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

**Caracterização da atividade antipatogênica da SUGARWIN, uma proteína
induzida por inseto em cana-de-açúcar**

Flávia Pereira Franco

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

**Piracicaba
2012**

Flávia Pereira Franco
Engenheira Agrônoma

Caracterização da atividade antipatogênica da SUGARWIN, uma proteína induzida por inseto em cana-de-açúcar

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

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

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Franco, Flávia Pereira

Caracterização da atividade antipatogênica da SUGARWIN, uma proteína induzida por inseto em cana-de-açúcar / Flávia Pereira Franco.- - Piracicaba, 2012.
69 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Cana-de-açúcar 2. Fungos fitopatogênicos 3. Insetos fitófagos 4. Podridão - Doença de planta 5. Proteína antipatogênica I. Título

CDD 633.61
F825c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico:

*Aos meus pais Irairdes e Guido,
Pelo exemplo de vida, constante apoio
e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho, pela recepção, apoio, ensinamentos, por compartilhar seu entusiasmo e visão e, principalmente, pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, pela recepção em seu laboratório na USP – Ribeirão Preto, pela grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Pelo fornecimento dos fungos *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus nidulans*, e pelo apoio na realização dos experimentos com os fungos.

Ao Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura por todas as vezes que precisei de ajuda, tirar dúvidas ou discutir assuntos relacionados ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Flavio Henrique Silva pela ajuda com a expressão das proteínas recombinantes.

À Dra. Cassiara Gonçalves e à Dra. Sabrina Chabregas do Centro de Tecnologia Canavieira pelo fornecimento dos fungos *F. verticillioides* e *C. falcatum*.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

Aos amigos do laboratório, Thais Paula, Larissa Spoladore, Renata Dias, Elaine Castelhana, Wellington Campos, Poliene Costa, Wiliane Garcia, Lucas Lopes, Aline Borges, Prof. Dra. Lígia Macedo, Dr. Marcelo Brandão, Dr. Horácio Montenegro, Ricardo Rodrigues, Marcela Joaquim, Eveline Meneghetti, Fabiana Mingossi, Lígia Arruda, que fizeram do ambiente de trabalho um lugar agradável e alegre, compartilhando tanto protocolos, experiências, conhecimento e discussões quanto risadas e companheirismo.

Ao técnico do laboratório Rafael Colombi, pela dedicação, mantendo sempre a ordem e organização do laboratório.

Aos amigos de laboratórios vizinhos, Alessandra Palhares e Augusto Diniz, com os quais pude contar em muitos momentos importantes e pela ajuda em muitos assuntos relacionados ao trabalho. E ao Fabio Dossi, com o qual tive inúmeras discussões científicas.

Aos amigos do laboratório da USP - Ribeirão Preto, Ana Colabardini, Paula Gouvea, Wagner de Souza, Barbara Pimentel, Taisa Dinamarco, Ricardo Almeida, Thaila Reis, Luciano Jiraya, Marcela Savoldi, Lívia Marangoni e Paulo, que me receberam muito bem no laboratório, e se tornaram grandes amigos. Agradeço, principalmente, à Patrícia Alves de Castro, por ter me ajudado com todos os experimentos, com muita paciência e dedicação, além de ter se tornado uma grande amiga.

Agradeço à minha prima Ana Marcheto, pela amizade e hospedagem em Ribeirão Preto. E aos amigos Junior Parini, Lucas Corte e Thiago Sodré. Todos juntos fizeram do tempo que passei em Ribeirão uma completa diversão.

A todos os amigos que estão perto ou longe mas que se fazem presente, com os quais posso contar tanto nos bons momentos quanto nos difíceis. Principalmente à Mariana Caldeira, Carolina Kanebley, Fernando Guerra, Ana Luiza, Priscila Idalgo e Fernanda Moraes pela constante presença em minha vida e pelas boas risadas.

Aos meus familiares, principalmente às minhas primas Angélica e Mariana, com quem sempre pude contar.

