenção de duas safras por ano, permitindo a produção de açúcar e etanol o ano todo, abastecendo tanto os mercados internos como os externos, sendo os países, Estados Unidos, Coreia do Sul, Japão, Holanda e Colômbia, que mais importaram etanol e, Argélia, Índia, Bangladesh, Emirados Árabes e Arábia Saudita, os maiores consumidores de açúcar brasileiro (CONAB, 2018; ÚNICA, 2018).

A produção estimada de cana-de-açúcar para a safra 2018/19 no Brasil é de 615,84 milhões de toneladas, uma redução de 2,8% em relação à safra 2017/18 (633,26 milhões de toneladas). A previsão da produção de açúcar é de 31,73 milhões de toneladas, retração de 16,2% da safra anterior. Já para o etanol é previsto um incremento na produção de 18,6% em relação à safra anterior, resultando em 32,31 bilhões de litros. Estas retrações são devidas a problemas climáticos, devolução de terras arrendadas e reconversão de áreas para produção de grãos, todas estas, em importantes áreas produtoras, como a região centro-sul. Já para o declínio da produção de açúcar e incremento ao etanol, é devido a elevação dos estoques mundiais de açúcar, declinando as cotações, desta forma, as unidades de produção destinarão uma menor parte da produção de cana para a fabricação de açúcar e terão um maior montante para produção de etanol (CONAB, 2018).

2.2 Broca-da-cana

A *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), é a principal praga da cana-de-açúcar, amplamente distribuída em todas as regiões canavieiras do país, porém com foco na região Sudeste (Botelho *et al.*, 1999). Também é considerada uma praga impactante nas culturas de milho, arroz, sorgo e capim-sudão. É uma praga de difícil controle, devido ao seu hábito críptico, ou seja, de se alojar em galerias, resultando em pequenos orifícios circulares de aproximadamente 0,5cm na parte exterior, muito semelhante a um furo de broca, daí o nome popular de broca-da-cana. As fêmeas fazem a postura na face abaxial das folhas, com um número variável de ovos (5 a 50, colocados em massas). A eclosão se dá em média de quatro a nove dias, dependendo da temperatura e umidade. Após este período há eclosão das lagartas que inicialmente se alimentarão do parênquima foliar, convergindo a seguir para a bainha das folhas, onde, após a primeira ecdise, penetram nas gemas laterais e abrem galerias no interior do colmo, permanecendo neste local até completarem seu desenvolvimento larval (Gallo *et al.*, 1988; Vendramin *et al.*, 1991). O período larval pode variar de 30 a 90 dias, onde ao término as lagartas fazem um orifício para o exterior e o fecham com fios de seda, dando origem a fase pupal, que dura em média 10 a 11 dias (Gallo *et al.*, 2002). A longevidade da fase adulta de três a sete dias, sendo que esta variação é de acordo com a estação do ano (Botelho, 1985). Todo este ciclo de desenvolvimento da *D. saccharalis* demora em média de 53 a 60 dias, podendo em alguns casos ultrapassar três meses. Dependendo da época do ano e suas relativas condições climáticas, é possível ocorrer até cinco gerações anuais (Gallo *et al.*, 2002).

Os prejuízos causados pelas lagartas podem ser diretos, causados por sua própria alimentação do tecido do colmo, formando galerias, ocasionando perda de peso e morte das gemas. Já em canas novas, ocorre a morte dos ponteiros, conhecido como “coração morto”, enraizamento aéreo e também brotações laterais, afetando drasticamente a produtividade (Gallo *et al.*, 2002). Os prejuízos indiretos são os mais significativos, pois impactam radicalmente nas perdas da cultura, podendo chegar a alguns casos em até 100% da área tomada. Os responsáveis por estes prejuízos são os fungos *C. falcatum* e *F. verticillioides*, que causam a podridão vermelha e a podridão de Fusarium, respectivamente. Até o momento era suposto que estes fungos, por já estarem disseminados nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar, aproveitassem dos orifícios feitos pela broca para infectarem a planta (Gallo *et al.*, 2002; Ogunwolu *et al.*, 1991).

Atualmente o controle da broca vem sendo feito principalmente pelo parasitoide *Cotesia flavipes* (Cam.), utilizado em 90% da área de cultivo de cana-de-açúcar. A forma de controle acontece de forma simples, uma vez que, por se tratar de um parasitoide, a vespinha somente completa seu ciclo de vida quando associada a broca. Deste modo, a vespinha procura seu hospedeiro e deposita os ovos no interior da lagarta, que irão se desenvolvendo até a eclosão das lagartas de *C. flavipes* que se alimentam do interior da Diatraea, que por sua vez, morre exaurida. As lagartas de *C. flavipes* após estarem com a fase larval completa, migram para fora do corpo da Diatraea e inicia-se a fase pupal, identificadas por casulos unidos de coloração branca, formando uma “massa” branca. Após alguns dias há emergência dos adultos que possuem o hábito de se acasalarem logo após o nascimento, fazendo com que o ciclo se inicie novamente de forma eficaz (Wiedenmann; Smith; Darnel, 1992; Overholt *et al.*, 1994).

A presença da broca-da-cana também provoca sérios danos aos produtos finais da indústria canavieira, sendo constatado a redução da eficiência fermentativa do melado para produção de etanol, devido a formação de compostos fenólicos e ácidos orgânicos voláteis pela planta (Holupi *et al.*, 2014).

2.3 *Fusarium verticillioides* e a Podridão de Fusarium

Podridão de Fusarium é a doença em cana-de-açúcar ocasionada pelo patógeno *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. Este patógeno acarreta danos físico-químicos, e está altamente

disseminado em áreas de cultivo de cana-de-açúcar, com a presença da broca da cana (Santos, 2010).

Dos danos acarretados pelo patógeno, estão, a podridão da inflorescência, falhas na germinação de cariopses, morte de plântulas nas caixas de semeadura, alteração na coloração dos tecidos, falha na brotação de gemas e murcha de plantas adultas. As manifestações desta doença ocorrem em todos os estádios de desenvolvimento da planta, podendo acarretar a morte de variedades suscetíveis, sendo manifestada de forma sistêmica (Tokeshi, 1987; Chinaea *et al.*, 2000).

Um dano símbolo desse patógeno é chamado *Pokkab boeng*, sendo bastante comum nos canaviais em períodos de alto crescimento vegetativo da cultura. O sintoma característico é o desenvolvimento de áreas cloróticas na base foliar no período juvenil, seguida com uma distorção e encurtamento foliar. Estas plantas acabam manifestando distorção foliar no “cartucho”, com a presença de folhas cloróticas curtas contendo limitadas estrias avermelhadas (Hughes; Abbott; Wismer, 1964; Tokeshi; Rago, 2005). Nos colmos, os tecidos próximos ao local do dano sofrem inversão de sacarose, apresentando coloração vermelho-escura, revestindo por alguns milímetros e/ou crescendo até os entrenós. Como é uma doença sistêmica, é transmitido pelos feixes vasculares atingindo desde entrenós inferiores até os superiores ao ponto de infecção, sendo que neste caso, somente estes feixes apresentam descoloração (Tokeshi; Rago, 2005; Wenzel; Giometti; Almeida, 2006).

Quando a doença se inicia nas fases finais de desenvolvimento da cana-de-açúcar, ainda pode-se aproveitar para produção, sendo esta ocorrência de menor magnitude devido a cultura já estar totalmente desenvolvida, e mais preparada para ataques e suas respectivas defesas, sendo feita, se necessário, a colheita precoce para não acarretar maiores problemas, contudo, a infecção nestas fases são raras. Já quando a infecção do *F. verticillioides* ocorre nas fases iniciais, problemas como mau desenvolvimento do sistema radicular, baixa perda de vigor, podridão de raízes e *damping off* ocorrem substancialmente, ocasionando na maioria das vezes a perda da produção, sendo estes problemas e esta fase de infecção muito comuns (Ogunwolu *et al.*, 1991; Tokeshi, 1997; Hsuan; Salleh; Zakaria, 2011).

Na fase imperfeita, o agente causal da podridão de Fusarium é o fungo *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sinônimo: *Fusarium moniliforme* Sheldon), enquanto que na fase perfeita é o *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw, sendo possuidor de heterotalismo (De La Torre-Hernández

et al., 2014). Na fase imperfeita, produz abundante quantidade de esporos, microconídios e macroconídios, e em eventos raros produz clamidósporos, sendo a fase conidial a, até então, identificada no Brasil. Os macroconídios são vistos como esporodóquios alaranjado-pálidos, longos, falcados, com três a sete séptos, e os microconídeos como catenulados e produzidos em fiálides de conidióforos ramificados ou em fiálides de hifas, clavados, unicelulares, com clamidósporos ausentes (Tokeshi, 1997). É um patógeno encontrado em vários locais no mundo como Estados Unidos, Japão, Índia, Argélia entre outros, e também, associado a diversas culturas além da cana-de-açúcar, como milho, arroz, soja, trigo, etc. (Glenn *et al.*, 2001; Schulthess; Cardwell; Gounou, 2002; Dóczy *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004; Mcfarlane; Rutherford, 2005; De Almeida *et al.*, 2013; Mohammadi; Nejad; Mofrad, 2013).

Para o controle deste patógeno, até o momento, não se encontrou outra forma a não ser a utilização de variedades resistentes, sendo que não há nenhum produto químico cadastrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Para produtores que utilizam variedades intermediárias ou suscetíveis, a única forma de prevenir a manifestação da doença é operar em solo e ambientes altamente adequados a cultura, e se possível em região ausente do patógeno, de outra forma, qualquer situação fora deste cenário, a planta passará por estresse manifestando os sintomas da doença (Campanhola; Rodrigues; Bettiol, 1998; Santos, 2010; Agprofit, 2019).

Não há indícios da presença de *F. verticillioides* em canaviais desacompanhada da praga *D. saccharalis*, porém, já foi relatado *C. falcatum*, na ausência do inseto em outros países, como na Índia, Austrália, Tailândia, Fiji, e os Estados Unidos (Singh; Singh, 1989). A lagarta *D. saccharalis* propicia um ambiente ideal para colonização do *F. verticillioides*, sendo que, uma vez presente, mata as células do tecido vegetal por meio de seu sistema digestivo, e deposita este material morto nos caminhos deixados no colmo, favorecendo a ocupação do patógeno (Tokeshi, 1997; Matsuoka, 2013).

2.4 *Colletotrichum falcatum* e a podridão vermelha

A podridão vermelha é a doença em cana-de-açúcar ocasionada pelo patógeno *Colletotrichum falcatum* (Went). Está altamente distribuída por todo mundo, sendo que no Brasil há relatos de grandes perdas apenas associada à alta intensidade de infestação de *D. saccharalis* (Amorim; Rezende;

Bergamin Filho, 2011). É uma doença antiga e sempre com danos devastadores a cultura, produzindo toxinas que dependente da variedade de cana não induz uma resposta de defesa eficaz, acarretando a morte da planta (Sundar *et al.*, 1999; Saikia; Azad; Arora, 2004; Prathima *et al.*, 2013).

A podridão vermelha pode ocorrer em várias partes da planta, mas em geral situa-se nas folhas e no caule, evidenciada pela coloração púrpura-avermelhado, que origina seu nome (Kalaimani *et al.*, 2012; Saksena *et al.*, 2013). Em detalhe, o aparecimento desta doença decorre de várias formas em função do estágio vegetativo e do órgão afetado, sendo que, no interior dos colmos os sintomas são manchas vermelhas delimitadas por faixas transversais mais claras ou brancas, as folhas apresentam a nervura central com lesões vermelhas que ao passar do tempo também convertem-se para uma coloração mais clara, e a região nodal pode apresentar necrose (Tokeshi, 1997; Amorim; Rezende; Bergamin Filho, 2011). O aparecimento de regiões avermelhadas em cana-de-açúcar é comum quando infectada pelo *C. falcatum*, porém, esse sintoma também é comum de outras doenças ou mesmo por deficiência de alguns nutrientes, desta forma, uma peculiaridade para diagnosticar esse patógeno são as regiões centrais mais claras e/ou brancas, sendo de fácil visualização (Santos, 2010; Saksena *et al.*, 2013).

Em experimentos feitos com variedades altamente suscetíveis, observou-se o alcance completo das lesões em toda nervura, dado que, ao grau que há o desenvolvimento da planta e seu amadurecimento, ocorre o amarelecimento do ponteiro e paralisação de seu desenvolvimento. Os colmos com coloração amarelada progridem aceleradamente acarretando a necrose completa das folhas até o ponteiro, não havendo brotação das gemas laterais. Ao decorrer do desenvolvimento do fungo, é possível observar nas bainhas das folhas, pontuações negras, que são corpos frutíferos do patógeno (Tokeshi, 1997).

Na fase imperfeita, o agente causal da podridão vermelha é o fungo *Colletotrichum falcatum* Went, ao passo que, na fase perfeita é o *Glomerella tucumanensis* (Speg) Von Arx. Suas características são, colônias brancas, cinzas ou escuras com aspecto de algodão. Quando há esporulação na planta, produz acérvulos subepidérmicos pardo-escuros, septados, abundantes e visíveis com lupa manual. Os conidióforos são curtos, simples, hialinos, com conídios falcados unicelulares e granulados. A dimensão dos conídios oscila de 16 a 48µm (Tokeshi, 1997).

Trata-se de um patógeno identificado em diferentes locais além do Brasil, como Estados Unidos, Austrália, Japão, Índia, entre outros (Viswanathan; Samiyappan, 2002; Nautiyal; Mehta; Singh, 2006; Cai *et al.*, 2009; Prihastuti *et al.*, 2009; Hassan; Afghan; Hafeez, 2010). Este amplo leque

de áreas também se reflete em uma grande variação genética do fungo, podendo ser causado por heterocariose, mutação, seleção, adaptação ou recombinação, em reflexo às mudanças ambientais (Duttamajumder; Singh; Agnihotri, 1990).

A podridão vermelha também é associada a *D. saccharalis*, porém como citado anteriormente, já foi relatado casos sem esta praga, e também, além de frequentemente relacionada com a podridão de Fusarium, não é um “pré-requisito” para existência da doença, podendo existir separadamente (Tokeshi, 1997). A principal via de entrada do *C. falcatum* nos colmos de cana-de-açúcar é por meio dos túneis provocados pela broca-da-cana, por isso a existência desta associação. A infecção por este patógeno provoca a inversão de sacarose em glicose ou frutose, sendo estes dois compostos não almejados na produção de açúcar e etanol (Tokeshi, 1982; Tokeshi, 1997).

Assim como para *F. verticillioides*, o método mais utilizado para prevenção da podridão vermelha é a utilização de variedades resistentes e/ou adaptadas ao tipo de solo e clima típico da região, reduzindo ao máximo qualquer estresse da planta (Santos, 2010). Há apenas um produto catalogado para aplicação na cultura de cana-de-açúcar em busca de seu controle, sendo composto por piraclostrobina, um fungicida do grupo das estrobilurina, responsável pela inibição do transporte de elétrons nas mitocôndrias, inibindo a formação de ATP, sendo este, classificado como altamente tóxico e muito perigoso ao meio ambiente (Tokeshi, 1997; AGROFIT, 2019).

2.5 *Aspergillus nidulans*

A utilização do *A. nidulans* como organismo modelo é muito comum em estudos de análises genéticas, sendo que apresenta todos os ciclos de vida dos ascomicetos. O amplo entendimento dos mecanismos de morfogênese em fungos filamentosos foi conquistado por meio deste sistema modelo (Adams; Wieser; Yu, 1998; Calvo *et al.*, 2002).

O *A. nidulans* se desenvolve como fungo filamentoso rapidamente, tanto em meios sólidos como líquidos, sob condição nutricional variável (Goldman; Kater, 2003). Sua magnitude como sistema modelo de estudo nas áreas de genética e biologia celular, é em resultado da proximidade genômica/evolutiva com um amplo número de diferentes espécies de *Aspergillus*, como *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae* e *A. flavus* e, não possui patogenicidade para indivíduos imunocompetentes e plantas saudáveis (Oka *et al.*, 2004), fato pelo qual foi escolhido como controle negativo nos

experimentos realizados por este estudo. Outra característica que o impõe como modelo é a ocorrência de três ciclos de vida dos ascomicetos, sendo que, em contraste com outros fungos filamentosos, o *A. nidulans* possui três ciclos proliferativos distintos: sexual, assexual e parassexual, contudo, somente os ciclos sexuais e parassexuais propiciam a variabilidade genética (Adams; Wieser; Yu, 1998; Calvo *et al.*, 2002). Outro fator importante, é sua característica homotática (que realiza autofecundação), possuindo oito cromossomos geneticamente definidos (Timberlake; Marshall, 1988).

Por ser um fungo filamentoso saprófita, pode ser isolado do solo ou até mesmo de bolores em alimentos. O fato de ser saprófita possibilita o aproveitamento de uma grande diversidade de nutrientes, além de se beneficiar de uma extensa faixa de temperatura para seu desenvolvimento (Malavazi, 2007). O esporo assexual, ou conídio, é vital no ciclo de vida de vários fungos, sendo o primordial meio de proteção e dispersão para o genoma fúngico, quando não está em condições ambientais favoráveis (Osherov; May, 2001). Este fungo é classificado como perfeito, pois apresenta um ciclo sexual definido, denominado *Emericella nidulans* em sua fase perfeita (Mitchell; Chaplin; Mackenzie, 1987).

A germinação frequentemente é provocada pelo sensoriamento de nutrientes e incitada pelo intumescimento conidial, adesão, organização nuclear e crescimento da hifa. No ciclo parassexual, há anastomose de hifas de homocarióticas genotipicamente diferenciadas, ocasionando em um micélio heterocariótico (Malavazi, 2007). Já na fase sexual há transformação entre uma fase haploide e a diploide, sendo que não é integralmente determinado o estado diploide, sendo este, focos de vários estudos (Mable; Otto, 2001; Zeyl; Vanderford; Carter, 2003; Anderson; Sirjusingh; Ricker, 2004).

O conhecimento adquirido com *A. nidulans* é tão importante, que sua base é utilizada para estudo de outros fungos como *Fusarium verticillioides*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavis*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Penicillium chrysogenum*, sendo empregue tanto na área econômica, quando em áreas médicas (Glass; Donaldson, 1995; Segal *et al.*, 1998; Pellier *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2004; Banno *et al.*, 2005; Galagan *et al.*, 2005; Krappmann; Bayram; Braus, 2005; Bergmann *et al.*, 2007; Hoff *et al.*, 2010).

2.6 Respostas de plantas a herbívoros

Os impactos da herbivoria numa planta se baseiam em quais áreas sofreram estes danos, e também, da fase de desenvolvimento que a planta está (Begon; Harper; Townsend, 1996). Quando um organismo vegetal está sob ataque, diversos efeitos são observados, os nutrientes e minerais podem ser direcionados para diversas partes da planta, usualmente a taxa metabólica se altera, as taxas de crescimento de cada parte da planta passam a variar do modo comum, além da possibilidade de criação de tecidos e/ou substâncias químicas com função protetora (Schwachtje; Baldwin, 2008).

Dois malefícios que estão comumente associados são os danos mecânicos e o ataque de herbívoros, sendo que, há diversas formas da planta sofrer danos mecânicos, como pelo atrito de tecidos, chuvas intensas, entre outras, mas um ataque de herbivoria sempre levará a um dano mecânico, além de diversos danos causados por características de cada herbívoro (Paré; Tumlinson, 1999; Mithöfer; Wanner; Boland, 2005). Nessa associação, tanto o ataque de pragas, quando os danos mecânicos, provocam respostas sistêmicas, que se difundem por toda planta, como também se limitam apenas à área danificada (resposta local) (Schilmiller; Howe, 2005).

