

**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

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 (Mckay, 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). Ensaios 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 simbiontes, 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. 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

- 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.
- Bourtzis K, Braig H, Karr T. Cytoplasmic incompatibility. In: Bourtzis K, Miller T, editors. **Insect symbiosis**. New York: CRC Press. pp. 217–246, 2003.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACMD, Landell MGDA. Cana-de-açúcar. **Agrônômico I**, 394-404 p., 2010.
- 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.
- 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)
- 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, 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.
- Gegner T, Schmidtberg H, Vogel H, Vilcinskas 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Margulis L, Fester R. (Ed.). Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis. **Mit Press**, 470 p., 1991.
- Mckaug 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.
- 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..
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Weber, NA. The fungus growing ants. **Science** 121, 587–604, 1966. doi: 10.1126/science.153.3736.587. PMID: 17757227.