Finalmente, agradeço à minha família. Minha mãe Irairdes e meu pai Guido, pela dedicação e amor. Às minhas irmãs Tais e Viviane, pela amizade e companheirismo e ao meu sobrinho Ravi, que me encanta a cada dia.

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Cana-de-açúcar	21
2.2 Complexo broca-podridão	22
2.3 <i>Fusarium verticillioides</i> e a Podridão de Fusarium	23
2.4 <i>Colletotrichum falcatum</i> e a Podridão Vermelha.....	24
2.5 <i>Aspergillus nidulans</i> como organismo modelo.....	26
2.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e a fermentação	27
2.7 Resposta de plantas a herbívoros	28
2.8 Resposta de plantas a patógenos	29
2.9 Interação entre as vias de resposta ao ataque de patógenos e herbívoros	30
2.10 Proteínas da família BARWIN	32
2.11 Proteínas SUGARWIN.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Proteína recombinante.....	35
3.2 Expressão de _{His} SUGARWIN1 e _{His} SUGARWIN2 em <i>Pichia pastoris</i>	35
3.3 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	36
3.4 Condições de crescimento para <i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Colletotrichum falcatum</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.5 Tratamento e determinação da concentração ideal de _{His} SUGARWIN2	37
3.6 Microscopia	37
3.7 Ensaio com Calcofluor White em <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Colletotrichum falcatum</i>	38
3.8 Protoplastização de <i>Fusarium verticillioides</i>	38
3.9 Ensaio com Anexina-V e Iodeto de Propídio (PI) em protoplastos de <i>Fusarium</i> <i>verticillioides</i>	38
3.10 Ensaio com TUNEL (<i>transferase dUTP nick-mediated end labeling</i>) em <i>Fusarium</i> <i>verticillioides</i> e <i>Colletotrichum falcatum</i>	39
3.11 Teste de viabilidade em <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Colletotrichum falcatum</i>	39
3.12 Teste da atividade de _{His} SUGARWIN em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40

3.13 Ensaio com Iodeto de propídio (PI) em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
4 RESULTADOS.....	41
4.1 SUGARWIN2 recombinante causa deformações morfológicas e morte por apoptose em <i>Fusarium verticillioides</i>	41
4.1.1 Determinação da concentração ideal de _{His} SUGARWIN2	41
4.1.2 Ensaio com Calcofluor White em <i>Fusarium verticillioides</i>	42
4.1.3 Ensaio com Anexina-V e Iodeto de Propídio (PI) em protoplastos de <i>Fusarium verticillioides</i>	44
4.1.4 Ensaio com TUNEL (<i>transferase dUTP nick-mediated end labeling</i>) em <i>Fusarium verticillioides</i>	46
4.1.5 Teste de viabilidade em <i>Fusarium verticillioides</i>	48
4.2 SUGARWIN2 recombinante causa deformações morfológicas e morte por apoptose em <i>Colletotrichum falcatum</i>	48
4.2.1 Ensaio com Calcofluor White em <i>Colletotrichum falcatum</i>	48
4.2.2 Ensaio com TUNEL (<i>transferase dUTP nick-mediated end labeling</i>) em <i>Colletotrichum falcatum</i>	50
4.2.3 Teste de viabilidade em <i>Colletotrichum falcatum</i>	51
4.3 SUGARWIN2 recombinante não apresenta efeito em <i>Aspergillus nidulans</i>	52
4.3.1 Efeito da _{His} SUGARWIN2 em <i>Aspergillus nidulans</i>	52
4.4 SUGARWIN1 e 2 recombinantes não apresentam efeito em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	53
4.4.1 Teste da atividade de _{His} SUGARWIN1 e 2 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
4.4.2 Ensaio com Iodeto de Propídio em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS.....	63

RESUMO

Caracterização da atividade antipatogênica da SUGARWIN, uma proteína induzida por inseto em cana-de-açúcar