Como dito acima, além dos danos mecânicos, há danos característicos de cada herbívoro, como elicitores presentes na secreção bucal dos insetos (Schmelz *et al.*, 2009). Estes compostos são responsáveis em atuar metabolicamente na planta, fazendo com que ocorra a ativação ou repressão de importantes vias de sinalização de defesa (War *et al.*, 2012). As vias mais relevantes de sinalização de defesa da planta quando atacadas por insetos são as vias do ácido jasmônico (AJ) e do etileno (ET), que agem simultaneamente na indução de genes de resposta as lesões geradas pelo herbívoro (Schmelz; Alborn; Tumlinson, 2003; Schweighofer *et al.*, 2007).

As plantas fazem uso de defesas constitutivas e induzidas para sua defesa em combate a ameaças bióticas (Agrawal; Karban, 1999). As defesas constitutivas, como o próprio nome diz, já fazem parte da planta e são de tipo físico, como parede celular, cutícula foliar, acúmulo de metabolitos que impedem a alimentação e o desenvolvimento dos herbívoros (Walling, 2000; Castro; Fontes, 2005). Já para as defesas induzidas, se ramificam em diretas e indiretas, sendo as diretas a ativação de genes de defesa, dos quais impedem proteases digestivas dos herbívoros e diminui a palatabilidade, desincentivando a alimentação (Arimura; Kost; Boland, 2005). As defesas

indiretas, agem de modo externo a planta, com a herbivoria há emissão de voláteis de sinalização de localização, ou seja, as plantas emitem um sinal de chamado para parasitoides e predadores do inseto-praga. A planta não age diretamente no herbívoro, mas direciona outros organismos para seu combate (Arimura *et al.*, 2000).

Como há um amplo leque de herbívoros, há também uma grande variedade de preferências alimentares, sendo alguns de raízes, outros de folhas, caules, entre outros. Porém não há um elo potencial entre um respectivo herbívoro e seu local de ataque específico, em relação a diferenciação de defesa constitutiva e induzida, havendo uma conexão entre herbívoros inferiores (atuam abaixo do solo) e herbívoros superiores (atuam acima do solo) entre raiz e área foliar (vice-versa). Isto pode ser representado pela ação sistêmica do sistema de defesa das plantas (Kaplan *et al.*, 2008).

2.7 Respostas de plantas a patógenos

Para que haja ocorrência de patógenos em plantas, foi necessário um processo coevolutivo, no qual existe uma dupla comunicação, em que além da planta ser capaz de reconhecer e ativar seu sistema de defesa contra um patógeno, este também necessita ter a habilidade de manejar e superar os mecanismos de defesa do hospedeiro, originando um ambiente apropriado para seu desenvolvimento (Monaghan; Zipfel, 2012; Boyd *et al.*, 2013).

Durante esta coevolução entre patógeno-hospedeiro, houve uma complexa permuta de sinais e mecanismos desenvolvidos, resultando na resistência (incompatibilidade) ou suscetibilidade (compatibilidade) das plantas com determinado patógeno (Kazan *et al.*, 2001). A característica de uma interação incompatível é a ocorrência de uma reação de hipersensibilidade (HR – *Hypersensitive response*), que não resulta no desenvolvimento da doença (Zurbriggen; Carrillo; Hajirezaei, 2010). Já nas interações compatíveis não há ocorrência da HR, sendo assim, o patógeno é capaz de se desenvolver sem retenção, resultando no progresso da doença (Joosten; Cozijnsen; De Wit, 1994; Greenberg, 2004). A HR em plantas é determinada pela morte celular local, ou ao redor da infecção, após algumas horas do contato do patógeno, sendo que este processo é de alta complexidade, relacionado com expressão de genes de defesa das plantas (genes R) e então a morte celular programada (Levine *et al.*, 1994).

A definição fisiológica de resistência de uma planta a um patógeno, nada mais é que a capacidade da planta em retardar ou impedir a entrada e, ou a consecutiva instalação e desenvolvimento do patógeno em seus tecidos (Schenk *et al.*, 2000). A distinção primordial entre plantas suscetíveis e resistentes traduz-se no reconhecimento do patógeno invasor e na ligeira ativação do sistema de defesa da planta, o qual é ativado pelo reconhecimento de elicitores do patógeno (Staskawicz *et al.*, 1995; Lo Presti *et al.*, 2015).

Posterior a detecção do patógeno são ativadas as defesas da planta por meio da transmissão de sinais e ocorrências simultâneas, na tentativa de impedir seu desenvolvimento e eliminá-lo. Esta ativação não ocorre de forma constante e linear, estabelecendo cadeias complexas cruzadas (Thatcher; Anderson; Singh, 2005). O sistema de defesa das plantas atua de duas formas associadas, sendo a primeira relacionada com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) pelas células do sistema imune inato, desencadeando respostas primárias de defesa da planta denominada imunidade desencadeada por PAMP (PTI – *PAMP Triggered Immunity*) (Jones; Dangl, 2006; Schwessinger; Zipfel, 2008). A segunda forma, ou etapa, ocorre de uma forma mais específica, relacionada especificamente com cada organismo atuante, de modo que envolve os genes de resistência da planta (R) e as proteínas de avirulência do patógeno (*avr*). Este envolvimento acarreta uma resposta específica e sistemática do sistema de defesa da planta, denominada como imunidade desencadeada por efetores (ETI – *Effector-triggered immunity*), sendo que efetores são definidos como “moléculas liberadas ou associadas a um organismo, ocasionando mudanças fisiológicas” (Jones; Dangl, 2006; Schwessinger; Zipfel, 2008; Dalio *et al.*, 2014).

O reconhecimento dos genes *avr* do patógeno pelos genes R de defesa das plantas foi proposto no século passado, pelo fitopatologista H. H. Flor, o qual originou a famosa teoria “gene-a-gene” (Flor, 1971). Este complexo está relacionado a ativação da sinalização do ácido salicílico (AS) e na resistência sistêmica adquirida (SAR - *Systemic Acquired Resistance*) (Tsuda; Katagiri, 2010).

A relação dos efetores com os receptores das plantas provocam várias respostas de defesa como alteração nos níveis de cálcio no citoplasma, enzimas hidrolíticas, proteínas relacionadas a patogênese (proteínas PR), peroxidases, biossíntese de fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) e cascata de sinalização via quinases, ocasionando respostas tanto sistêmicas quanto locais (Resende; Salgado; Chaves, 2003). Esta cascata se inicia com uma explosão

oxidativa que causa na célula fluxos iônicos, síntese de óxido nítrico, reprogramação transcricional, síntese de quinases, fosfatases e fatores de transcrição (Dangl; Jones, 2001). Em seguida a estes eventos há síntese de AS e do etileno, fortalecimento da parede celular, sínteses de compostos antimicrobianos e finalmente a HR (Zurbriggen; Carrillo; Hajirezaei, 2010).

Em estudos mais recentes observou-se que duas importantes vias metabólicas, AS e do ácido jasmônico, são interligadas quanto a ocorrência da ETI, ou seja, quando a via do AS é afetada pelos efetores de patógenos, a via do AJ é ativada, assegurando a resistência da planta ao ataque (Tsuda; Katagiri, 2010).

Uma das classificações utilizadas para separação dos patógenos é a divisão entre biotróficos e necrotróficos, sendo os biotróficos aqueles que se nutrem do hospedeiro vivo, geralmente por meio dos haustórios que penetram na célula hospedeira sem ocasionar sua morte. Os necrotróficos primeiramente matam a célula hospedeira, habitualmente por fitotoxinas, para depois alimentar-se dessas células mortas. Em geral a via AS é ativada pelas plantas em decorrência dos ataques por patógenos biotróficos e a do AJ e do etileno por necrotróficos (Glazebrook, 2005).

Um dos maiores indicadores moleculares de resposta de defesa de plantas, é a expressão de proteínas PR (*pathogenesis related proteins*), as quais foram identificadas pela primeira vez na década de 70 em folhas de fumo, apresentando HR ao vírus do mosaico (TMV) (Van Loon, 1970). Este estudo foi o que abriu caminho para descoberta das, até então, 17 famílias de PR, baseadas na atividade biológica e estrutura primária (Sels *et al.*, 2008). Sendo as proteínas PR-1 com ação antifúngica inibindo oósporos, PR-2 (β -1,3-glucanase) e PR-3 (quitinase I, II IV, V, VI e VII) com ação direta sobre componentes 1,3- β -glucano e quitina da parede celular de fungos, PR-4 (quitinase I e II) possui atividade antifúngica e de ribonuclease, sendo a primeira descrita em batata e depois em cevada recebendo o nome de proteína da cevada induzida por fermento (BARWIN - *Barley Wound Induced Protein*), PR-5 (proteínas THAUMATIN-*like*) com atividade inibitória de proteases e α -amilases, inicialmente induzindo a membrana plasmática (Antoniw *et al.*, 1980; Van Loon, 1981). PR-6 (inibidores de protease) com ação inibitória pela atividade de inibidores enzimáticos, PR-7 (endoproteinasas), PR-8 (quitinase III) identificada com propriedades iguais as proteínas PR-3, PR-9 (peroxidases) com atividade oxidativa de componentes da parede celular e enzimática, PR-10 (ribonucleases), PR-11 (quitinase V) com ação igual as proteínas PR-3, PR-12 (defensivas) e PR-13 (tioninas) com atividade igual as proteínas PR-5 (Green; Ryan, 1972; Somssich *et al.*, 1986;

Lagrimini *et al.*, 1987; Vera; Metraux; Streit; Staub, 1988; Conejero, 1988; Melchers *et al.*, 1994; Epple; Apel; Bohlmann, 1995; Terras *et al.*, 1995). As proteínas PR-14 são relacionadas com o transporte de lipídios com ação análoga as proteínas PR-5. PR-15 (oxalato oxidase) são envolvidas na transdução de sinais no decorrer da interação patógeno-hospedeiro. PR-16 (proteínas semelhantes a oxalato oxidase), juntamente com as PR-15 incluem tanto proteínas quanto glicoproteínas relacionadas com a matriz extracelular, envolvidas em processos germinativos, crescimento, e respostas a ataques de origem biótica e abiótica. A última família de proteínas, PR-17, ainda não possui ação conhecida, sendo descoberta em plantas resistentes e suscetíveis infestadas com afídeos (*Rhopalosiphum padi*) (García-Olmedo *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1998; Okushima *et al.*, 2000; Sels *et al.*, 2008).

2.8 Proteínas SUGARWIN

As proteínas SUGARWIN1 e SUGARWIN2 foram identificadas em cana-de-açúcar e caracterizadas, sendo homólogas às proteínas BARWIN de mono e dicotilédoneas. As proteínas BARWIN são estruturalmente similares a região carboxi-terminal da heveína e das proteínas *win* de batata, sendo que as proteínas BARWIN não possuem o domínio de ligação à quitina, muito menos a sequência de encaminhamento ao vacúolo em sua estrutura, portanto, todas as proteínas similares apenas ao domínio carboxi-terminal da proteína heveína, fazem parte da família Barwin (Medeiros *et al.*, 2012).

Uma particularidade das proteínas da família Barwin é a existência do peptídeo sinal para a via secretória e também, a presença de um domínio com seis resíduos de cisteína implicados na constituição de pontes dissulfeto. Esta proteína é composta por 125 aminoácidos e induzida por lesões e patógenos tanto em sementes quanto em folhas, sendo pertencente à família das proteínas PR-4 (Hejgaard *et al.*, 1992; Svensson, *et al.*, 1992; Medeiros *et al.*, 2012).

As proteínas SUGARWIN1 e 2 são altamente induzidas localmente por danos mecânicos ou danos provocados por insetos, sendo que se detecta baixos níveis em tecidos sistêmicos. Essa característica de expressão local pode estar associada a função de defesa das plantas contra fungos oportunistas (Medeiros *et al.*, 2012).

As proteínas SUGARWIN como possuem ação anti-patogênica, atuam de forma curiosa na cana-de-açúcar, sendo que a planta utiliza o ataque da broca-da-cana como uma sinalização para ativar seu sistema de defesa contra os fungos oportunistas que irão penetrar o colmo pelo orifício ocasionado pelo inseto. Esta ação anti-patogênica ocasionada no espaço extracelular, e sua manifestação limitada apenas ao local de dano, é relacionada a inibição do crescimento e colonização do patógeno e não possui relação com o herbívoro (Medeiros *et al.*, 2012).

Recentemente, observou-se também que a expressão da SUGARWIN não é igual em todas as variedades de cana, apresentando diferentes níveis de expressão. Também, verificou-se a indução destes genes pelo patógeno *C. falcatum* em algumas variedades que mostraram redução da infecção pelo fungo (Franco *et al.*, 2017; Franco *et al.*, 2019).

A proteína SUGARWIN 2 apresenta efeitos anti-microbianos ao *F. verticillioides*, causando modificações na morfologia das hifas e causando a morte celular por apoptose (Medeiros *et al.*, 2012). Outro resultado importante a respeito dessas proteínas é a respeito de sua especificidade, a qual mostrou-se impacto somente aos fungos oportunistas *C. falcatum* e *F. verticillioides*, não tendo efeito sobre fungos não patogênicos (Franco *et al.*, 2014).

Estes resultados envolvendo proteínas SUGARWINs de cana-de-açúcar, *C. falcatum* e *F. verticillioides*, sugerem uma relação muito íntima entre estes organismos, tornando-se necessário um estudo específico para elucidar esta interação.

2.9 Compostos voláteis presentes em fungos oportunistas de cana-de-açúcar

Como a *D. saccharalis* influencia positivamente na infecção dos fungos oportunistas *C. falcatum* e *F. verticillioides* em cana-de-açúcar, visto que há um maior crescimento fúngico na planta quando em presença do inseto, foi verificado também se há influência desses fungos no desenvolvimento e comportamento da *D. saccharalis*. Ambos fungos oportunistas mostraram desempenhar uma função na atratividade e alimentação da broca-da-cana, ao se alimentar de dieta colonizada pelos patógenos, sendo que se utilizou *A. nidulans* para verificar a especificidade e este influenciou negativamente os insetos (Franco *et al.*, 2017).

Como esta influência dos fungos *C. falcatum* e *F. verticillioides* mostraram alterações no desenvolvimento da *D. saccharalis* e especificidade, levou-se a pesquisar a influência de compostos

voláteis emitidos por estes fungos, que levam a alteração comportamental dos insetos. Por meio de ensaios de escolha contendo os compostos voláteis extraídos especificamente de cada fungo oportunista e do *A. nidulans*, como fungo não relacionado a patogênese em cana, observou-se a alta atração das brocas pelos voláteis de *C. falcatum* e *F. verticillioides*, enquanto que os ensaios com *A. nidulans* não mostraram atração (Franco, 2017).

Além da especificidade das proteínas SUGARWINs com os fungos *C. falcatum* e *F. verticillioides*, também se obteve resultados de mesma importância em relação a *D. saccharalis*, sendo feitos os mesmos ensaios de escolha olfativa contendo compostos voláteis dos fungos oportunistas de cana com lagartas de *S. frugiperda*, e não houve significância nos resultados (Franco, 2017).

Dois compostos voláteis foram encontrados tanto no *C. falcatum* quanto no *F. verticillioides*, sendo identificados como acorenol e acoradiene. Além dos ensaios com *A. nidulans* não terem mostrado resultados positivos em relação mudança comportamental, alimentação e escolha olfativa, encontraram-se outros compostos voláteis quando comparados com os fungos oportunistas de cana estudados, como o 1-octen-3-ol e a 3-octanona (Franco, 2017).

Estes resultados encontrados por Franco (2017), juntamente com os obtidos pela Medeiros *et al.* (2012), reforçam a especificidade envolvendo *D. saccharalis*, *C. falcatum*, *F. verticillioides* e a cana-de-açúcar, e também, apresentam um forte sinergismo, levando a esta pesquisa em busca de simbiose entre os organismos e a eventos de transmissão hereditária, elucidando ainda mais esta interação.

2.10 Simbiose

A concepção de simbiose foi criada no século XVIII pelo alemão Heinrich Anton de Bary, considerado o precursor da micologia. Esse termo foi utilizado como “a convivência de diferentes espécies” (*the living together of different species*), em que os organismos simbiontes podem exercer uma função marcante na adaptação e evolução de indivíduos superiores. O termo simbiose ainda não possui uma definição correta e aceita consensualmente, por ser muito amplo e resultante de vários debates, porém, até o momento, o que melhor representa este pensamento é uma associação a longo prazo entre indivíduos de espécies diferentes (Pradeu, 2011; Oulhen; Schulz; Carrier, 2016).

Os insetos representam a maior parcela da biodiversidade descrita, sendo a associação simbiótica com microrganismos uma das principais razões de serem tão prósperos (Grimaldi; Engel, 2005). Microrganismos simbióticos são encontrados por todo mundo em intestinos, cavidades corporais, hemolinfa, células, aderido a cutícula, entre outras estruturas, em uma ampla variedade de insetos, sendo alguns simbiontes obrigatórios, ou seja, que contribuem significativamente para o *fitness* do hospedeiro, e outros facultativos, influenciando negativamente. Vários simbiontes ainda possuem sua natureza desconhecida e foram identificados apenas por microscopia e/ou PCR e/ou sequenciamento, não mostrando comportamento benéfico, prejudicial ou próximo da neutralidade. Em contrapartida, muitos simbiontes afetam potencialmente a fisiologia, ecologia, reprodução e o comportamento de seus hospedeiros, de várias formas (Kikuchi; Hosokawa; Fukatsu, 2007).

Entre as associações simbiontes estudadas, as relacionadas entre insetos e bactérias são as que apresentam maiores indícios, sendo estas encontradas no intestino médio ou nos tecidos reprodutivos das fêmeas (Feldhaar; Gross, 2009). Como a variedade de microrganismos presentes no intestino de insetos é abundante, frequentemente se identifica simbiontes análogos quanto a estrutura e função intestinal. Este fato pode estar relacionado com o grande número de insetos e também pela localização do simbiote, sendo o intestino um local rico em nutrientes, possibilitando assim a instalação e colonização do microrganismo. Em geral, esses simbiontes intestinais localizam-se no interior de células especializadas, presas a parede intestinal, ou livres pela região intestinal (Rajagopal, 2009).

Entre as associações mutualísticas, encontram-se os simbiontes obrigatórios *Buchnera* em afídeos e *Wigglesworthia glossinidia* em moscas tsé-tsé (gênero de moscas da família *Glossina*), onde essas bactérias localizam-se nos bacteriócitos ou micetócitos dos hospedeiros e fornecem nutrientes essenciais para o desenvolvimento dos respectivos insetos (Douglas, 1998; Shigenobu *et al.*, 2000; Akman *et al.*, 2002). Outra relação mutualista é entre os cupins (Isopteros) e as bactérias e protozoários presentes no intestino do hospedeiro, as quais degradam a celulose, sendo fundamentais ao processo digestivo do inseto (Breznak; Brune, 1994).

Identificou-se também uma relação simbiótica entre bactérias *Blochmannia* e formigas carpinteiras (família *Camponotus*), na qual o endossimbiote auxilia no ciclo de desenvolvimento e na adequação de seus hospedeiros na colônia, por meio da síntese de aminoácidos fundamentais, e da conservação e evolução das formigas (Wernegreen, 2002; Degnan; Lazarus; Wernegreen, 2005).