Em cana-de-açúcar, a colonização do caule por fungos oportunistas, como *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*, geralmente ocorre após o ataque da lagarta de *Diatraea saccharalis*. As plantas respondem ao ataque de insetos pela indução e acúmulo de um grande conjunto de proteínas de defesa. Dois homólogos de uma proteína da cevada induzida por ferimento (BARWIN) são conhecidos em cana-de-açúcar, SUGARWIN1 e SUGARWIN2 (*sugarcane wound-inducible proteins*). Embora a função da proteína BARWIN não tenha sido totalmente estabelecida, propriedades antifúngicas foram descritas para uma série de homólogos. As SUGARWINs estão localizadas no retículo endoplasmático e no espaço extracelular. A indução de seus transcritos ocorre em resposta ao ferimento mecânico, ataque de *D. saccharalis* e tratamento com metil jasmonato, mas não pela infecção de patógenos. Os transcritos de *SUGARWIN* são induzidos tardiamente em cana-de-açúcar e são restritos aos locais onde ocorrem os danos. Apesar de transcritos de *SUGARWIN1* e 2 serem altamente induzidos pelo ataque de *D. saccharalis* a proteína em si não possui efeito sobre o desenvolvimento do inseto. Neste trabalho demonstra-se que SUGARWIN2 recombinante causa alterações na morfologia de *F. verticillioides* e *C. falcatum*, produzindo aumento da vacuolização, vários pontos de fratura, liberação de material intracelular e formando calos na região dos séptos, culminando na morte destes fungos por apoptose. A SUGARWIN2 recombinante não apresenta efeito em outros fungos, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus nidulans*. Os resultados sugerem que, no curso da evolução genes de *SUGARWIN* foram recrutados pela cana-de-açúcar para se proteger de fungos oportunistas que, geralmente, penetram na cana após o dano causado pelo inseto.

Palavras chaves: Cana-de-açúcar; Herbivoria; Proteína antipatogênica; *D. saccharalis*; *F. verticillioides*; *C. falcatum*.

ABSTRACT

Characterization of antipathogenic activity of SUGARWIN, a sugarcane insect-induced protein

In sugarcane fields, colonization of the stalk by opportunistic fungi, like *Fusarium verticillioides* and *Colletotrichum falcatum*, usually occurs after the attack of *Diatraea saccharalis* caterpillars. Plants respond to insect attack by inducing and accumulating a large set of defense proteins. Two homologues of a barley wound-inducible protein (BARWIN) are known in sugarcane, SUGARWIN1 and SUGARWIN2 (*sugarcane wound-inducible proteins*). Although BARWIN protein function has not been fully established, antifungal properties have been described for a number of homologues. The SUGARWINs are located in the endoplasmic reticulum and in the extracellular space of sugarcane plants. The induction of *SUGARWIN* transcripts occurs in response to mechanical wounding, *D. saccharalis* damage, and methyl jasmonate treatment but not to pathogen infection. *SUGARWIN* transcripts are late induced and are restricted to the wound site. Although *SUGARWIN* transcripts increased after insect attack, the protein itself did not show any effect on insect development. This work shows that recombinant SUGARWIN2 altered *F. verticillioides* and *C. falcatum* morphology increasing vacuolization, points of fractures, leaking of intracellular material, leading to the apoptosis of the germlings. Recombinant SUGARWIN2 do not show any effect in other fungus like *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus nidulans*. The results suggest that, in the course of evolution, *SUGARWIN* genes were recruited by sugarcane to protect the plant from fungi that typically penetrate the plant stalk after insect damage.