Simbiontes, do mesmo modo, foram encontrados no intestino de Lepidopteros, produzindo enzimas auxiliaadoras da digestão proteica e atuantes na desintoxicação de metabólitos secundários das plantas. E também em de gorgulhos (*Balanogastriis kolae*), onde identificou-se nove espécies de bactérias atuando em funções amilolíticas e proteolíticas (Douglas, 2009; Femi-Ola; Babalola, 2012).

Uma interessante ação das bactérias simbiontes é em relação a defesa, em que há defesa do organismo hospedeiro por meio do simbionte, produzindo compostos antimicrobianos. Essa defesa, até o momento, foi identificada de duas formas, por inibição ou competição. A primeira foi identificada em intestinos de gafanhotos, tendo presente a bactéria simbionte *Pantoea agglomerans* produzindo fenóis inibidores de bactérias e fungos patogênicos ao inseto, como os fungos *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. A segunda forma de defesa é conhecida como resistência à colonização, foi identificada na associação de bactérias *Blochmannia* e formigas carpinteiras, e atua fisicamente pela disputa regional intestinal, absorvendo uma maior quantidade de nutrientes e diminuindo, conseqüentemente, a colonização do intestino por outros organismos (Shanchez-Contreras; Vlisidou, 2008; De Souza *et al.*, 2009).

Um modelo utilizado para estudo da simbiose é a em relação as formigas *Attini* e seus jardins fúngicos, os quais possuem tanto simbiontes mutualistas quanto parasitas. Dentre os mutualistas estão as actinobactérias *Pseudonocardia* que formam uma camada branca (também chamada camada de cera) sobre o tegumento, protegendo as formigas de infecções bacterianas ou fúngicas (Cafaro *et al.*, 2010). Outra bactéria que age na proteção das formigas é a *Burkholderia* sp., possuindo ação contra o fungo *Escovopsis* sp., o saprofítico *Verticillium lecani* e os entomopatógenos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Santos *et al.*, 2004). Leveduras também mostraram ter ação restritiva aos fungos *Beauveria bassiana*, *Escovopsis* sp. e *Syncephalastrum racemosum* (Rodrigues *et al.*, 2009).

Os simbiontes parasitas, embora se beneficiem do hospedeiro, podem trazer um bem comum, a longo prazo, atuando positivamente na evolução hospedeira, agregando dois mutualistas em combate a um adversário comum. Os parasitas identificados em formigas *Attini* ocasionam a produção de substâncias que deterioram as células de seu hospedeiro e absorvem os nutrientes correspondentes a esta ação, outros produzem toxinas inibidoras de crescimento, e também há os parasitas que competem por nutrientes, atingindo um ponto superior ao necessário para o

desenvolvimento da formiga, apresentando patogenicidade (Carreiro *et al.*, 2002; Reynolds; Currie, 2004; Rodrigues *et al.*, 2008).

Uma interação parasítica muito interessante é entre formigas *Camponotus leonadis* e o fungo *Ophiocordyceps unilateralis*, em que as formigas infectadas se comportam como zumbis. Ainda não está completamente elucidado esta interação, mas sabe-se que após a infecção, a formiga continua viva por algum tempo, no qual o fungo se “apodera” do corpo e a incita a abandonar a colônia em direção a ambientes propícios a sua propagação (vegetação baixa). Após as formigas infectadas subirem nas plantas, cujo ambiente é favorável ao desenvolvimento e crescimento do fungo, elas se aderem nas folhas por meio do aparelho bucal (mordendo) e então morrem. Acredita-se que um dos motivos da manipulação comportamental e morte seja a atrofia muscular, sendo que o fungo se localiza entre as fibras musculares da cabeça, ao redor do cérebro e na região da faringe. Depois da morte da formiga, o fungo continua se desenvolvendo em seu interior, utilizando as entranhas do inseto como alimento, porém não utiliza os músculos e a mandíbula, sendo esta ação identificada como um meio do inseto permanecer fixado a folha. Outra estrutura preservada são os tegumentos externos, os quais servem como uma defesa física contra microrganismos e outros parasitas que possam atrapalhar o desenvolvimento do fungo. Enfim, no estágio final de desenvolvimento do parasita, cresce sua estrutura reprodutiva para fora da cabeça da formiga, onde há liberação de esporos, infectando novas formigas na área (HUGHES *et al.*, 2011).

Uma das características de organismos serem classificados como simbioses, é a capacidade de transmissão ao decorrer de gerações, sendo categorizada de duas formas, por meio da transmissão horizontal, quando, os simbioses se instalam no hospedeiro ambientalmente, geralmente após o nascimento; e a transmissão vertical, quando ocorre a transferência do simbiote dos progenitores para a prole (Bright; Bulgheresi, 2010).

2.11 Perpetuação de simbioses por transmissão horizontal

A transmissão horizontal de simbioses, é a passagem do microrganismo associado ao hospedeiro a geração seguinte pelo ambiente, ou seja, não há interação com a sequência embriônica (embriogênese) do hospedeiro. Porém essa interação é bem complexa, sendo necessário a ocorrência de três estágios, primeiramente o encontro dos organismos, depois o reconhecimento

de ambos e por fim a movimentação e instalação do simbionte no local do hospedeiro apropriado para sua habitação (Bright; Bulgheresi, 2010).

Na primeira etapa, para o estabelecimento de uma interação simbiótica, os dois organismos de vida livre precisam entrar em contato fisicamente entre si, sendo que este contato deve ocorrer no instante e local certos, além de terem que ocorrer novamente em cada geração. Geralmente esta etapa é restrita a apenas uma fase específica de vida do hospedeiro, por outro lado, a maioria dos simbiontes podem realizar a associação ao longo de sua vida. Outro fator limitante nesta fase é em relação a área do encontro, podendo ter locais definidos, como brânquias em bivalves, pelos radiculares em leguminosas e a abertura oral em hospedeiros de microrganismos intestinais. Além desses fatores há relatos de limitantes químicos por saturação, gradientes quimioatraentes, turbulência ambiental, entre outros (Bright; Bulgheresi, 2010).

A segunda fase, responsável pelo reconhecimento, ocorre geralmente pelo muco secretado pelo hospedeiro. Essa interação ocorre por meio de açúcares presentes na forma de proteínas altamente glicosiladas nos hospedeiros e exopolissacarídeos ou lipopolissacarídeos nos simbiontes. Em contrapartida ao reconhecimento pelo muco hospedeiro, nas plantas a interação ocorre separadamente, por exemplo, a ligação dos flavonoides das plantas aos fatores nodais dos rizóbios, resultando na síntese e disponibilização de fatores não específicos (Bright; Bulgheresi, 2010).

Por fim, para ocorrência da transferência horizontal, é necessário que o simbionte encontre e se ambiente no local adequado de simbiose, sendo na maioria das vezes diferente do local de contato inicial ou de reconhecimento. Para esta fase, é necessário que o simbionte migre extracelularmente utilizando canais e cavidades, intracelularmente por dutos transcelulares, ou por ambos. Por exemplo, os rizóbios, após passarem pelas duas primeiras etapas, se infiltram nas rachaduras da epiderme e partem para camada cortical profunda, por meio de um fio de infecção intercelular (linha sistematizada de rizóbios infectantes com lignificação, junto de paredes celulares adjacentes). Nesta etapa, os simbiontes devem enfrentar diversos obstáculos físicos (estruturais) e químicos, como as respostas imunes do hospedeiro, para isso esses microrganismos desenvolveram diversos meios por meio da evolução, como genes associados a defesa do hospedeiro, produção de enzimas de atenuação do sistema de defesa, produção de catalase periplasmática, entre vários outros meios (Bright; Bulgheresi, 2010).

Portanto, para ocorrência de uma transmissão horizontal simbiótica, é necessário máquinas moleculares aprimoradas, selecionando simbioses específicos no ambiente. Sendo que a cada geração, tanto o hospedeiro quanto o microrganismo simbiote necessitam se habituar mutuamente, onde os simbioses combatem a resposta imune do hospedeiro e em contrapartida, o hospedeiro não pode ceder as ações dos simbioses (Bright; Bulgheresi, 2010).

2.12 Perpetuação de simbioses por transmissão vertical

A passagem de simbioses verticalmente ocorre por meio do corpo materno do hospedeiro, nos estágios iniciais da oogênese ou da embriogênese (via transovariana). Diferentemente da transmissão horizontal, a interação entre o simbiote e o hospedeiro é de forma permanente, não sendo necessário a ocorrência do contato entre ambos em todas as gerações, uma vez que o simbiote, após um primeiro contato, permanecerá presente (Kikuchi; Hosokawa; Fukatsu, 2007; Bright; Bulgheresi, 2010).

Por meio de estudos, verificou-se que a ocorrência da transmissão vertical exclusiva, é de rara ocorrência, sendo identificado na grande maioria dos casos a transmissão horizontal em conjunto. Esta ocorrência pode ser explicada pelo fato do simbiote sempre estar presente no ambiente, em decorrência da sua presença no hospedeiro, dessa forma, como já existe uma relação simbiótica entre os organismos, a transferência horizontal acaba sendo facilitada e vista como uma consequência benéfica. Porém é possível que o organismo simbiote não ultrapasse as barreiras da transmissão horizontal e apenas a vertical ocorra (Kikuchi; Hosokawa; Fukatsu, 2007; Bright; Bulgheresi, 2010).

A transferência vertical ocorre, basicamente, em quatro grandes etapas, sendo algumas muito similares a transferência horizontal. A primeira não é muito mencionada, pois em vários casos não há relatos de como e quando aconteceu a ocorrência, sendo ela, o primeiro contato entre os organismos envolvidos. A segunda, mais complexa, é o percurso feito pelo simbiote para o órgão reprodutor do hospedeiro. E a terceira e a quarta são o reconhecimento (não obrigatório) e a jornada para o local onde o simbiote habita, respectivamente (Bright; Bulgheresi, 2010; Pradeu, 2011).

A jornada percorrida pelo simbiote para o órgão reprodutor do hospedeiro depende de inúmeros parâmetros como, sexo do simbiote, estágio ontogenético e fase de desenvolvimento, distância do órgão de alojamento do simbiote ao órgão reprodutor, modo de translocação, entre outros. O grande número de simbioses transmitidos verticalmente são bactérias, que ao final do percurso ao órgão reprodutivo são incorporados pelas células hospedeiras por endocitose, fusão de células “*symbiont housing nurse*” com ovos, ou pela formação de ligações transitórias semelhantes ao colágeno entre “*nurse cells*” e ovos (Bright; Bulgheresi, 2010).

O reconhecimento entre simbiote e hospedeiro, distintamente da transmissão horizontal, não é obrigatória, uma vez que os simbioses não foram selecionados de uma população ambiental. Ao final da transmissão vertical, o simbiote deve se direcionar ao órgão específico de “moradia”, assim como os simbioses transmitidos horizontalmente. Em seguida, o ciclo se inicia novamente com o direcionamento ao órgão reprodutivo (Bright; Bulgheresi, 2010).

Diferentemente da transmissão horizontal, onde o hospedeiro necessita aprimorar-se para selecionar especificamente seus simbioses, na transmissão vertical, o hospedeiro precisa desenvolver formas muito mais profundas para que integrasse os simbioses em sua própria biologia, levando-o consigo tanto em seu crescimento quando na sua reprodução. Porém já se identificou que nesta interação a maquinaria molecular responsável por essa associação não é integralmente do hospedeiro, sendo identificadas peças por parte do simbiote (Bright; Bulgheresi, 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Lagartas de *D. saccharalis*

As lagartas de *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: Crambidae) foram fornecidos pelo Dr. J. R. P. Parra (Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP). O fotoperíodo utilizado na criação foi 14h de claro para 10h de escuro a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa. Ao decorrer do estudo utilizou-se a dieta (tabela 1) proposta por King & Hartley (1985), com modificações (ausência de Nipagin e Formaldeído).

Tabela 1. Composição da dieta artificial usada para criação de *Diatraea saccharalis*

Componente	Quantidade
Germe de trigo	15g
Farelo de soja	54g
Açúcar	52,5g
Sais de Wesson ¹	7,5g
Ácido ascórbico	1,9g
Cloreto de colina	0,4g
Solução vitamínica ²	11,3ml
Vita Gold	0,4ml
Tetraciclina	0,13g
Ágar	12g
Água destilada	910ml

¹Composição dos Sais de Wesson: carbonato de cálcio (10,5g); sulfato de cobre pentahidratado (0,019g); sulfato de magnésio (4,5g); sulfato de potássio e alumínio (0,005g); iodeto de potássio (0,003g); cloreto de sódio (5,25g); fosfato tricálcico (7,45g); fosfato férrico (0,725g); sulfato de manganês (0,01g); cloreto de potássio (6g); monofosfato de potássio (15,5g); fluoreto de sódio (0,028g) e água destilada para 100ml.

²Composição da Solução vitamínica: biotina (0,02mg); ácido fólico (0,025mg); piridoxina (0,25mg); tiamina (0,25mg); riboflavina (0,5mg); pantotenato de cálcio (1mg); niacinamida (1mg); vitamina B12 (0,002mg); inositol (20mg) e água destilada para 1000ml.

3.2 Isolado de *Fusarium verticillioides*

O isolado MMBF 227/12 (*Fusarium verticillioides*) foi obtido de cana-de-açúcar pelo Instituto Biológico de São Paulo, e foi adquirido para realização dos experimentos. Culturas foram iniciadas

inoculando placas contendo meio BDA (Difco®) com micélio do fungo e incubando as placas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Os conídios foram obtidos de culturas de dez dias de idade, deslocando-os do micélio em água destilada estéril, com a ajuda de alça de Drigalski, seguida de filtração em lã de vidro estéril.

Para a legitimidade do isolado foi feita a caracterização morfológica e molecular. Para as avaliações macroscópicas, foram observadas as características da colônia, como coloração e, as avaliações microscópicas foram realizadas sob microscopia óptica, por meio do preparo de lâminas contendo as estruturas do fungo coradas com azul de tripan. Foram observadas a morfologia de microconídios, macroconídios, células conidiogênicas (fiálides) e clamidósporos, conforme os critérios propostos por Leslie *et al.* (2006).

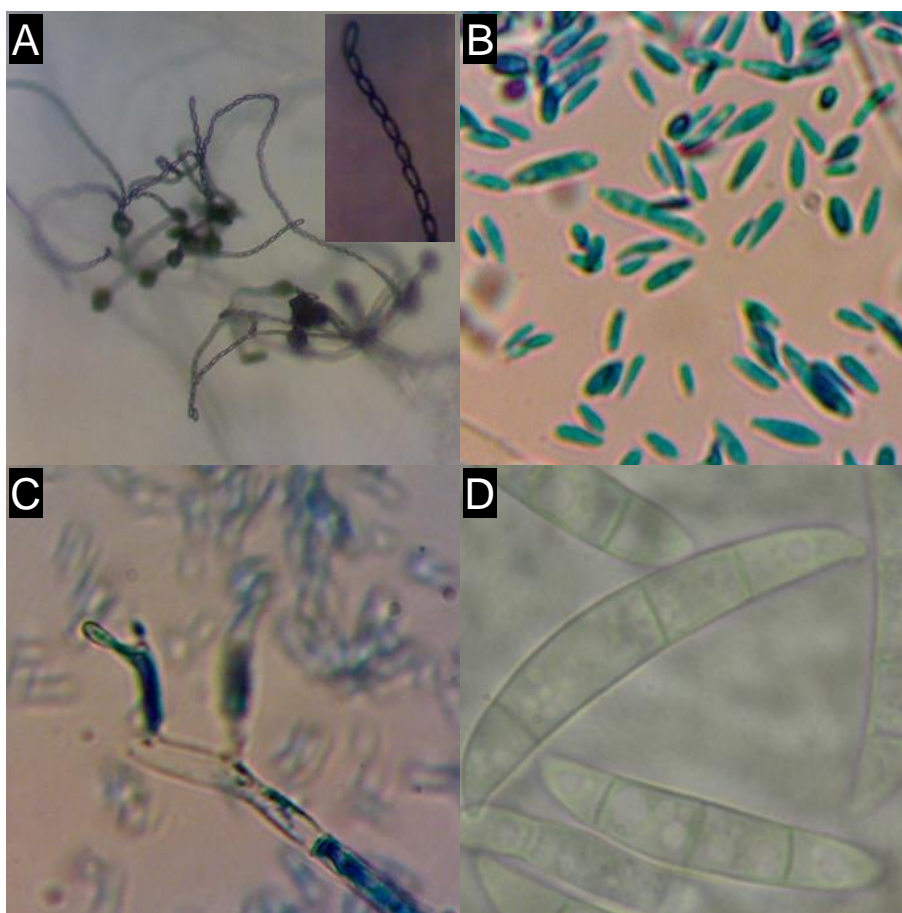


Figura 1 - Estruturas morfológicas de *Fusarium verticillioides*, isolado MMBF 227/12. **A**, microconídios em corrente; **B**, microconídios; **C**, monofiálides em “V” – “orelhas de coelho”; **D**, macroconídios.

O isolado apresenta colônias de crescimento rápido, micélio aéreo cotonoso de coloração branca. Não foi observada pigmentação evidente na colônia. Foram observados macroconídios hialinos, septados, fusiformes ou com típico aspecto “em forma de foice” característico do gênero, muitas vezes com célula apical alongada e célula basal pedicelada (Figura 1D). Microconídios hialinos, que são dispostos em cadeias longas e unicelulares (Figura 1A). Podem apresentar forma piriforme ou oval, sendo produzidos em abundância (Figura 1B) com possível presença de clamidósporos. Células conidiogênicas: monofialídes que, em geral, apresentam-se divididas em forma de “V”, aparentando “orelhas de coelho” (Figura 2C).

Para caracterização molecular foram sequenciados a região ITS (internal transcribed spacer) e o gene do fator de alongação da tradução (TEF), sendo que as sequencias correspondem especificamente ao fitopatógeno *Fusarium verticillioides*.

3.3 Isolado de *Colletotrichum falcatum*

O isolado MMBF 01/18 (*Colletotrichum falcatum*) foi isolado de cana-de-açúcar, da cultivar CTC13 pelo Instituto Agronômico de Campinas (Centro Cana-de-Açúcar – Ribeirão Preto), e foi adquirido para realização dos experimentos. Culturas foram iniciadas inoculando placas contendo meio de aveia (40g/L de aveia; 20g/L de sacarose; 20g/L de ágar) com micélio do fungo e incubando as placas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Os conídios foram obtidos de culturas de 15 dias de idade, deslocando-os do micélio em água destilada estéril, com a ajuda de alça de Drigalski, seguida de filtração em lã de vidro estéril.

Para a autenticidade do isolado também foi feita a caracterização morfológica e molecular. As avaliações macroscópicas e microscópicas foram as mesmas do isolado MMBF 227/12 citadas anteriormente.

As observações macroscópicas da colônia permitiram verificar micélio de coloração cinza escuro, cotonoso e com a formação de grande quantidade de massas de coloração salmão (Figuras 2A e 2B). Sob microscópio óptico foram observados os acérvulos negros, liberando grande quantidade de conídios (Figura 2C) e setas de coloração marrom-escuro (Figura 2D). Com relação aos conídios, foram observadas estruturas falcadas e hialinas, características dessa espécie (Figuras 2E e 2F).

Para caracterização molecular foram sequenciados a região ITS e o gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), sendo que as sequencias correspondem especificamente ao fitopatógeno *Colletotrichum falcatum*.