Keywords: Sugarcane; Herbivory; Antipathogenic protein; *D. saccharalis*; *F. verticillioides*. *C. falcatum*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Interação entre as vias do ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno em relação ao ataque de patógenos e pragas. Fonte: Extraído e adaptado de Paul et al. 2000.....32
- Figura 2- Efeito da atividade de HisSUGARWIN2 na morfologia das hifas de *F. verticillioides*. Os esporos germinados cresceram na ausência de HisSUGARWIN2 e foram expostos a PBS (A) ou cresceram na presença de HisSUGARWIN2 a 160 μM por 16 horas (B). As setas apontam as regiões de deformações. Barras representam 5 μm 41
- Figura 3- Porcentagem de hifas de *F. verticillioides* que apresentaram mudanças morfológicas após tratamento com diferentes concentrações de HisSUGARWIN242
- Figura 4- Ensaio com Calcofluor White em *F. verticillioides*. Os esporos germinados cresceram na ausência de HisSUGARWIN2 e foram expostos a PBS ou cresceram na presença de 160 μM de HisSUGARWIN2 por 16 horas. As setas indicam a região dos septos com a formação de calos. Barras representam 5 μm43
- Figura 5- Porcentagem de hifas de *F. verticillioides* deformadas, com a presença de calos, após diferentes tempos de exposição a 160 μM de HisSUGARWIN2 ou PBS (controle negativo).....43
- Figura 6- Porcentagem de protoplastos de *F. verticillioides* marcados com PI e Anexina-V após 4 horas de exposição a 160 μM de HisSUGARWIN2 , controle negativo (PBS), ou controle positivo (tratamento com 80 mM de ácido acético pH 3,0 e solução de fixação).....45
- Figura 7- Efeito da atividade de HisSUGARWIN2 em protoplastos de *F. verticillioides*. (A) Controle Negativo (PBS); (B) Controle Positivo (80 mM de ácido acético pH 3,0 e solução de fixação); (C) Tratamento com 160 μM de HisSUGARWIN2 por 4 horas.....45

- Figura 8- Porcentagem de hifas de *F. verticillioides* marcadas com TUNEL para tratamentos com 160 μM de $_{\text{His}}$ SUGARWIN2, DNase (controle positivo) e PBS (controle negativo).....46
- Figura 9- Ensaio TUNEL em *F. verticillioides*. Esporos germinados cresceram na ausência de $_{\text{His}}$ SUGARWIN2 e foram expostos a DNase (controle positivo) ou PBS (controle negativo) ou cresceram na presença de 160 μM de $_{\text{His}}$ SUGARWIN2. Barras representam 5 μm47
- Figura 10- Teste de viabilidade em *F. verticillioides*. Os esporos germinados foram tratados com diferentes concentrações de $_{\text{His}}$ SUGARWIN2 (20, 40, 80 e 160 μM) por 16 horas. Posteriormente, estes foram transferidos para novas placas contendo meio sólido. Foram mantidos a 25°C por 36 horas. Para o controle negativo foi utilizado PBS.....48
- Figura 11- Porcentagem de hifas de *C. falcatum* que apresentaram mudanças morfológicas após tratamento com 160 μM de $_{\text{His}}$ SUGARWIN2.....49
- Figura 12- Ensaio com Calcofluor White em *C. falcatum*. Os esporos germinados cresceram na ausência de $_{\text{His}}$ SUGARWIN2 e foram expostos a PBS ou cresceram na presença de 160 μM de $_{\text{His}}$ SUGARWIN2. Barras representam 10 μm49
- Figura 13- Porcentagem de hifas de *C. falcatum* marcadas com TUNEL para tratamentos com 160 μM de $_{\text{His}}$ SUGARWIN2, DNase (controle positivo) e PBS (controle negativo).....50
- Figura 14- Ensaio TUNEL em *C. falcatum*. Esporos germinados cresceram na ausência de $_{\text{His}}$ SUGARWIN2 e foram expostos a DNase (controle positivo) ou PBS (controle negativo) ou cresceram na presença de 160 μM de $_{\text{His}}$ SUGARWIN2. Barras representam 10 μm51

Figura 15- Teste de viabilidade em *C. falcatum*. Os esporos germinados foram tratados com diferentes concentrações de HisSUGARWIN2 (20, 40, 80 e 160 μM) por 16 horas. Posteriormente, estes foram transferidos para novas placas contendo meio sólido e mantidos a 25°C por 48 horas. Para o controle negativo foi utilizado PBS.....52

Figura 16- Hifas de *Aspergillus nidulans* tratadas com 160 μM de HisSUGARWIN2 . Os esporos germinados cresceram na ausência de HisSUGARWIN2 e foram expostos a PBS (A) ou cresceram na presença de 160 μM de HisSUGARWIN2 (B). Barras representam 5 μm52