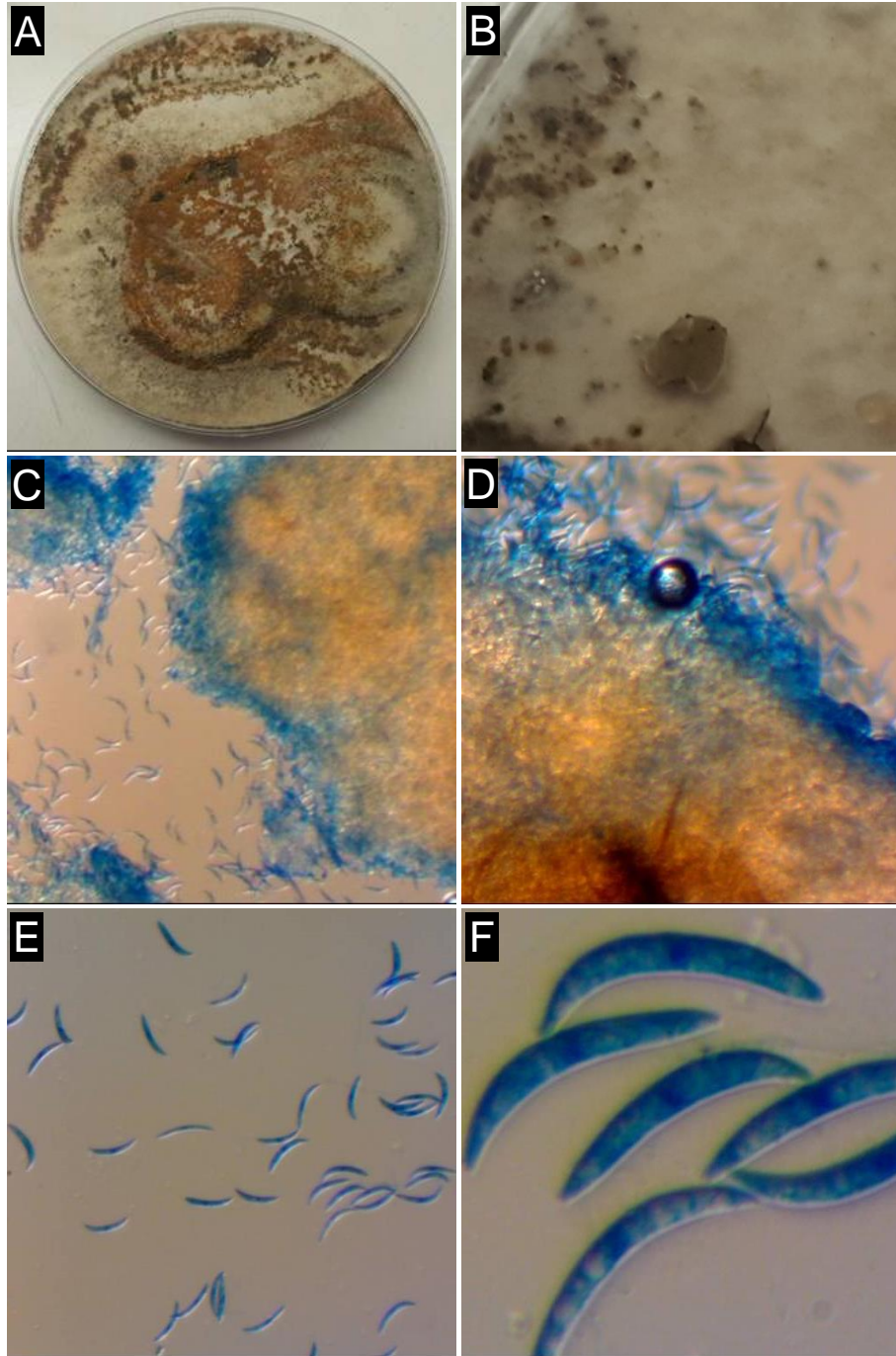


Figura 2 - Estruturas morfológicas de *Colletotrichum falcatum*, isolado MMBF 01/18. **A**, micélio e massas de conídios; **B**, acérvulos em vista macromorfológica; **C** e **D**, acérvulo em vista micromorfológica; **E** e **F**, conídios curvos (em forma de foice) e sem septo.

3.4 Isolado de *Aspergillus nidulans* transformados com mRFP e GFP

O fungo *Aspergillus nidulans* foi utilizado como controle negativo neste estudo, uma vez que não está relacionado à patogênese em cana-de açúcar. Isolados deste fungo foram cedidos pelo Prof. Dr. Gustavo Goldman (USP - Campus Ribeirão Preto). A cepa adquirida possui duas proteínas de fluorescência inseridas em seu genoma, mRFP e GFP através dos processos descrito por Bayram O., *et al* (2012). O fungo foi cultivado em meio mínimo [0.5% extrato de levedura, 2% glicose, 25mM de pirroxina e 0,1% elementos traços (75mM ZnSO₄·7H₂O, 180mM H₃BO₃, 25mM MnCl₂·4H₂O, 18mM FeSO₄·7H₂O, 6mM CoCl₂·5H₂O, 6mM CuSO₄·5H₂O, 1mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, e 140mM EDTA) a pH 6.7], mantidos a 37°C, no escuro. Os conídios foram coletados conforme descrito anteriormente para *F. verticillioides*.

3.5 Métodos de extração de DNA genômico

Todo DNA total obtido foi quantificado pelo NanoDrop 2000 – Thermo Scientific, avaliando-se a pureza pelas relações 260/280 e 260/230, o qual selecionou-se as amostras com valores próximos a 1.80 e de 2.00 a 2.20, respectivamente. Também se avaliou a integridade por gel de agarose.

3.5.1 *F. verticillioides*, *C. falcatum* e *A. nidulans*

A princípio os esporos de *F. verticillioides* e *C. falcatum* foram inoculados em 50 mL de meio BD, e foram incubados por 72h a 25°C e 250 rpm, enquanto que para o *A. nidulans* utilizou-se o mesmo meio mínimo utilizado para seu cultivo, porém sem ágar, e incubado por 48h a 37°C na mesma rotação que os anteriores. Os micélios foram coletados por filtração a vácuo e congelados imediatamente em nitrogênio líquido seguido de maceração. A extração de DNA genômico foi realizada de acordo com Möller *et al.* (1992), sendo as amostras eluídas em Tris-HCl 1mM, pH 8,0.

3.5.2 *D. saccharalis* na presença dos fitopatógenos

Foi feita extração de DNA utilizando o Kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), seguindo o protocolo determinado para tecidos com alteração no tempo de incubação e vortex, sendo 5 minutos de incubação seguidos de vortex por 1 minutos (5 vezes), e a eluição foi feita em Tris-HCl 1mM, pH 8.0 à 70°C.

3.6 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

3.6.1 Obtenção da curva padrão para PCR em tempo real

Utilizou-se o genoma dos respectivos fungos para construção da curva padrão, sendo o valor bruto quantificado no NanoDrop 2000 – Thermo Scientific, e em seguida foram preparadas cinco diluições (1:5; 1:25; 1:125; 1:625; 1:3125), de forma que a quantificação do fragmento de interesse ficasse dentro da curva.

3.6.2 Quantificação absoluta por PCR em tempo real

O PCR quantitativo foi executado com a máquina StepOne™ Real time PCR systems - Applied Biosystems, utilizando o método de curva padrão (*Standard Curve*), com o reagente Maxima® SYBR Green/ROX RT-qPCR Master Mix (2X), Fermentas e os primers ITS2-RT para *C. falcatum* e *F. verticillioides* (Forward 5' - GATGAAGAACGCAGCGAAAT - 3' e Reverse 5' – AACGGATCTCTTGGTTCTGG - 3') (FRANCO *et al.*, 2017) e TubC para *A. nidulans* (Forward 5' - AGCTGGCGGTAACAAATACG - 3' e Reverse 5' - ACCTGATCCACCAATTCTGC - 3') (DE ASSIS *et al.*, 2015). As condições de reação foram as mesmas para todas as amostras, sendo as seguintes: 50°C por 2 minutos (pré-aquecimento); 95°C por 30 segundos (desnaturação inicial); 95°C por 15 segundos (desnaturação); 60°C por 30 segundos (hibridização) sendo os dois últimos passos repetidos 40 vezes; 95°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto seguido por aquecimento

gradativo de 1°C/segundo até 95°C, permanecendo por 15 segundos, sendo os três últimos passos referentes a curva de Melt. A reação possui volume final de 25µl dos quais: 8,9µl de água Milli-Q, 12,5µl de SYBR Mix (2X), 0,3µl para cada um dos iniciadores (10µM) e 3µl de DNA (100ng/µL). Todas as reações foram realizadas em triplicatas. A eficiência de amplificação para todas as corridas e também a quantificação absoluta de DNA, em número de moléculas, foram fornecidas pelo programa do próprio equipamento (Applied Biosystems StepOne™ Systems).

3.7 Transformação genética de *F. verticillioides* com o gene DsRed

3.7.1 Linhagens, vetor de transformação e condições de cultivo

A linhagem desarmada de *A. tumefaciens* EAH105 contendo o vetor binário pCAM-DsRed foi usada na transformação do isolado MMBF 227/12 de *Fusarium verticillioides*, e foi cedida pela Profa. Dra. Maria Carolina Quecine Verdi (Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP). A transformação genética foi realizada utilizando-se o vetor binário pCAM-DsRed, que confere fluorescência vermelha, contendo o gene hph, que confere resistência a higromicina-B como marcador de seleção. As condições de cultivo e as características do vetor foram descritas por Bernardi-Wenzel *et al.* (2015).

O vetor binário de transformação pCAM-DsRed (Eckert *et al.*, 2005) contém a região T-DNA, o gene hph de *E. coli* com promotor PgpdA de *Aspergillus nidulans*, e o gene DsRed de *Discosoma sp.*

3.7.2 Teste de sensibilidade à higromicina-B

Discos de micélio de 5mm de diâmetro do isolado MMBF 227/12 de *Fusarium verticillioides*, foram crescidos em meio BDA por cinco dias a 24°C e fotoperíodo de 12 horas de luz, foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA acrescido de higromicina-B (Invitrogen), nas concentrações de 50, 150 e 300µg/mL. Discos de micélio também foram transferidos para meio BDA sem o antibiótico. As placas foram mantidas a 24°C e fotoperíodo de 12 horas de luz. O

crescimento micelial foi monitorado por dez dias. A concentração de 300ug/ml de higromicina B foi eficiente em inibir totalmente o crescimento micelial, sendo que, deste ponto em diante foi utilizada essa concentração.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três repetições por concentração do antibiótico (uma placa = unidade experimental).

3.7.3 Preparo dos conídios

Discos de micélio foram transferidos para placas com meio BDA, que, posteriormente, foram mantidas a 24°C e fotoperíodo de 12 horas de luz por 15 a 20 dias. Visto que os ensaios de transformação foram realizados tanto com conídios não germinados (NG) quanto com conídios germinados, determinou-se o tempo no qual os conídios iniciavam a germinação. Assim, uma suspensão de 10^6 conídios/mL foi plaqueada em meio BDA e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 24°C e os conídios foram periodicamente visualizados quanto a emissão de tubo germinativo a fim de determinar o tempo no qual a maioria dos conídios estavam com tubo germinativo visível (~6h).

3.7.4 Transformação de *F. verticillioides* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

O procedimento de transformação foi descrito por Bernardi-Wenzel *et al.* (2015), com modificações. Colônias isoladas da linhagem EAH105 de *A. tumefaciens*, contendo um vetor binário pCAMDsRed, foram transferidas para 15mL de meio YEP líquido (10g extrato de levedura, 10g peptona, 5g NaCl, água destilada para completar 1000mL, pH 7.0) acrescidos dos antibióticos canamicina (100µg/mL) e rifampicina (100µg/mL). Os frascos foram incubados a 28°C sob agitação (200rpm) por 18 horas. Após, as culturas foram diluídas a uma densidade óptica de 0,1 (OD660) em 20 mL de meio indutor (IM) autoclavado (10mM K₂HPO₄; 2,5mM NaCl; 2mM MgSO₄; 0,7mM CaCl₂; 9µM FeSO₄; 4mM NH₄SO₄; 10mM glicose, 0.5% glicerol, pH 5.3). Adicionou-se ao IM, 1M de ácido 2-(N-morpholino) etanossulfônico (MES) esterilizado por filtração, com ou sem adição de 200µM de acetosseringona.

As culturas diluídas foram incubadas a 28°C até alcançar uma densidade óptica de 0,4 (OD₆₆₀) e misturadas com suspensão de 10⁶ conídios/mL do isolado endofítico e patogênico, germinado e não germinado. O co-cultivo de *A. tumefaciens* e *F. verticillioides* foi feito pela mistura de 100µL da suspensão de conídios com 100µL de *A. tumefaciens*, sobre membrana de nitrocelulose (BioRad, EUA) em placas de Petri contendo IM sólido (IM líquido acrescido de 1% de ágar), MES e acetosseringona. As placas foram incubadas a 24°C por 72 h. Após este período, as membranas foram transferidas para meio BDA com higromicina B (300µg/mL), para a seleção dos transformados, e cefoxitina sódica (200µg/mL), que inibe crescimento de células de *A. tumefaciens*. Os transformados obtidos após sete dias de incubação foram transferidos para placas contendo BDA com higromicina B (300µg/mL) e cefoxitina sódica (300µg/mL).

Para a visualização de fluorescência, conídios e micélio foram transferidos para lâminas de vidro contendo ddH₂O, que foram cobertas com lamínula. As lâminas foram visualizadas em microscópio confocal Olympus® FV1000, usando o filtro TRITC (545nm). As imagens foram analisadas no programa Olympus Fluoview FV10-ASW. O isolado selvagem foi usado como controle.

3.7.5 Confirmação da transformação

A presença do T-DNA no genoma foi confirmada pela detecção do gene de resistência a higromicina-B (fragmento de 600pb) por meio da amplificação com os primers *hpb* (Forward - TTTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT e Reverse - CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG). As condições de reação foram as seguintes: 94°C por 10 minutos (desnaturação inicial); 94°C por 30 segundos (desnaturação); 66°C por 30 segundos (anelamento); 72°C por 45 segundos (síntese) sendo os três últimos passos repetidos 30 vezes; 72°C por 10 minutos (extensão final). A reação possui volume final de 25µl dos quais: 17,9µl de água Milli-Q, 2,5µl de tampão High Fidelity PCR (10X) Platinum®, 1µl de MgSO₄ (50mM), 0,5µl para cada um dos iniciadores (10µM), 2µl de DNA (50ng/µL) e 0,1µl de Platinum® *Taq* DNA polymerase High Fidelity (5U/µl). A visualização dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%.

3.7.6 Avaliação das características culturais e estabilidade mitótica

Após a transformação, o isolado, transformante e selvagem, foram avaliados quanto ao índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), morfologia das colônias e a produção de conídios. Para cada isolado, discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram transferidos para placas com meio BDA. As placas foram mantidas a 24°C e fotoperíodo de 12 horas de luz.

Para a estabilidade mitótica, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram transferidos para placas com BDA. As colônias crescidas foram repicadas sucessivamente por sete vezes a cada três semanas, sendo todas as repicagens feitas em meio BDA contendo higromicina-B (300µl/ml). Os transformantes foram analisados no microscópio confocal Olympus® FV1000, usando o filtro TRITC (545nm) para verificar se a expressão do gene de fluorescência foi mantida após transferências sucessivas.

As colônias com fluorescência estável e que não apresentaram mudança de coloração, morfologia produção de conídios, velocidade de crescimento em comparação ao isolado selvagem foram selecionadas.

3.7.7 Avaliação do desenvolvimento de *D. saccharalis* na presença do *F. verticillioides* transformado

Após a obtenção do fitopatógeno transformado, foi feita uma suspensão de 10^6 esporos, e inoculada em dietas artificiais sem fungicida, em tubos de vidro, e aguardou-se cinco dias para crescimento micelial. Colocou-se três lagartas de 4º instar em cada tubo com *F. verticillioides* transformado e selvagem, num total de dez repetições por tratamento, utilizando delineamento inteiramente casualizado.

Avaliou-se o período para fase pupal e a taxa de mortalidade. Os dados foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA), sendo o teste F não significativo, portanto não houve alterações na transformação que afetasse o comportamento da *D. saccharalis* em comparação ao selvagem.

3.8 Experimento de quantificação da presença de *F. verticillioides*, *C. falcatum* e *A. nidulans* durante o período de desenvolvimento da broca-da-cana

Todo desenvolvimento das lagartas e fungos foi feito em tubos estéreis e fechados com algodão estéril, sendo manejados somente em capela. Utilizou-se o *A. nidulans* por não ser relacionado com a patogênese em cana, não ter qualquer atratividade pela *D. saccharalis* e não provocar expressão da SUGARWIN2.

3.8.1 Inoculação de fungos e de *D. saccharalis* em dietas artificiais

Utilizou-se dieta artificial (15 ml) segundo King & Hartley (1985) sem agentes fungicidas (tabela 1), em tubos de vidro (8,5cm de comprimento por 1,5cm de largura), inoculadas com suspensão de 10^5 esporos de *F. verticillioides*, *C. falcatum* ou *A. nidulans*, e sem fungos (controle negativo) aguardando cinco dias com fotoperíodo de 12h e três dias no escuro para o crescimento, respectivamente. Iniciou-se introduzindo cinco lagartas de 4º instar por tubo contendo os fungos e sem fungo. Para a geração inicial inoculou-se cinco lagartas de 1º instar (recém eclodidas) em tubos sem fungo.

3.8.2 Fases de análise

Foram analisados três estádios de desenvolvimento após a introdução das lagartas de 4º instar, sendo lagartas de 5º instar (separando-se o intestino do restante do corpo com auxílio de uma pinça e bisturi, sendo avaliado a lagarta sem intestino em relação com seu intestino correspondente), pupas e adultos separados por sexo (os adultos foram avaliados anteriormente ao acasalamento).

A sexagem pupal e coleta foi feita após três dias do início da fase, sendo que as não coletadas seguiram em gaiolas estéreis vedadas e umidificadas até a fase adulta, a qual coletou-se os adultos até o 2º dia de vida, sendo até então, criados separadamente.

Foi feito o cruzamento de cinco casais por tratamento para dar início a geração inicial, avaliando-se os ovos, lagartas inteiras de 3º instar e lagartas de 5º instar divididas em intestino e sem intestino.

Cada avaliação contou com três repetições, sendo que cada repetição de ovos conteve aproximadamente 150 ovos. O experimento foi repetido três vezes.

Após todas as coletas, as amostras de lagartas, intestinos, pupas, adultos e ovos, foram acondicionadas individualmente em microtubos de 2 ml e armazenadas a -80 °C, até a fase de extração de DNA.

3.8.3 Método de avaliação

Foi feita a extração de DNA genômico amostras (lagartas, intestinos, pupas, adultos e ovos de *D. saccharalis*), quantificação, padronização da concentração (100ng/μl) e então submetidas a RT-qPCR, onde avaliou-se o número de moléculas de cada fungo ao decorrer do desenvolvimento da *D. saccharalis* (fases citadas anteriormente), se houve passagem para os ovos e para a geração seguinte. Foi feita análise estatística agrupada da geração inoculada e da geração inicial, assim como análise individual de cada fase de desenvolvimento. As avaliações foram feitas contendo apenas um indivíduo ou parte de um indivíduo.