Figura 17- Teste de atividade da HisSUGARWIN1 e 2 em *Saccharomyces cerevisiae*. Em cada poço foram inoculadas 10^4 células de *S. cerevisiae*. Do lado esquerdo, o controle negativo foi representado apenas pelo meio de cultura (YPD), sem levedura e sem a proteína. Do lado direito, o controle positivo foi representado pelo meio de cultura com levedura, sem a proteína. Nas fileiras A, B, C e D foi adicionada a HisSUGARWIN2 e nas fileiras E, F, G e H foi adicionada a HisSUGARWIN1 , nas concentrações de: **1** – 128 μM ; **2** – 64 μM ; **3** – 32 μM ; **4** – 16 μM ; **5** – 8 μM ; **6** – 4 μM ; **7** – 2 μM ; **8** – 1 μM . Volume total do poço: 200 μL . As placas foram mantidas a 30°C por 24 horas.....53

Figura 18- Teste de atividade de HisSUGARWIN1 e 2 em *Saccharomyces cerevisiae*. Em cada poço foram inoculadas 10^4 células de *S. cerevisiae*. Do lado esquerdo, o controle negativo foi representado apenas pelo meio de cultura, sem levedura e sem a proteína. Do lado direito, o controle positivo foi representado pelo meio de cultura com a levedura, mas sem a proteína. Nas fileiras A e B foi adicionada a HisSUGARWIN1 e nas fileiras C e D foi adicionada a HisSUGARWIN2 , nas concentrações de: **1** – 125 μM ; **2** - 187 μM ; **3** - 250 μM ; **4** - 312 μM . Volume total do poço: 200 μL . As placas foram mantidas a 30°C e analisadas 24 horas após a inoculação.....54

Figura 19- Ensaio com Iodeto de Propídio em *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Controle negativo com PBS; (B) HisSUGARWIN1 na concentração de 160 μM ; (C) HisSUGARWIN2 na concentração de 160 μM . Barras representam 5 μm55

Figura 20- Porcentagem de células de <i>S. cerevisiae</i> marcadas com PI após tratamento com 160 μM de _{His} SUGARWIN1 ou 2.....	55
---	----

1 INTRODUÇÃO

Em cana-de-açúcar, a colonização do caule por fungos oportunistas, como *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*, geralmente ocorre após o ataque da lagarta de *Diatraea saccharalis*.

As plantas respondem ao ataque de insetos pela indução e acúmulo de um grande conjunto de proteínas de defesa. Em busca de proteínas relacionadas com a defesa em cana de açúcar, dois homólogos de uma proteína da cevada induzida por fermento (BARWIN) foram identificadas e designados SUGARWIN1 e 2 (*sugarcane wound-inducible proteins*) (POMPERMAYER, 2004).

Embora a função da proteína BARWIN não tenha sido totalmente estabelecida, propriedades antifúngicas foram descritas para uma série de homólogos (BRAVO et al., 2003). Medeiros et al. (2012) mostraram que transcritos de *SUGARWIN* são induzidos tardiamente em cana-de-açúcar e que estes são restritos aos locais onde ocorrem os danos, em resposta ao ferimento mecânico e ataque de *D. saccharalis*. Fusões proteicas de SUGARWIN1 e 2 mostraram que ambas as proteínas são secretadas.

Apesar de *SUGARWIN1* e 2 serem genes induzidos pelo ataque de *D. saccharalis* a proteína em si não possui nenhum efeito sobre o desenvolvimento do inseto (MEDEIROS et al., 2012). Uma hipótese para a indução, por herbivoria, dos genes *SUGARWIN1* e 2 seria eles serem parte de uma estratégia contra patógenos oportunistas que são comumente encontrados no local do ataque de lagartas.

O objetivo geral do presente trabalho foi elucidar o papel das *SURGAWINs* em cana-de-açúcar, sendo dois os objetivos específicos.