3.9 Experimento de identificação da presença de *F. verticillioides* DsRed em intestinos de *D. saccharalis*

Foram utilizadas lagartas de 5º instar, criadas em dieta artificial sem fungo e inseridas em dietas fúngicas no 4º instar, contendo *F. verticillioides* transformado com DsRed, *A. nidulans* transformado com GFP e sem fungo (controle negativo), para avaliar como se localizam esses fungos no intestino. Foi utilizado cinco indivíduos por tratamento, sendo o experimento repetido duas vezes. Após a coleta das lagartas, com auxílio de uma pinça e bisturi, foram retirados os intestinos e preparadas lâminas para análise.

A análise foi feita em microscópio confocal Olympus® FV1000, usando o filtro TRITC (545nm) para verificar se a expressão do gene DsRed de fluorescência vermelha e o filtro EYFP (514nm) para expressão do gene GFP de fluorescência verde. Utilizou-se a objetiva de 40X em todas as imagens capturadas.

Foram utilizadas 20 regiões (0,1009 mm²/região) aleatórias de cada intestino (2,0172 mm²/intestino), as quais foram divididas em 36 quadrantes (0,0028 mm²/quadrante), sendo feita uma avaliação percentual da presença fúngica (fluorescência), utilizou-se cinco repetições, sendo o experimento repetido duas vezes.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da presença de *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum* em *Diatraea saccharalis* da geração inoculada

Inicialmente para analisar se os fungos estudados permanecem presente na *D. saccharalis* ao longo do seu desenvolvimento e em seus descendentes, lagartas foram alimentadas com dietas contendo os três diferentes fungos, *F. verticillioides* ou *C. falcatum* ou *A. nidulans* (utilizado como controle por não ser patógeno de cana-de-açúcar) ou em dieta controle, sem nenhum tipo de contaminação (Figura 3).

A análise da presença dos fungos por qRT-PCR mostrou que o *F. verticillioides* permanece presente no ciclo de desenvolvimento da *D. saccharalis*, desde a fase larval até a fase adulta, tanto nos machos quanto nas fêmeas (Figura 3). A concentração deste fungo é decrescente à medida que se avança no ciclo da lagarta, ou seja, do fim da fase larval, passando pela fase de pupa até chegar ao inseto adulto. Por outro lado, a presença do fungo *C. falcatum* restringiu-se à fase pupal, não sendo observada a presença do fungo na fase adulta, em contraste ao observado para o fungo *F. verticillioides*. O fungo *A. nidulans* foi utilizado como controle e, como esperado, sua presença foi praticamente nula, não sendo detectado em adultos fêmeas e não diferindo estatisticamente do controle negativo em todo ciclo de desenvolvimento da *D. saccharalis*. Não foi detectado nenhum organismo nas amostras do controle negativo.

No ciclo pré-inoculado com *F. verticillioides* (Figura 3), a quantificação mostrou uma diferença significativa entre as fases de desenvolvimento do inseto, onde lagartas de 5º instar ficaram em primeiro (diferindo significativamente entre intestino e lagarta sem intestino), seguida pela pupa fêmea, pupa macho, e ambos adultos, que não se diferiram estatisticamente. Já em relação a análise de cada fase, em todas o *F. verticillioides* foi superior aos outros fungos.

Em relação ao *C. falcatum* (Figura 3), apenas a lagarta de 5º instar apresentou diferença significativa (não diferindo intestino e lagarta sem intestino, ou seja, tanto o intestino quanto o restante do corpo apresentam a mesma quantidade de fungo, estatisticamente). O restante das fases não apresentou diferença com o controle negativo.

Uma abordagem complementar por microscopia confocal para a presença e quantificação dos fungos nas lagartas de *D. saccharalis* confirmou as observações a partir da análise por qRT-PCR (Figura 4a). Neste estudo com *F. verticillioides* e *A. nidulans* foi possível identificar a presenças destes fungos no interior do intestino de lagartas de 5º instar criadas em dietas artificiais inoculadas (geração inoculada) e em dieta sem contaminantes (geração inicial), corroborando com os resultados obtidos por qRT-PCR.

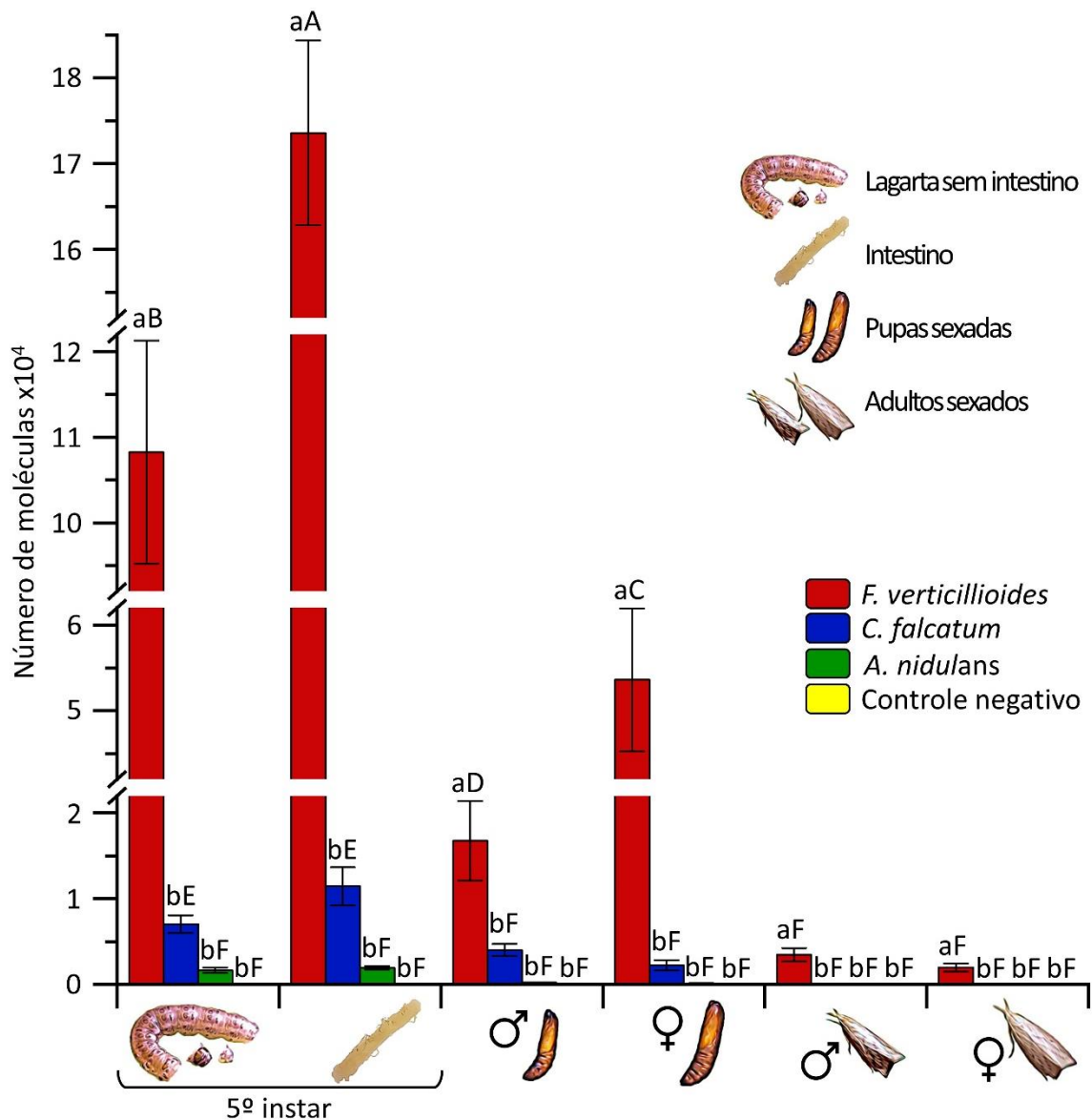


Figura 3 - Quantificação de *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum falcatum* e *Aspergillus nidulans* em *Diatraea saccharalis* da geração inoculada. Foram inoculadas lagartas de 3º instar em dietas contendo *F. verticillioides* ou *C. falcatum* ou *A. nidulans* ou sem fungo (controle negativo), avaliando-se todos os estádios de desenvolvimento do inseto. As quantificações foram realizadas por qRT-PCR, utilizando o método da curva padrão e o gene ITS para *F. verticillioides* e *C. falcatum*, e TubC para *A. nidulans*. Os valores plotados são relativos à média de três amostras (\pm erro padrão), sendo o experimento repetido três vezes. Letras diferentes, minúsculas (avaliação individual de cada fase de desenvolvimento) e maiúsculas (avaliação de todo o ciclo de desenvolvimento), indicam diferenças significativas entre os tratamentos, utilizando teste de comparação de médias, Scott & Knott ($P \leq 0,05$).

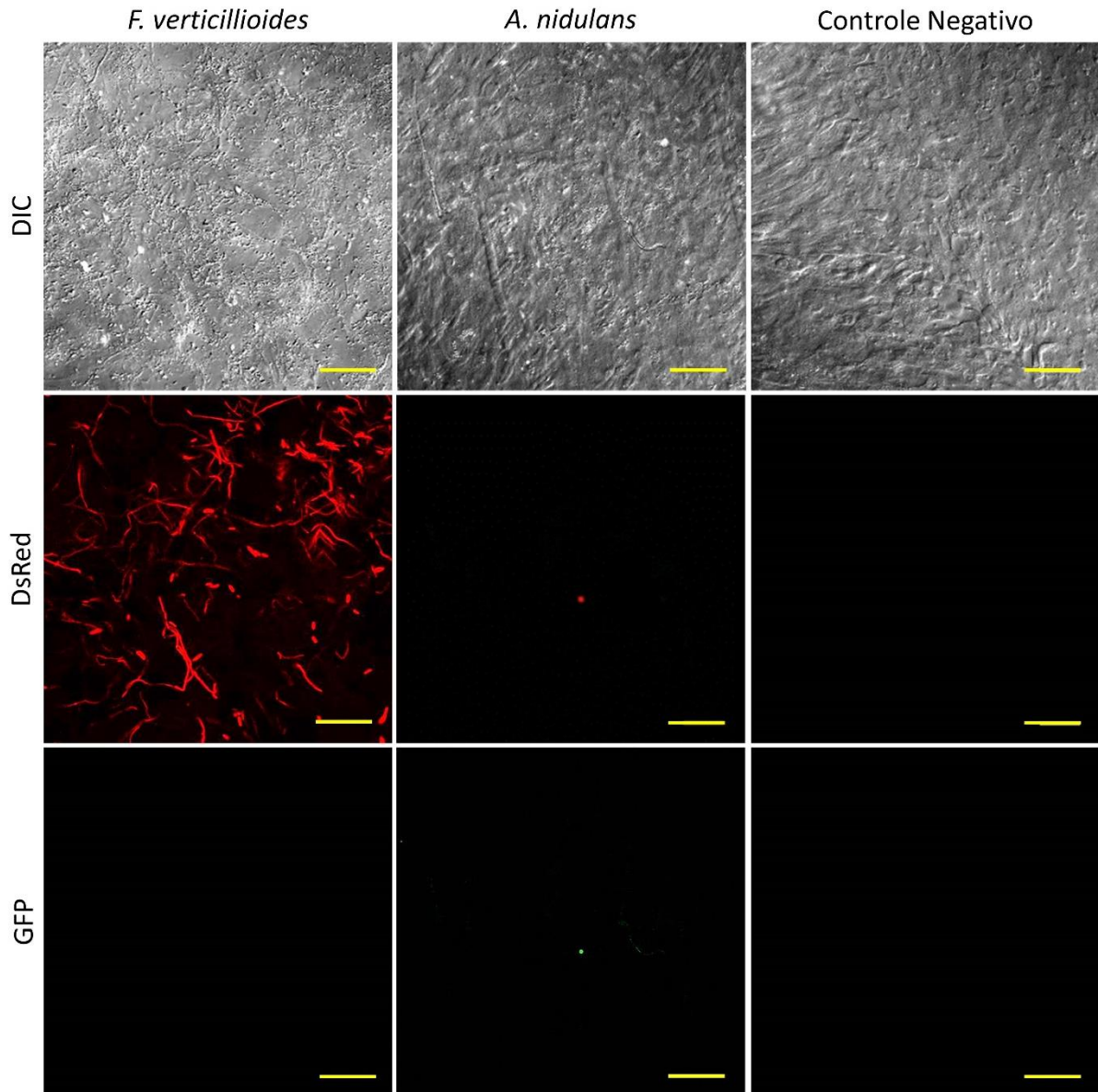


Figura 4a - Ensaio com *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus nidulans* em intestinos de *Diatraea saccharalis* da geração inoculada. Microscopia do intestino de *D. saccharalis* de 5º instar alimentada, desde o 4º instar, com dieta colonizada por *F. verticillioides* contendo o gene DsRed (coloração vermelha) ou *A. nidulans* contendo gene mRFP (coloração vermelha), e GFP (coloração verde) ou sem qualquer contaminação (controle negativo). Utilizou-se microscopia confocal a laser, Olympus® FV1000, objetiva com aumento de 40X, sendo as barras representando 50µm.

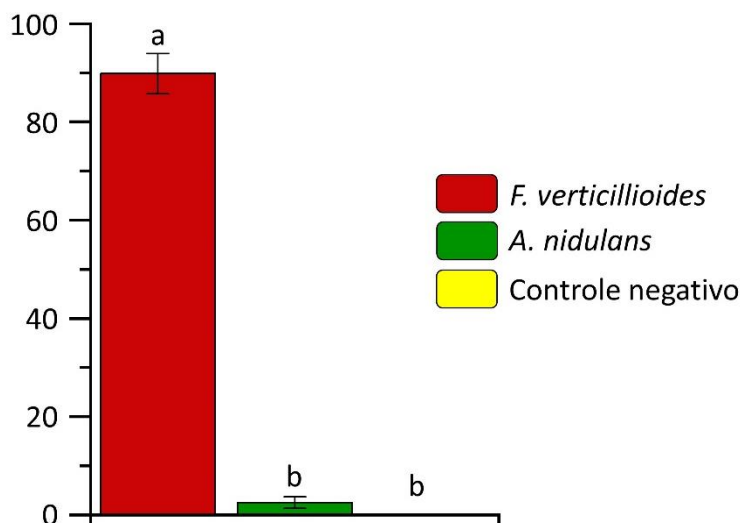


Figura 4b – Porcentagem de *Fusarium verticillioides* e *A. nidulans* em intestinos de *Diatraea saccharalis* da geração inoculada. Microscopia do intestino de *D. saccharalis* de 5º instar alimentada, desde o 4º instar, com dieta colonizada por *F. verticillioides* contendo o gene DsRed (coloração vermelha) ou *A. nidulans* contendo gene mRFP (coloração vermelha), e GFP (coloração verde) ou sem qualquer contaminação (controle negativo). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, utilizando teste de comparação de médias, Scott & Knott ($P \leq 0,05$).

Os intestinos das lagartas de 5º instar criadas em dietas inoculadas com *Fusarium verticillioides* transformado apresentaram quase que sua totalidade contendo o respectivo patógeno (Figura 4a), sendo contabilizado 89,83% (Figura 4b) da sua área compreendida por hifas ou esporos do fungo, e apenas 10,17% por compostos da dieta. Em contrapartida, o *Aspergillus nidulans* foi encontrado em apenas 2,52% da área intestinal das lagartas criadas em dietas inoculadas com o respectivo fungo (Figura 4a), sendo sua totalidade praticamente vazia (Figura 4b), mostrando a não preferência da *D. saccharalis* pelo *A. nidulans*. Outra diferença observada em relação ao *F. verticillioides*, foi relativa a estrutura do fungo, onde apenas se encontrou esporos do *A. nidulans* nos intestinos.

4.2 Avaliação da presença dos fungos *F. verticillioides* e *C. falcatum* em descendentes de *D. saccharalis*

Para verificar se os fungos são transmitidos para seus descendentes (Figura 5), ou seja, se há transmissão vertical, analisou-se a presença dos patógenos nas posturas da *D. saccharalis*. E

também se esses patógenos permanecem presentes no decorrer da fase larval do inseto.

Em relação ao *C. falcatum* não foi detectada sua presença nos ovos de *D. saccharalis* da geração inicial, e conseqüentemente também não foi detectado no decorrer do ciclo de desenvolvimento do inseto (Figura 5). Este resultado era de certa forma esperado por não ter sido encontrado traços do fungo nos parentais (avaliado anteriormente ao acasalamento), uma vez que é necessária a presença do simbionte no hospedeiro materno para a passagem à geração seguinte. Deste modo, não há transferência vertical do *C. falcatum* pela *D. saccharalis*, sugerindo-se uma forma de transferência horizontal deste patógeno na cultura da cana-de-açúcar. Não houve diferença significativa dos tratamentos com *C. falcatum* e o controle negativo, uma vez que não foram detectados fungos em ambos.

Ao analisar os tratamentos com *A. nidulans* (Figura 5), embora as fêmeas adultas não terem apresentado o fungo antes do acasalamento, foi identificado uma pequena quantidade nos ovos. Esta ocorrência pode ter ocorrido no acasalamento, uma vez que os machos apresentaram fungo. Porém a quantidade encontrada nos ovos é quase insignificante, não sendo diferida estatisticamente do controle negativo, onde o resultado obtido é nulo. Contudo, *A. nidulans* de alguma forma, causa danos ao desenvolvimento dos ovos, sendo a grande maioria não fecundada, e as poucas lagartas eclodidas acabaram morrendo logo após a eclosão.

Os resultados obtidos por meio dos ensaios com microscopia confocal dos descendentes também se corroboram com os obtidos por qRT-PCR, mantendo altas quantidades de *F. verticillioides* no interior dos intestinos de lagartas de 5º instar (Figura 6a).