- avaliar o efeito da proteína recombinante SUGARWIN2, nos fungos fitopatogênicos: *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*.
- avaliar o efeito da proteína SUGARWIN2 em fungos não relacionados com a podridão vermelha, como *Aspergillus nidulans*, e a levedura responsável pela fermentação do caldo da cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana de açúcar pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, que abrange várias espécies. Porém, as canas atualmente cultivadas, na sua maioria, são híbridas (FIGUEIREDO, 2010). O genoma da cana moderna é uma mistura complexa de aneuploidia e poliploidia. Ela é derivada a partir da hibridação interespecífica envolvendo espécies *Saccharum* diferentes, particularmente *S. officinarum* e *S. spontaneum*. A espécie selvagem *S. spontaneum* é caracterizada pelo baixo teor de açúcar, talos finos, alto teor de fibra e elevada resistência a estresses bióticos e abióticos. *S. officinarum*, por outro lado, é caracterizada pelo alto teor de açúcar, talos grossos, baixo teor de fibra e baixa resistência a doenças. A maioria das variedades do mundo são derivadas do cruzamento destas duas espécies (SREENIVASAN et al., 1987 apud SINGH et al., 2010). Nesses híbridos procura-se aliar a rusticidade e resistência a pragas e doenças, às qualidades de açúcar (AGUIRRE JUNIOR, 1936).

A cana-de-açúcar é uma importante cultura de regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo plantada em cerca de 20 milhões de hectares em mais de 90 países (MENOSSEI et al., 2008). No Brasil, a cana-de-açúcar ocupa cerca de 7 milhões de hectares, ou seja, cerca de 2% de toda a terra arável do país, que é o maior produtor mundial, seguido pela Índia, Tailândia e Austrália. A cana-de-açúcar é utilizada, principalmente, para a produção de açúcar e etanol, sendo que as principais regiões de cultivo no país são Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste, permitindo duas safras por ano. Portanto, durante todo o ano o Brasil produz açúcar e etanol para os mercados interno e externo (ÚNICA, 2012).

A previsão do total da produção de cana para a safra 2012/13 é de 596,63 milhões de toneladas, um aumento de 6,5% em relação à safra 2011/12, que foi de 560,36 milhões de toneladas, sendo que, deste total, 323,12 milhões de toneladas são do estado de São Paulo, que se destaca na produção da cultura (CONAB, 2012).

A previsão de utilização da cana-de-açúcar para a produção de açúcar é equivalente a 50,42% do total de produção sendo estimada em 38,99 milhões de toneladas, 8,41% maior que a produção do ano passado. A produção de etanol é estimada em 23,49 bilhões de litros, 3,21% maior que a produção da safra 2011/12. Esta produção de etanol concentra-se na região Centro-Oeste e Sudeste com 91,0% do total produzido, principalmente nos estados de São Paulo

(50,53%), Goiás (13,12%), Minas Gerais (8,34%), Mato Grosso (4,23%), Mato Grosso do Sul (7,94%) e Paraná (5,55%) (CONAB, 2012).

2.2 Complexo broca-podridão

A *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) é uma das mais importantes pragas da cana-de-açúcar no Brasil, e está amplamente distribuída em todas as regiões canavieiras do país. Também está presente em vários outros países da América, em muitos dos quais causa danos econômicos (DINARDO-MIRANDA, 2010).

A fêmea de *D. saccharalis* faz a postura na face dorsal das folhas. As lagartas se alimentam, no início, do parênquima das folhas, convergindo para a bainha e, em seguida penetram no colmo formando galerias. Após completar seu ciclo, em média 40 dias, as lagartas fazem um orifício para o exterior e fecham-no com fios de seda, formando a pupa. Seu ciclo evolutivo completo é de 53 a 60 dias (GALLO et al., 2002).