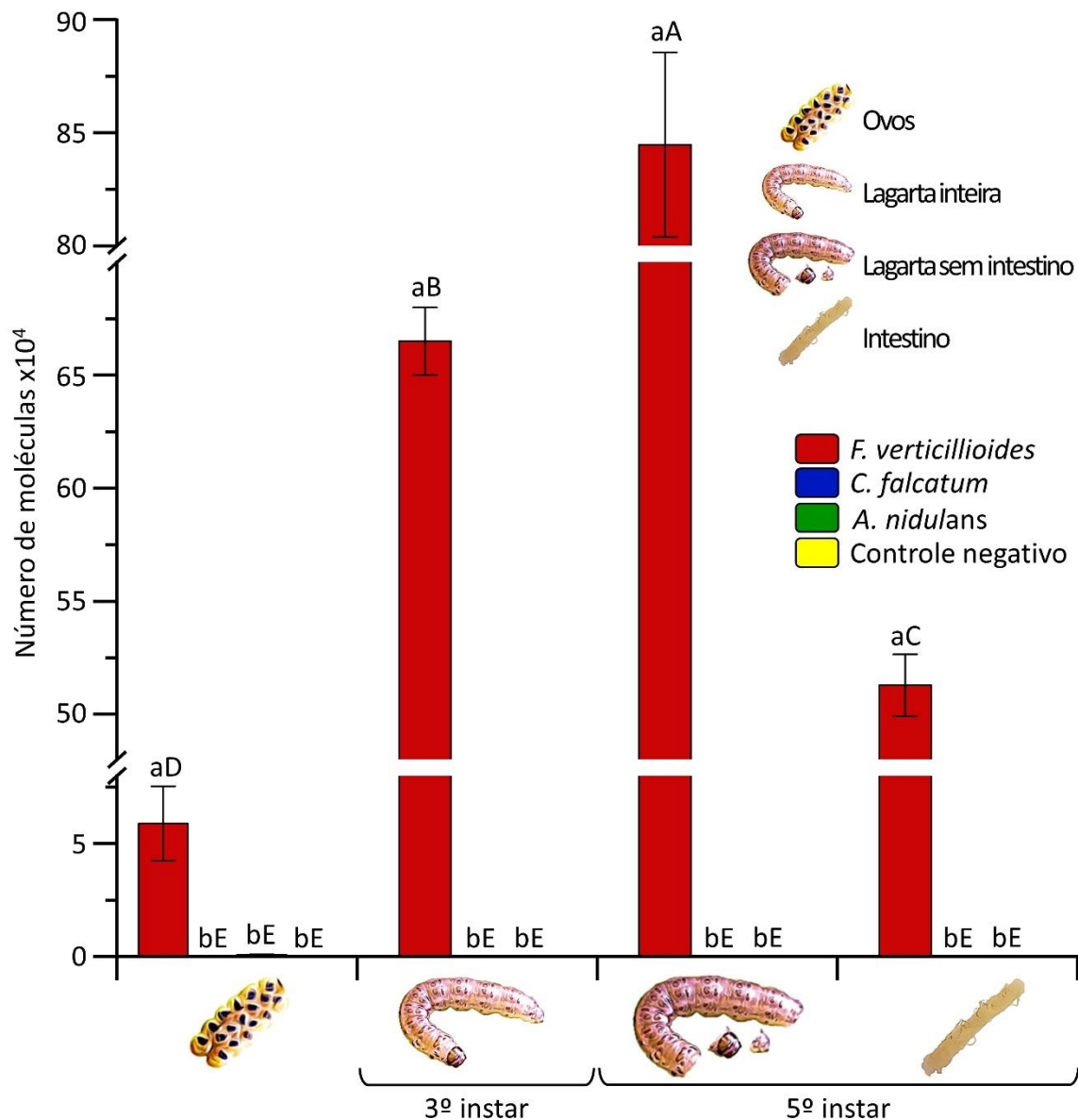


Figura 5 - Quantificação de *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum falcatum* e *Aspergillus nidulans* em *Diatraea saccharalis* da geração inicial (somente quantificou-se *A. nidulans* nos ovos). Foram inoculadas lagartas de 1º instar (recém eclodidas) em dietas sem contaminantes, avaliando-se a postura da geração inoculada, lagarta inteira de 3º instar e lagarta de 5º instar sem intestino e seu intestino correspondente, sendo que, os ovos vindos da geração inoculada com *A. nidulans* ou não se desenvolveram (não houve eclosão das lagartas), ou as lagartas morreram assim que eclodiram. As quantificações foram realizadas por qRT-PCR, utilizando o método da curva padrão e o gene ITS para *F. verticillioides* e *C. falcatum*, e TubC para *A. nidulans*. Os valores plotados são relativos à média de três amostras (\pm erro padrão), sendo o experimento repetido três vezes. Letras diferentes, minúsculas (avaliação individual de cada fase de desenvolvimento) e maiúsculas (avaliação de todo o ciclo de desenvolvimento), indicam diferenças significativas entre os tratamentos, utilizando teste de comparação de médias, Scott & Knott ($P \leq 0,05$).

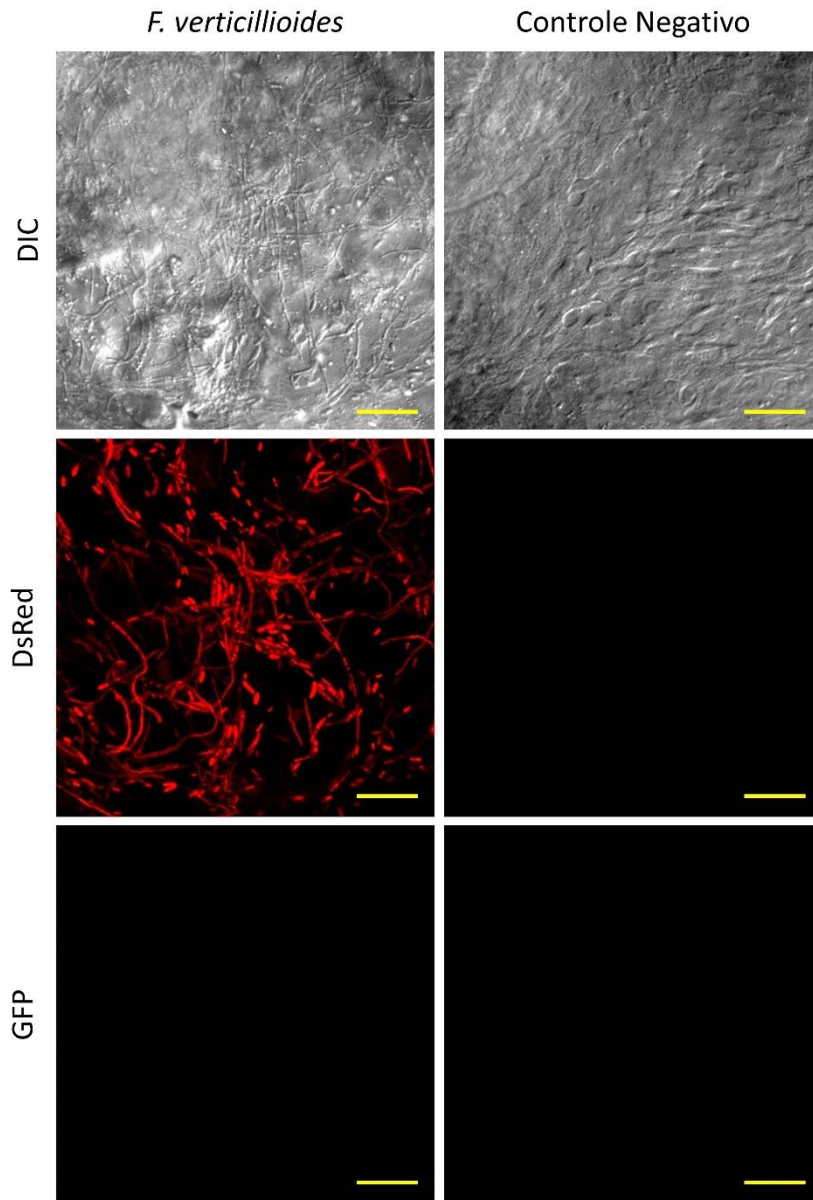


Figura 6a - Ensaio com *Fusarium verticillioides* em intestinos de *Diatraea saccharalis* da geração inicial. Microscopia do intestino de *D. saccharalis* de 5º instar da geração inicial, sendo que foram inoculadas em dietas sem contaminantes após eclosão. As posturas relativas a geração inoculada com *A. nidulans* ou não se desenvolveram (não houve eclosão das lagartas) ou as lagartas morreram assim que eclodiram, não sendo possível a respectiva avaliação. Utilizou-se microscopia confocal a laser, Olympus® FV1000, objetiva com aumento de 40X, sendo as barras representando 50µm.

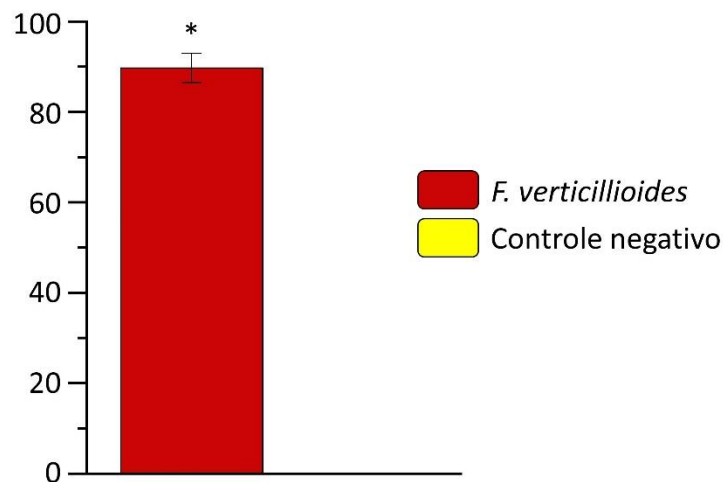


Figura 6b - Porcentagem de *Fusarium verticillioides* em intestinos de *Diatraea saccharalis* da geração inicial. Microscopia do intestino de *D. saccharalis* de 5º instar da geração inicial, sendo que foram inoculadas em dietas sem contaminantes após eclosão. As posturas relativas a geração inoculada com *A. nidulans* ou não se desenvolveram (não houve eclosão das lagartas) ou as lagartas morreram assim que eclodiram, não sendo possível a respectiva avaliação. * indica diferença significativa entre os tratamentos segunda análise de variância ($P \leq 0,05$).

A quantidade de fungo encontrada nos intestinos de brocas criadas em dietas com *F. verticillioides* da geração inicial (Figura 6b), foi praticamente igual ao encontrado na geração inoculada (Figura 4b). Este valor (aproximadamente 90%) e esta semelhança mostra a preferência da *D. saccharalis* pelo fungo e o constante comportamento alimentar ao passar de geração. A estrutura fúngica encontrada também se manteve, com presença de hifas e esporos (Figura 6a). Os intestinos das lagartas criadas em dietas sem fungo permaneceram não apresentando respostas com o passar de gerações, sendo feita uma completa varredura em busca de elementos fluorescentes.

5. DISCUSSÃO

A hipótese de que as lagartas de *D. saccharalis* são vetores dos fungos *F. verticillioides* e *C. falcatum* foi levantada no laboratório a partir das observações de uma associação simbiótica entre os organismos. Inicialmente, foi demonstrado que a cana-de-açúcar ao ser atacada pela broca induz proteínas (SUGARWIN1 e SUGARWIN2) que atuam na proteção da planta contra patógenos oportunistas (Medeiros *et al.*, 2012; Franco *et al.*, 2014; Franco *et al.*, 2017). A observação de que os genes que codificam estas proteínas eram fortemente induzidos pela herbivoria de *D. saccharalis* sem, entretanto, interferir no desenvolvimento dos insetos e que seus efeitos eram restritos aos fungos *F. verticillioides* e *C. falcatum*, orientou estudos para elucidar esta interação.

Um recente estudo mostrou que o desenvolvimento das lagartas de *D. saccharalis* era fortemente estimulado pela presença dos fungos *F. verticillioides* e *C. falcatum* e por outro lado, o ataque da broca em cana-de-açúcar aumentava consideravelmente a infecção pelo fungo *C. falcatum*, sugerindo uma relação simbiótica entre estes organismos (Franco *et al.*, manuscrito em preparação). Além disso, foi verificada a existência de compostos voláteis emitidos tanto por *F. verticillioides* quanto *C. falcatum* que atraem lagartas de *D. saccharalis*. Um experimento adicional mostrou que dietas artificiais com a presença dos fungos aumentavam a atratividade das lagartas em 83% para *F. verticillioides* e 72% para *C. falcatum*, respectivamente (Franco *et al.*, manuscrito em preparação).

Os resultados desse trabalho mostram que após a broca-da-cana entrar em contato com *F. verticillioides*, este permanece presente em todas as fases de desenvolvimento do inseto (Figura 3), tanto nos indivíduos machos quanto nas fêmeas, o que é raro em uma interação simbiótica. Além disso, observamos a presença da transferência vertical desse fungo, sendo passado hereditariamente, por meio de sua identificação nos ovos (Figura 5).

O fato do *F. verticillioides* ser um simbionte de *D. saccharalis*, transmitido verticalmente, é reforçado pelo ensaio de microscopia (Figura 4a e 6). O qual verificou-se que quase a totalidade do intestino do inseto é contido pelo fungo (Figura 4b e 6b). Circunstancia esta observada em outras relações simbióticas entre insetos e bactérias, onde estas vivem no sistema digestório do hospedeiro. Um exemplo é em relação as formigas carpinteiras e a endossimbionte *Blochmannia*, onde a bactéria

permanece dentro do intestino das formigas participando da síntese de aminoácidos essenciais ao inseto, e também ajuda na preservação e desenvolvimento das formigas (Zientz *et al.*, 2006).

Outra associação simbiote envolvendo a presença abundante do microrganismo no intestino hospedeiro é encontrada em gafanhotos (*Melanoplus sanguinipes*). A bactéria *Pantoea agglomerans*, fixada no intestino, auxilia na defesa do inseto, produzindo compostos com ações antimicrobianas (Dillon; Charnley, 1995). Esta relação simbiote é identificada em diversos insetos, como cochonilhas (*Planococcus citri*) e *Tremblaya princeps*, psilídeos (*Diaphorina citri*) e *Candidatus Carsonella ruddii*, pulgão-da-ervilha (*Acyrtosiphon pisum*) e *Buchnera* sp., entre outros (Thao *et al.*, 2000; Baumann; Moran: Baumann, 2002).

Há raros relatos de relações simbióticas entre fungos e insetos, onde o simbiote é transferido verticalmente. Um estudo recente demonstrou essa relação entre o besouro de chifre longo asiático e o fungo *Fusarium solani*, o qual identificou-se a presença do simbiote nas superfícies dos ovos após a postura. Porém não se observou a presença desse fungo no sistema reprodutivo das fêmeas, o que leva a hipótese de que o ambiente pode estar envolvido nessa transmissão (Mason *et al.*, 2018).

Outro trabalho que sugere a ocorrência de transmissão vertical entre fungos e insetos, foi feito com fitófagos (*Sternorrhyncha*) e um fungo associado ao *Ophiocordyceps* sp. (fungo que ocasiona o comportamento “zumbi” de formigas carpinteiras). Neste identificou-se por microscopia, a presença do simbiote no corpo do hospedeiro e também nos ovos (Gomez-Polo *et al.*, 2017).

Estudos mostrando relações simbióticas entre fungos e insetos estão começando a serem iniciados recentemente, sendo o resultado obtido com *F. verticillioides* deste trabalho considerado inédito. Foi feita uma busca na literatura e não foi encontrado resultados relacionados com microrganismos fúngicos simbiotes em *D. saccharalis* e, de *F. verticillioides* como agente simbiote. O caminho percorrido pelo simbiote *F. verticillioides* até o órgão reprodutivo feminino ainda não foi desvendado.

Um fator importante em relação a transmissão do *F. verticillioides* é não omitir a forma de transmissão horizontal. Sendo que, em estudos anteriores observou-se uma alta preferência alimentar da *D. saccharalis* por este simbiote, fazendo com que a inserção do fungo via ambiental também possa estar ocorrendo em conjunto a transmissão vertical (Franco *et al.*, 2017).

Em relação ao fungo *C. falcatum*, não foi observado sua presença em nenhum parental (Figura 3) para que pudesse ocorrer a transmissão vertical, em resultado a isso, também não foi identificado o fungo nos ovos (Figura 5). Com isso, e relacionando aos trabalhos anteriores que mostram, a preferência alimentar e olfativa pelo fungo, é possível inferir que trata de uma relação simbiótica, contudo o simbiote é transmitido horizontalmente entre gerações (Franco *et al.*, 2019).

Esse tipo de transmissão horizontal é um tanto quanto comum em organismos simbiontes, sendo muito estudado em formigas *Attini*, onde apresentam vários fungos e bactérias vivendo em seu interior ou em seus jardins de fungo, onde apresentam um benefício mútuo. Esse estudo com formigas *Attini* é considerado um modelo para o entendimento da simbiose e da transferência horizontal (Chapela *et al.*, 1994; Schultz; Meier, 1995; Green: Mueller; Adams, 2002; Mehdiabadi; Schultz, 2010).

O *A. nidulans* utilizado como um controle por não ter relações patogênicas descritas com a cana-de-açúcar e nem com a *D. saccharalis*, apresentou o papel esperado, uma vez que apresentou quantidades insignificantes na geração inoculada (Figura 3) e não diferiu estatisticamente do controle negativo em nenhuma etapa. Além de acarretar severos danos, não identificados, a postura da *D. saccharalis*, acarretando o não desenvolvimento dos ovos e a morte das lagartas recém eclodidas. Isso corrobora com trabalhos anteriores, onde este fungo não apresentou resultados positivos com os outros organismos estudados (Medeiros *et al.*, 2012; Franco *et al.*, 2017).

Neste estudo se propôs uma nova forma de interação dos fungos *C. falcatum* e *F. verticillioides* com *D. saccharalis*, por meio da transmissão vertical do simbiote. Esta hipótese foi demonstrada no *F. verticillioides* pela identificação de sua presença em todos os estágios de desenvolvimento da geração inoculada (inclusive no adulto fêmea como sendo uma forte característica dessa ocorrência), nos ovos e demais fases da geração inicial. Outro atributo essencial foi a forte presença do simbiote no interior do intestino. Estes fatores ligados aos estudos envolvendo proteínas SUGARWIN (Medeiros *et al.*, 2012), preferência alimentar e presença de compostos voláteis (Franco *et al.*, 2017; Franco *et al.*, 2019), inferem que os fungos oportunistas de cana-de-açúcar são simbiontes da *D. saccharalis*, prevalecendo a ideia de que o *C. falcatum* é transmitido horizontalmente e, instaurando a nova forma de associação do *F. verticillioides* pela transmissão vertical.

Estudos envolvendo o caminho percorrido pelo simbiote *F. verticillioides* até o órgão reprodutor feminino precisam ser realizados para entender melhor como a transmissão vertical

ocorre pela *D. saccharalis*. Sendo este de alta importância tanto para uma maior compreensão global desta interação complexa, quanto para o controle da praga na cultura da cana-de-açúcar, pois está intimamente ligado com a forma de infecção da doença.

6. CONCLUSÃO

O fungo patogênico de cana-de-açúcar, *Fusarium verticillioides*, está presente nos ovos, lagartas, pupas e adultos de *Diatraea saccharalis*, apresentando simbiose com o inseto praga e transmitido verticalmente pelas gerações. Deste modo, assim que a *D. saccharalis* entra em contato com o fungo uma única vez, este permanece no inseto, sendo o mecanismo de infecção da podridão de Fusarium mediado pela broca-da-cana.

O *Colletotrichum falcatum* não foi transmitido para fase adulta de *D. saccharalis* na geração inoculada, não sendo levado adiante. Desta forma, o mecanismo de infecção da podridão vermelha provavelmente é transmitido horizontalmente pela broca-da-cana.

REFERÊNCIAS

- Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 1, p. 35-54, 1998. PubMed PMID: 9529886.
- Agrawal AA, Karban R. Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. **The ecology and evolution of inducible defenses**, p. 45-61, 1999.
- AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 03/01/2019.
- Akman L, Yamashita A, Watanabe H, Oshima K, Shiba T, Hattori M, Aksoy S. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. **Nature genetics**, v. 32, n. 3, p. 402, 2002. doi: 10.1038/ng986. PMID: 12219091.
- Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A. **Manual de Fitopatologia - princípio e conceitos**, 4a. Ed., vol. I, Editora Agronômica Ceres, São Paulo, SP, 2011.
- Anderson JB, Sirjusingh C, Ricker N. Haploidy, diploidy and the evolution of antifungal drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 2004. doi: 10.1534/genetics.104.033266. PMID: 15371350.
- Antoniw JF, Ritter CE, Pierpoint WS, Van Loon LC. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. **Journal of General Virology**, v. 47, n. 1, p. 79-87, 1980. doi: 10.1099/0022-1317-47-1-79.
- Arimura GI, Kost C, Boland W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1734, n. 2, p. 91-111, 2005. doi: 10.1016/j.bbalip.2005.03.001. PMID: 15904867.
- Arimura GI, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W, Takabayashi J. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. **Nature**, v. 406, n. 6795, p. 512, 2000. doi: 10.1038/35020072. PMID: 10952311.
- Banno S, Ochiai N, Noguchi R, Kimura M, Yamaguchi I, Kanzaki S, Murayama T, Fujimura M. A catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase, PKAC-1, regulates asexual differentiation in *Neurospora crassa*. **Genes and Genetic Systems**, Japan, v. 80, n. 1, p. 25-34, Apr. 2005. PMID: 15824453.
- Bargos FF, Lamas WDQ, Bargos DC, Neto MB, Pardal PCPM. Location problem method applied to sugar and ethanol mills location optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 65, pp. 274-282, 2016. doi: 10.1016/j.rser.2016.06.079.
- Bastos IT, Barbosa MHP, Cruz CD, Burnquist WL, Bressiani JA, Silva FD. Análise dialéctica em clones de cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 62, n. 2, p. 199-206, 2003. doi: 10.1590/S0006-87052003000200004.
- Baumann P, Moran NA, Baumann L. Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. **The Prokaryotes: Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology**, p. 403-438, 2006. doi: 10.1146/annurev.micro.59.030804.121041. PMID: 16153167.

- Bayram Ö, Bayram ÖS, Ahmed YL, Maruyama J, Valerius O, Rizzoli SO, Ficner R, Irniger S, Braus GH. The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 7, p. e1002816, 2012. doi: 10.1371/journal.pgen.1002816. PMID: 22829779.
- Begon M, Harper JL, Townsend CR. **Ecology: Individuals, Populations and Communities**. Blackwell Science, 1986.
- Bergmann S, Schumann J, Scherlach K, Lange C, Brakhage AA, Hertweck C. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. **Nature chemical biology**, v. 3, n. 4, p. 213, 2007. doi: 10.1038/nchembio869. PMID: 17369821.
- Bernardi-Wenzel J, Quecine MC, Azevedo JL, Pamphile JA. Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium proliferarum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2015. doi: 10.4238/gmr.15027944. PMID: 27323127.
- Botelho PSM, Parra JRP, Chagas Neto JFO, Carulina PB. Associação do parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. **An. Soc. Entomol. Bras.** [online]. Vol.28, n.3, pp.491-496, 1999. doi: 10.1590/S0301-80591999000300015.
- Botelho PSM. Tabela de vida ecológica e simulação da fase larval de *Diatraea saccharalis* (Fabricius 1794) (Lepidoptera: Crambidae). Tese de Doutorado. **ESALQ/USP**, Piracicaba-SP, 110 p. 1985.
- Bourtzis K, Braig H, Karr T. Cytoplasmic incompatibility. In: Bourtzis K, Miller T, editors. **Insect symbiosis**. New York: CRC Press. pp. 217–246, 2003.
- Boyd LA, Ridout C, O'Sullivan DM, Leach JE, Leung H. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**. 29:233-240, 2013. doi: 10.1016/j.tig.2012.10.011. PMID: 23153595.
- Breznak JA, Brune A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. **Annual review of entomology**, v. 39, n. 1, p. 453-487, 1994.
- Bright M, Bulgheresi S. A complex journey: transmission of microbial symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 218, 2010. doi: 10.1038/nrmicro2262. PMID: 20157340.
- Bucher M., Wolfowicz I, Voss PA, Hambleton EA., Guse A. Development and Symbiosis Establishment in the Cnidarian Endosymbiosis Model *Aiptasia* sp. **Scientific reports**, v. 6, p. 19867, 2016. doi: 10.1038/srep19867.
- Buchner P. Endosymbiosis of animals with plant microorganisms (**Interscience**, New York), p 909. 1965.
- Cafaro MJ, Poulsen M, Little AE, Price SL, Gerardo NM, Wong B, Stuart AE, Larget B, Abbot P, Currie CR. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1713, p. 1814-1822, 2010. doi: 10.1098/rspb.2010.2118. PMID: 21106596.

- Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir BS, Waller, JM, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL, Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas RG, McKenzie EHC, Johnston PR. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 183-204, 2009.
- Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 3, p. 446-459, Sept. 2002. doi: 10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002. PMID: 12208999.
- Campanhola C, Rodrigues GS, Bettiol W. Evolução, situação atual, projeção e perspectiva de sucesso de um programa de racionalização do uso de agrotóxicos no Brasil. **Rodrigues GS. Racionalización del uso de pesticidas en el Cono Sur. Montevideo: Procisur**, p. 43-9, 1998.
- Carreiro SC, Pagnocca FC, Bacci MJr, Bueno OC, Hebling MJ, Middelhoven WJ. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. *Folia Microbiologica*, v. 47, n. 3, p. 259-262, 2002. PMID: 12099266.
- Castro MS, Fontes W. Plant defense and antimicrobial peptides. **Protein and Peptide letters**, v. 12, n. 1, p. 11-16, 2005. PMID: 15638798.
- Cesnik R. Melhoramento da cana-de-açúcar: marco sucro-alcooleiro no Brasil. **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2004.
- Chapela IH, Rehner SA, Schultz TR, Mueller UG. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, v. 266, n. 5191, p. 1691-1694, 1994. doi: 10.1126/science.266.5191.1691. PMID: 17775630.
- China A, Nass H, Daboin C, Díez MD. Enfermedades y Daños de la Caña de Azucar en Latinoamérica. **Imprecolor**, Barquisimeto-Lara- Venezuela, 2000,108p.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento Brasileiro. Boletim cana 2º levantamento, 21. Acessado em 15 de dezembro de 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>
- Currie CR, Scott JA, Summerbell RC, Malloch D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 701, 1999. doi: 10.1038/19519.
- Dalio RJD, Magalhães, DM, Atilio LB, Rodrigues CM, Breton MC, Picchi SC, Pascholati SF, Machado MA. Efeitores nas interações planta-patógeno. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** 22: 25-68, 2014.
- Dangl JL, Jones JD. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature** 411: 826-833, 2001. doi: 10.1038/35081161. PMID: 11459065.
- Daniels J, Roach BT. Taxonomy and evolution. In: D.J Heinz (Ed.), *Sugarcane Improvement through Breeding*. **Elsevier**, New York, pp. 7-84, 1987.
- de Almeida MN, Guimarães VM, Falkoski DL, Visser EM, Siqueira GA, Milagres AM, de Rezende ST. Direct ethanol production from glucose, xylose and sugarcane bagasse by the corn endophytic fungi *Fusarium verticillioides* and *Acremonium zeae*. **Journal of biotechnology**, v. 168, n. 1, p. 71-77, 2013. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.07.032. PMID: 23942376.
- de Assis LJ, Ries LN, Savoldi M, Dinamarco TM, Goldman GH, Brown NA. Multiple phosphatases regulate carbon source dependent germination and primary metabolism in *Aspergillus nidulans*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, p. g3. 115.016667, 2015. doi: 10.1534/g3.115.016667. PMID: 25762568.

- de la Torre-Hernández ME, Sánchez-Rangel D, Galeana-Sánchez E, Plasencia-de la Parra J. Fumonisinás— Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. **TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 17, n. 1, p. 77-91, 2014. doi: 10.1016/S1405-888X(14)70321-3.
- de Souza DJ, Bézier A, Depoix D, Drezen JM, Lenoir A. *Blochmannia* endosymbionts improve colony growth and immune defence in the ant *Camponotus fellah*. **BMC Microbiology**, v. 9, 2009. doi: 10.1186/1471-2180-9-29.
- Degnan PH, Lazarus AB, Wernegreen JJ. Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. **Genome research**, v. 15, n. 8, p. 1023-1033, 2005. doi: 10.1101/gr.3771305. PMID: 16077009.
- Dillon RJ, Charnley AK. Chemical barriers to gut infection in the desert locust: in vivo production of antimicrobial phenols associated with the bacterium *Pantoea agglomerans*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 66, n. 1, p. 72-75, 1995. doi: 10.1006/jipa.1995.1063.
- Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACMD, Landell MGDA. Cana-de-açúcar. **Agrônomo** I, 394-404 p., 2010.
- Dóczi I, Gyetvai T, Kredics L, Nagy E. Involvement of *Fusarium* spp. in fungal keratitis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 773-776, 2004. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.00909.x. PMID: 15355406.
- Douglas AE. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. **Annual review of entomology**, v. 60, p. 17-34, 2015. doi: 10.1146/annurev-ento-010814-020822. PMID: 25341109.
- Douglas AE. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 17-37, 1998. doi: 10.1146/annurev.ento.43.1.17. PMID: 15012383.
- Douglas AE. The microbial dimension in insect nutritional ecology. **Functional Ecology**, v. 23, n. 1, p. 38-47, 2009. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x.
- Duttamajumder SK, Singh N, Agnihotri VP. Behavior of *Colletotrichum falcatum* under waterlogged condition. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 43, n. 2, p. 227-229, 1990.
- Eckert M, Maguire K, Urban M, Foster S, Fitt B, Lucas J, Hammond-Kosack K. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene DsRed and the jellyfish gene GFP. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, n. 1, p. 67-74, 2005. doi: 10.1016/j.femsle.2005.09.041. PMID: 1624345.
- Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, Eisenhaber F. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of molecular biology**, v. 337, n. 2, p. 243-253, 2004. doi: 10.1016/j.jmb.2004.01.025. PMID: 15003443.
- Epple P, Apel K, Bohlmann H. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 3, p. 813-820, 1995. PMID: 8552715.

- Evans HC, Elliot SL, Hughes DP. Hidden diversity behind the zombie-ant fungus *Ophiocordyceps unilateralis*: four new species described from carpenter ants in Minas Gerais, Brazil. **PLoS one**, v. 6, n. 3, p. e17024, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0017024. PMID: 21399679.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Major Food and Agricultural Commodities and Producers online (accessed on 07 September 2018)
- Feldhaar H, Gross R. Insects as hosts for mutualistic bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, p. 1-8, 2009. doi: 10.1016/j.ijmm.2008.05.010. PMID: 18640072.
- Femi-Ola TO, Babalola AG. Microbiology of the gut of the kola nut weevil, *Balanogastriis kolae*. **Journal of Insect Science**, v. 12, p. 1-6, 2012. doi: 10.1673/031.012.8401. PMID: 23421598.
- Flor, H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annu. Rev. Phytopathol.** 9: 275–296, 1971. doi: 10.1146/annurev.py.09.090171.001423.
- Flores M, Hernández-Juárez A, Aguirre LA, Cerna E, Landeros J, Frías GA., Ochoa Y. Susceptibility of genetically modified maize hybrids to sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.)1, at Sinaloa, **Mexico**. **Southwestern Entomologist**, 41 (4), pp 991-998, 2016. doi: 10.3958/059.041.0429.
- Flórez LV, Scherlach K., Gaube P, Ross C, Sitte E, Hermes C, Rodrigues A, Hertweck C, Kaltenpoth, M. Antibiotic-producing symbionts dynamically transition between plant pathogenicity and insect-defensive mutualism. **Nature communications**, v. 8, p. 15172, 2017. doi: 10.1038/ncomms15172.
- Franco FP, Dias RO, Toyama D, Henrique-Silva F, Moura DS, Silva-Filho MC. Structural and functional characterization of PR-4 SUGARWINs from sugarcane and their role in plant defense. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1916, 2019. doi: 10.3389/fpls.2018.01916. PMID: 30666261.
- Franco FP, Moura DS, Vivanco JM, Silva-Filho MC. Plant–insect–pathogen interactions: a naturally complex ménage à trois. **Current opinion in microbiology**, 37, 54-60, 2017. doi: 10.1016/j.mib.2017.04.007
- Franco FP, Santiago AC, Henrique-Silva F, de Castro PA, Goldman GH, Moura DS, Silva-Filho MC. The Sugarcane Defense Protein SUGARWIN2 Causes Cell Death in *Colletotrichum falcatum* but Not in Non-Pathogenic Fungi. **PLoS ONE** 9(3): e91159, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0091159. PMID: 24608349.
- Franco, P. F. Unraveling sugarcane-*Diatraea saccharalis*-opportunistic fungi interaction in sugarcane. 2017. 66 f. Thesis (Doctor in Science. Area: Genetics and Plant Breeding) - University of São Paulo “Luiz de Queiroz” College of Agriculture, São Paulo. 2017.
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Baştürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scacciocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Peñalva MA, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA, Birren BW. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1105, 2005. doi: 10.1038/nature04341. PMID: 16372000.
- Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Batista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD. Manual de Entomologia Agrícola. São Paulo, **Ceres**, 649 p, 1988.

- Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, De Baptista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ. p. 450-462, 2002.
- García-Olmedo F, Molina A, Segura A, Moreno M. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. **Trends in microbiology**, v. 3, n. 2, p. 72-74, 1995. PMID: 7728389.
- Gegner T, Schmidtberg H, Vogel H, Vilcinskis A. Population-specific expression of antimicrobial peptides conferring pathogen resistance in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 3600, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-21781-4.
- Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995. PMID: 7747954.
- Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 43, p. 205-227, 2005. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923. PMID: 16078883.
- Glenn AE, Hinton DM, Yates IE, Bacon CW. Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2973-2981, 2001. doi: 10.1128/AEM.67.7.2973-2981.2001. PMID: 11425710.
- Goldman GH, Kafer E. *Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukaryotes. **Fungal Genet Biol.** 41(4):428-42, 2004. doi: 10.1016/j.fgb.2003.12.001. PMID: 14998526.
- Gomez-Polo P, Ballinger MJ, Lallar M, Malik A, Ben-Dov Y, Mozes-Daube N, Perlman SJ, Iasur-Kruh L, Chiel E. An exceptional family: Ophiocordyceps-allied fungus dominates the microbiome of soft scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccidae). **Molecular ecology**, v. 26, n. 20, p. 5855-5868, 2017. doi: 10.1111/mec.14332. PMID: 28833928.
- Green AM, Mueller UG, Adams RM. Extensive exchange of fungal cultivars between sympatric species of fungus-growing ants. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 2, p. 191-195, 2002. PMID: 11856421.
- Green TR, Ryan CA. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 776-777, 1972. doi: 10.1126/science.175.4023.776. PMID: 17836138.
- Greenberg JT, Yao N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cellular microbiology**, v. 6, n. 3, p. 201-211, 2004. PMID: 14764104.
- Grimaldi D, Engel MS. **Evolution of the Insects**. Cambridge University Press, 2005.
- Guo Z, Doell K, Dastjerdi R, Karlovsky P, Dehne HW, Altincicek B. Effect of fungal colonization of wheat grains with *Fusarium* spp. on food choice, weight gain and mortality of meal beetle larvae (*Tenebrio molitor*). **Plos One**, 9(6), 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0100112. PMID: 24932485.
- Hassan MN, Afghan S, Hafeez FY. Suppression of red rot caused by *Colletotrichum falcatum* on sugarcane plants using plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol**, v. 55, n. 4, p. 531-542, 2010. doi: 10.1007/s10526-010-9298-6.

- Hatcher PE, Paul ND. On integrating molecular and ecological studies of plant resistance: variety of mechanisms and breadth of antagonists. **Journal of Ecology**, 88(4):702-6, 2000. doi: 10.1046/j.1365-2745.2000.00476.x.
- Hejgaard J, Jacobsen S, Bjørn SE, Kragh KM. Antifungal activity of chitin-binding PR-4 type proteins from barley grain and stressed leaf. **FEBS letters**, v. 307, n. 3, p. 389-392, 1992. PMID: 1644196.
- Hoff B, Kamerewerd J, Sigl C, Mitterbauer R, Zadra I, Kürnsteiner H, Kück U. Two components of a velvet-like complex control hyphal morphogenesis, conidiophore development, and penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 8, p. 1236-1250, 2010. doi: 10.1128/EC.00077-10. PMID: 20543063.
- Holupi NT, Roviero JP, Rossato Júnior JAS, Mutton MJR. Produção de etanol utilizando melão proveniente de cana infestada por broca. In: II SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA SUCROENERGÉTICA E DE BIOCOMBUSTÍVEIS. **Ciência & Tecnologia: Suplemento. Fatec-JB, Jaboticabal**, v. 6, p. 178-182, 2014.
- Hsuan HM, Salleh B, Zakaria L. Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from Peninsular Malaysia. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 10, p. 6722-6732, 2011. doi: 10.3390/ijms12106722. PMID: 22072914.
- Hughes DP, Andersen SB, Hywel-Jones NL, Himaman W, Billen J, Boomsma JJ. Behavioral mechanisms and morphological symptoms of zombie ants dying from fungal infection. **BMC ecology**, v. 11, n. 1, p. 13, 2011. doi: 10.1186/1472-6785-11-13. PMID: 21554670.
- Irvine JE. **Theoretical Applied Genetics**, 98: 186-194, 1999.
- Jones JD, Dangl JL. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323, 2006. doi: 10.1038/nature05286. PMID: 17108957.
- Joosten MH, Cozijnsen TJ, De Wit PJ. Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. **Nature**, v. 367, n. 6461, p. 384, 1994. doi: 10.1038/367384a0. PMID: 8114941.
- Kalaimani T, Jayaraj T, Rajenderan B, Thirumurugan A. Review Of The Management Of Sugarcane Red Rot Caused By *Colletotrichum Falcatum* Went In India. **Proc Aust Soc Sugar Cane Technol.** v. 34, p.1 – 9, 2012.
- Kaplan I, Halitschke R, Kessler A, Sardanelli S, Denno RF. Constitutive and induced defenses to herbivory in above-and belowground plant tissues. **Ecology**, v. 89, n. 2, p. 392-406, 2008. PMID: 18409429.
- Kazan K, Schenk PM, Wilson I, Manners JM. DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defence responses. **Molecular Plant Pathology** 2: 177-185, 2001. doi: 10.1046/j.1364-3703.2001.00061.x. PMID: 20573005.
- Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T. An ancient but promiscuous host–symbiont association between *Burkholderia* gut symbionts and their heteropteran hosts. **The ISME journal**, v. 5, n. 3, p. 446, 2011. doi: 10.1038/ismej.2010.150. PMID: 20882057.
- Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T. Diversity of bacterial symbiosis in stinkbugs. **Nova Science Publishers, Inc: New York, USA**, 2008.

- Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T. Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4308-4316, 2007. doi: 10.1128/AEM.00067-07. PMID: 17483286.
- King EG, Hartley GG. 1985. *Diatraea saccharalis*, p. 265-270. In P. Singh & R.F. Moore (eds.), **Handbook of insect rearing**. New York, Elsevier, 329p.
- Krappmann S, Bayram Ö, Braus GH. Deletion and allelic exchange of the *Aspergillus fumigatus veA* locus via a novel recyclable marker module. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 4, n. 7, p. 1298–307, 2005. doi: 10.1128/EC.4.7.1298-1307.2005.
- Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M, Rothstein S. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 21, p. 7542-7546, 1987. PMID: 16593885.
- Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium laboratory manual*. 1. ed. USA: Blackwell Publishing, 388 p., 2006.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 583-593, 1994. PMID: 7954825.
- Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, Kahmann R. Fungal effectors and plant susceptibility. **Annual review of plant biology**, v. 66, p. 513-545, 2015. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114623. PMID: 25923844.
- Mable BK, Otto SP. Masking and purging mutations following EMS treatment in haploid, diploid and tetraploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Genetics Research**, v. 77, n. 1, p. 9-26, 2001. PMID: 11279834.
- Malavazi I. **Caracterização funcional de diferentes componentes das vias metabólicas de resposta ao dano ao DNA no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans***. 2007. 379 p. Tese (Biotecnologia Aplicada à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- Margulis L, Fester R. (Ed.). *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. **Mit Press**, 470 p., 1991.
- Mason CJ, Campbell AM, Scully ED, Hoover K. Bacterial and Fungal Midgut Community Dynamics and Transfer Between Mother and Brood in the Asian Longhorned Beetle (*Anoplophora glabripennis*), an Invasive Xylophage. **Microbial Ecology**, p. 1-13, 2018. doi: 10.1007/s00248-018-1205-1. PMID: 29948017.
- Matsuoka S. Identificação de Doenças da Cana-de-Açúcar e Medidas de Controle. **Santos F, Borém A. Cana-de-açúcar: do plantio à colheita**, p. 89-115, 2013.
- McFarlane SA, Rutherford RS. *Fusarium* species isolated from sugarcane in KwaZulu-Natal and their effect on *Eldana saccharina* (Lepidoptera: Crambidae) development in vitro. In: **Proc S Afr Sug Technol Ass.** p. 120-124, 2005.
- Mckay N. Chemical composition of juice from Louisiana sugarcane injured by the sugarcane borer and the red rot disease. **Journal of Agricultural Research** 52: 0017–0025, 1936.

- Medeiros AH, Franco FP, Matos JL, de Castro PA, Santos-Silva LK, Henrique-Silva F, Goldman GH, Moura DS, Silva-Filho MC. Sugarwin: A sugarcane insect-induced gene with antipathogenic activity. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 25, n. 5, p. 613-624, 2012. doi: 10.1094/MPMI-09-11-0254. PMID: 22250584.
- Mehdiabadi NJ, Schultz TR. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecol. News**, v. 13, p. 37-55, 2010.
- Melchers LS, Apotheker-de Groot M, van der Knaap JA, Ponstein AS, Sela-Buurlage MB, Bol JF, Cornelissen BJ, van den Elzen PJ, Linthorst HJ. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. **The Plant Journal**, v. 5, n. 4, p. 469-480, 1994. PMID: 8012401.
- Metraux JP, Streit L, Staub TH. A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 33, n. 1, p. 1-9, 1988. doi: 10.1016/0885-5765(88)90038-0.
- Mitchell RG, Chaplin AJ, Mackenzie DW. *Emericella nidulans* in a maxillary sinus fungal mass. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 25, n. 5, p. 339-41, June 1987. doi: 10.1080/02681218780000401. PMID: 3323452.
- Mithöfer A, Wanner G, Boland W. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. **Plant Physiology**, v. 137, n. 3, p. 1160-1168, 2005. doi: 10.1104/pp.104.054460.
- Mohammadi A, Nejad RF, Mofrad NN. *Fusarium verticillioides* from sugarcane, vegetative compatibility groups and pathogenicity. **Plant Protection Science**, v. 48, n. 2, p. 80-84, 2013. doi: 10.17221/49/2011-PPS.
- Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 22, p.6115-6116, 1992. PMID: 1461751.
- Monaghan J, Zipfel C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. **Current Opinion in Plant Biology**. 15:349-357, 2012. doi: 10.1016/j.pbi.2012.05.006. PMID: 22705024.
- Mondo SJ, Lastovetsky OA, Gaspar ML, Schwardt NH., Barber CC, Riley R., Sun H, Grigoriev IV, Pawlowska TE. Bacterial endosymbionts influence host sexuality and reveal reproductive genes of early divergent fungi. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1843, 2017. doi: 10.1038/s41467-017-02052-8.
- Morioka E, Oida M, Tsuchida T, Ikeda M. Nighttime activities and peripheral clock oscillations depend on *Wolbachia* endosymbionts in flies. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 15432, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-33522-8. PMID: 30337547.
- Nasir H, Noda H. Yeast-like symbiotes as a sterol source in anobiid beetles (Coleoptera, Anobiidae): Possible metabolic pathways from fungal sterols to 7-dehydrocholesterol. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 52(4):175-82, 2003. doi: 10.1002/arch.10079. PMID: 1265560.
- Nautiyal CS, Mehta S, Singh HB. Biological control and plant-growth promotion by *Bacillus* strains from milk. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 184-192, 2006. doi: 10.5772/54229.

- Nyholm SV, McFall-Ngai MJ. The winnowing: establishing the squid–*Vibrio* symbiosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 632, 2004. doi: 10.1038/nrmicro957. PMID: 15263898.
- Ogunwolu EO, Reagan TE, Flynn JL, Hensley SD. Effects of *Diatraea saccharalis* (F) (Lepidoptera, Crambidae) damage and stalk rot fungi on sugarcane yield in Louisiana. **Crop Protection**. 1991;10(1):57-61. doi: 10.1016/0261-2194(91)90027-o. PMID: A1991EY34300011.
- Oka M, Maruyama J, Arioka M, Nakajima H, Kitamoto K. Molecular cloning and function characterization of *avaB*, a gene encoding Vam6p/Vps39p-like protein in *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiol Lett**. 232:113-21, 2004. doi: 10.1016/S0378-1097(04)00039-4. PMID: 15019743.
- Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. **Plant molecular biology**, v. 42, n. 3, p. 479-488, 2000. PMID: 10798617.
- Oshero N, May GS. The molecular mechanisms of conidial germination. **FEMS Microbiology Letters**, v. 199, n. 2, p. 153-160, 2001. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10667.x. PMID: 11377860.
- Oulhen N, Schulz BJ, Carrier TJ. English translation of Heinrich Anton de Bary's 1878 speech, "Die Erscheinung der Symbiose" ("De la symbiose"). **Symbiosis**, 69(3), 131–139, 2016. doi: 10.1007/s13199-016-0409-8.
- Overholt WA, Ochieng JO, Lammers P, Ogedah K. Rearing and field release methods for *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of tropical gramineous stem borers. **International Journal of Tropical Insect Science**, 15(3), 253-259, 1994. doi: 10.1017/S1742758400017549.
- Paré PW, Tumlinson JH. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant physiology**, v. 121, n. 2, p. 325-332, 1999. PMID: 10517823.
- Pellier AL, Laugé R, Veneault-Fourrey C, Langin T. CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. **Molecular microbiology**, v. 48, n. 3, p. 639-655, 2003. PMID: 12694611.
- Pradeu T. A Mixed Self: The Role of Symbiosis in Development. **Biological Theory**, 6, 80–88, 2011. doi: 10.1007/s13752-011-0011-5.
- Prathima PT, Raveendran M, Kumar KK, Rahul PR, Kumar VG, Viswanathan R, Sundar AR, Malathi P, Sudhakar D, Balasubramaniam P. Differential Regulation of Defense-Related Gene Expression in Response to Red Rot Pathogen *Colletotrichum falcatum* Infection in Sugarcane. **Appl Biochem Biotechnol**. v.171, n.2, p.488-503, 2013. doi: 10.1007/s12010-013-0346-4. PMID: 23861092.
- Prihastuti H, Cai L, Chen H, McKenzie EHC, Hyde KD. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 89-109, 2009.
- Rajagopal R. Beneficial interactions between insects and gut bacteria. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 114-119, 2009. doi: 10.1007/s12088-009-0023-z. PMID: 23100759.
- Resende MLV, Salgado SML, Chaves ZM. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira** 28: 123-130, 2003. doi: 10.1590/S0100-41582003000200001.
- Reynolds HT, Currie CR. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, v. 96, n. 5, p. 955-959, 2004. PMID: 21148916.

- Rodrigues A, Bacci M Jr, Mueller UG, Ortiz A, Pagnocca FC. Microfungal "weeds" in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008. doi: 10.1007/s00248-008-9380-0. PMID: 18369523.
- Rodrigues A, Cable RN, Mueller UG, Bacci M Jr, Pagnocca FC. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungus garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, n. 3, p. 331-342, 2009. doi: 10.1007/s10482-009-9350-7. PMID: 19449210.
- Ruby E, Henderson B, McFall-Ngai M. We get by with a little help from our (little) friends. **Science**, v. 303, n. 5662, p. 1305-1307, 2004. doi: 10.1126/science.1094662. PMID: 14988540.
- Saikia R, Azad P, Arora DK. Toxin produced by *Colletotrichum falcatum* causing red rot of sugarcane. **Mycobiology**, v.32, p.149-154, 2004. doi: 10.4489/MYCO.2004.32.4.149.
- Saksena P, Vishwakarma SK, Tiwari AK, Singh A, Kumar A. Pathological And Molecular Variation In *Colletotrichum Falcatum* Went Isolates Causing Red Rot Of Sugarcane In The Northwest Zone Of India. **Journal Of Plant Protection Research**, v. 53, n. 1, p. 37 – 41, 2013. doi: 10.2478/jppr-2013-0005.
- Santos AS dos. Doenças causadas por fungos. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. de A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico. chap 1, p. 423-435, 2010.
- Santos AV, Dillon RJ, Dillon VM, Reynolds SE, Samuels RI. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, n. 2, p. 319-323, 2004. doi: 10.1016/j.femsle.2004.09.005. PMID: 15476982.
- Sato T, Kuwahara H, Fujita K, Noda S, Kihara K, Yamada A, Ohkuma M, Hongoh Y. Intranuclear verrucomicrobial symbionts and evidence of lateral gene transfer to the host protist in the termite gut. **The ISME journal**, v. 8, n. 5, p. 1008, 2014. doi: 10.1038/ismej.2013.222. PMID: 24335826.
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **PNAS** 97: 11655-11660, 2000. doi: 10.1073/pnas.97.21.11655. PMID: 11027363.
- Schilmiller AL, Howe GA. Systemic signaling in the wound response. **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 4, p. 369-377, 2005. doi: 10.1016/j.pbi.2005.05.008. PMID: 15939667.
- Schmelz EA, Alborn HT, Tumlinson JH. Synergistic interactions between volicitin, jasmonic acid and ethylene mediate insect-induced volatile emission in *Zea mays*. **Physiologia Plantarum**, v. 117, n. 3, p. 403-412, 2003. PMID: 12654041.
- Schmelz EA, Engelberth J, Alborn HT, Tumlinson JH, Teal PE. Phytohormone-based activity mapping of insect herbivore-produced elicitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 2, p. 653-657, 2009. doi: 10.1073/pnas.0811861106. PMID: 19124770.
- Schulthess F, Cardwell KF, Gounou S. The effect of endophytic *Fusarium verticillioides* on infestation of two maize varieties by lepidopterous stemborers and coleopteran grain feeders. **Phytopathology**, v. 92, n. 2, p. 120-128, 2002. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.2.120. PMID: 18943084.

- Schultz TR, Meier R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic entomology**, v. 20, n. 4, p. 337-370, 1995. doi: 10.1111/j.1365-3113.1995.tb00100.x.
- Schwachtje J, Baldwin IT. Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism?. **Plant physiology**, v. 146, n. 3, p. 845-851, 2008. doi: 10.1104/pp.107.112490. PMID: 18316639.
- Schweighofer A, Kazanaviciute V, Scheikl E, Teige M, Doczi R, Hirt H, Schwanninger M, Kant M, Schuurink R, Mauch F, Buchala A, Cardinale F, Meskiene I. The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 19, n. 7, p. 2213-2224, 2007. doi: 10.1105/tpc.106.049585. PMID: 17630279.
- Schwessinger B, Zipfel C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 4, p. 389-395, 2008. doi: 10.1016/j.pbi.2008.06.001. PMID: 18602859.
- Segal BH, DeCarlo ES, Kwon-Chung KJ, Malech HL, Gallin JI, Holland SM. Aspergillus nidulans infection in chronic granulomatous disease. **Medicine**, v. 77, n. 5, p. 345-354, 1998. PMID: 9772923.
- Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BP, De Bolle MF. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant physiology and biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 941-950, 2008. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.06.011. PMID: 18674922.
- Shanchez-Contreras M, Vlisidou I. The diversity of insect-bacteria interactions and its applications for disease control. In: HARDING, S. E. e TOMBS, M. P. (Ed.). **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.25, p.203- 243, 2008. PMID: 21412357.
- Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids Buchnera sp. APS. **Nature**, v. 407, n. 6800, p. 81, 2000. doi: 10.1038/35024074. PMID: 10993077.
- Showler, A. T. Selected Abiotic and Biotic Environmental Stress Factors Affecting Two Economically Important Sugarcane Stalk Boring Pests in the United States. **Agronomy**, 6, 10, 2016. doi: 10.3390/agronomy6010010.
- Silva-Brandão KL, Santos TV, Cônsoli FL, Omoto C. Genetic diversity and structure of brazilian populations of Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Crambidae): Implications for pest management. **Journal of Economic Entomology**, 108 (1), pp. 307-316, 2015. doi: DOI: 10.1093/jee/tou040. PMID: 26470135.
- Simonet P, Duport G, Gaget K, Weiss-Gayet M, Colella S, Febvay G, Charles H, Viñuelas J, Heddi A, Calevro F. Direct flow cytometry measurements reveal a fine-tuning of symbiotic cell dynamics according to the host developmental needs in aphid symbiosis. **Scientific reports**, v. 6, p. 19967, 2016. doi: 10.1038/srep19967. PMID: 26822159.
- Singh K, Singh RP. CHAPTER XII - Red rot. In Hughes C, Ricaud BT, Egan AG, Gillaspie CG. **Diseases of Sugarcane: Major Diseases**. Amsterdam: Elsevier; p. 169-88, 1989.
- Singh RK, Mishra SK, Singh SP, Mishra N, Sharma ML. Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. **Australian Journal of Crop Science**, Southern Cross, v.4, n. 2, p.115-124, 2010.

- Somssich IE, Schmelzer E, Bollmann J, Hahlbrock K. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding “pathogenesis-related” proteins in cultured parsley cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 8, p. 2427-2430, 1986. PMID: 16593684.
- Sreenivasan TV, Ahloowalia BS, Heinz DJ. **Cytogenetics. In: Sugarcane Improvement Through Breeding** (Heinz D. J., ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 211-253, 1987.
- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JD. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268, n. 5211, p. 661-667, 1995. PMID: 7732374.
- Sundar AR., Viswanathan R, Padmanabhan P, Mohanraj D. Studies on the possible use of pathogen toxin as molecular marker for red rot resistance sugarcane. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**. v.34, n. 3, p.211-217, 1999.
- Svensson B, Svendsen I, Højrup P, Roepstorff P, Ludvigsen S, Poulsen FM. Primary structure of barwin: a barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. **Biochemistry**, v. 31, n. 37, p. 8767-8770, 1992. PMID: 1390663.
- Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. **The Plant Cell**, v. 7, n. 5, p. 573-588, 1995. PMID: 7780308.
- Thao ML, Moran NA, Abbot P, Brennan EB, Burckhardt DH, Baumann P. Cospeciation of psyllids and their primary prokaryotic endosymbionts. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2898-2905, 2000. PMID: 10877784.
- Thatcher LF, Anderson JP, Singh KB. Plant defence responses: what have we learnt from Arabidopsis? **Functional Plant Biology** 32: 1-19, 2005. doi: 10.1071/FP04135.
- Thompson BM, Grebenok RJ, Behmer ST, Gruner DS. Microbial Symbionts Shape the Sterol Profile of the Xylem-Feeding Woodwasp, *Sirex noctilio*. **Journal of Chemical Ecology**, 39(1):129-39, 2013. doi: 10.1007/s10886-012-0222-7. PMID: 23224570.
- Timberlake WE, Marshall MA. Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. **Trends Genet.** 4(6):162-9, 1988. PMID: 3076298.
- Tokeshi H, Rago A. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN-FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2. chap. 21, p. 185-196, 2005.
- Tokeshi H. Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) – Controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Eds.) **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: Suprema, p. 658-751, 1997.
- Tokeshi, H. Doenças da cana-de-açúcar. PLANALSUCAR, Instituto do Açúcar e do Alcool. 70p. SANGUINO. A. **Principais moléstias da cana-de-açúcar**. In Cana-de-Açúcar Cultivo e utilização. Fundação Cargil, Vol 2, 741 – 757, 1987.
- Toomey ME, Panaram K, Fast EM, Beatty C, Frydman HM. Evolutionarily conserved Wolbachia-encoded factors control pattern of stem-cell niche tropism in *Drosophila* ovaries and favor infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 26, p. 10788-10793, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1301524110. PMID: 23744038.

- Tsuda K, Katagiri F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. **Curr. Opin. Plant Biol.** 13: 459–65, 2010. doi: 10.1016/j.pbi.2010.04.006. PMID: 20471306.
- UNICA. **União da Agroindústria de cana-de-açúcar.** Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/>>. Acesso em: 23 dez. 2018.
- Van Loon LC. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. “Samsun” and “Samsun NN”. Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**, v.40, p.199-211, 1970. PMID: 18621356.
- Van Loon LC. Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection. In: **Active defense mechanisms in plants.** Plenum Press, 1981. p. 247-274. doi: 10.1007/978-1-4615-8309-7_14.
- Vendramin, J. D. *et al.* Intensity of damage: a new index for evaluation of the borer-rot complex on sugarcane cultivars. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil (Brazil)**, 1991.
- Vera P, Conejero V. Pathogenesis-related proteins of tomato: P-69 as an alkaline endoproteinase. **Plant Physiology**, v. 87, n. 1, p. 58-63, 1988. PMID: 16666127.
- Viswanathan R, Samiyappan R. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2002. doi: 10.1016/S0261-2194(01)00050-3.
- Walling, L. L. The myriad plant responses to herbivores. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 19, p. 195–216, Jun. 2000. doi: 10.1007/s003440000026.
- War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma HC. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012. doi: 10.4161/psb.21663. PMID: 22895106.
- Weber, NA. The fungus growing ants. **Science** 121, 587–604, 1966. doi: 10.1126/science.153.3736.587. PMID: 17757227.
- Wei Y, Zhang Z, Andersen CH, Schmelzer E, Gregersen PL, Collinge DB, Smedegaard-Petersen V, Thordal-Christensen H. An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. **Plant molecular biology**, v. 36, n. 1, p. 101-112, 1998. PMID: 9484466.
- Wenzel IM, Giometti FHC, Almeida JEM. Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, p. 259-261, 2006.
- Wernegreen JJ. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 11, p. 850, 2002. doi: 10.1038/nrg931. PMID: 12415315.
- Wiedenmann RN, Smith Jr JW, Darnell PO. Laboratory rearing and biology of the parasite *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) using *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) as a host. **Environmental Entomology**, v. 21, n. 5, p. 1160-1167, 1992. doi: 10.1093/ee/21.5.1160.
- Zeyl C, Vanderford T, Carter M. An evolutionary advantage of haploidy in large yeast populations. **Science**, v. 299, n. 5606, p. 555-558, 2003.

- Zhang Z, Collinge DB, Thordal-Christensen H. Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. **The Plant Journal**, v. 8, n. 1, p. 139-145, 1995. doi: 10.1126/science.1078417. PMID: 12543972.
- Zheng W, Zhao X, Xie Q, Huang Q, Zhang C, Zhai H, Xu L, Lu G, Shim WB, Wang Z. A conserved homeobox transcription factor Htf1 is required for phialide development and conidiogenesis in *Fusarium* species. **PLoS one**, v. 7, n. 9, p. e45432, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0045432. PMID: 23029006.
- Zientz E, Beyaert I, Gross R, Feldhaar H. Relevance of the endosymbiosis of *Blochmannia floridanus* and carpenter ants at different stages of the life cycle of the host. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6027-6033, 2006. doi: 10.1128/AEM.00933-06.
- Zurbriggen MD, Carrillo N, Hajirezaei MR. ROS signaling in the hypersensitive response. When, where and what for? **Plant Signaling & Behavior** 5: 393- 396, 2010. PMID: 20383072.