Os danos causados pela broca podem ser diretos ou indiretos. Danos diretos são causados pelas lagartas que se alimentam do tecido do colmo formando galerias e causando a morte dos ponteiros, conhecido como “coração morto” em canas jovens, podendo causar também o enraizamento aéreo e brotações laterais (GALLO et al., 2002). Em canaviais mais desenvolvidos causa acentuada redução de produtividade, pois em colmos atacados ocorre diminuição da massa e de valores nutritivos da planta que consequentemente geram redução da qualidade e quantidade dos produtos finais. Quando o ataque se dá próximo à região do crescimento, ocorre morte da gema apical, com brotação das gemas laterais e, consequentemente, inversão de sacarose (DINARDO-MIRANDA, 2010).

Os danos indiretos são causados por fungos oportunistas que se aproveitam das galerias abertas por *D. saccharalis* para infectar a planta (OGUNWOLU et al., 1991). *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg estão fortemente disseminados em áreas de plantação de cana-de-açúcar com infestações de *D. saccharalis*, formando o complexo broca-podridão.

Estes fitopatógenos causam as doenças conhecidas por podridão vermelha e podridão de Fusarium, respectivamente, que levam a uma redução no teor de açúcar nos colmos devido à inversão da sacarose armazenada na planta e sua transformação em glicose e levulose, que não se cristalizam no processo industrial (DINARDO-MIRANDA, 2010), ocasionando um menor rendimento na produção de açúcar.

Os microrganismos presentes no colmo contaminam o caldo, e concorrem com as leveduras, inibindo o processo de fermentação alcoólica (GALLO et al., 2002). As reduções no teor de sacarose no colmo da cana-de açúcar podem chegar de 50 a 70% em áreas infestadas (SANTOS, 2010).

2.3 *Fusarium verticillioides* e a Podridão de Fusarium

Fusarium verticillioides é responsável pela doença chamada podridão de Fusarium em cana-de-açúcar. Esta doença está relacionada a injúrias físicas, químicas e, principalmente a perfurações provocadas pela broca da cana (SANTOS, 2010).

Este patógeno causa podridão da inflorescência, falhas na germinação de cariopses, morte de plântulas nas caixas de semeadura, falha na brotação de gemas e murcha de plantas adultas. Essa diversidade de manifestações da doença pode ser explicada pela invasão sistêmica dos tecidos do hospedeiro em todos os estádios de desenvolvimento da planta (SANTOS, 2010). Outro dano causado é o chamado *Pokkah-boeng*, caracterizado pela ocorrência de distorções do caule e das folhas, e também pela deformação do topo da cana-de-açúcar (TOKESHI; RAGO, 2005).

O patógeno pode estar presente na planta de forma endofítica, o que torna difícil avaliar os prejuízos causados por essa doença, uma vez que qualquer estresse sofrido pela planta pode fazer com que a infecção se manifeste. Dentre os principais desencadeadores da doença podem ser citados: período de seca prolongado, ataque da broca da cana, deficiência temporária de boro, ataque de lagartas das folhas, condições e períodos de armazenamento, ferimentos durante a limpeza e plantio inadequado de cariopses (TOKESHI, 1997).

Os sintomas podem se manifestar de várias formas e em diferentes estádios da planta, em função da suscetibilidade das variedades e condições ambientais. Quando a infecção ocorre em plântulas pode causar mau desenvolvimento do sistema radicular, perda de vigor, podridão de raízes e colo, bem como *damping off* nas caixas de semeadura, na forma de reboleiras. Os toletes ou gemas submetidos a tratamento térmico exibem com maior frequência sintomas de enfezamento, podridão de raízes e falhas na germinação (TOKESHI, 1997).

Nos colmos, os tecidos adjacentes ao local da injúria sofrem inversão de sacarose, apresentam coloração vermelho-escura, recobrendo alguns milímetros dos tecidos da cavidade ou se estendendo a maiores profundidades do entrenó, nos casos de variedades suscetíveis. Através de feixes vasculares, podem atingir vários entrenós acima e abaixo do orifício aberto

pela broca. Neste caso, apenas os feixes vasculares apresentam-se descoloridos (TOKESHI; RAGO, 2005).

Quando os colmos são submetidos à seca prolongada, que causa a morte do tecido do entrenó, os sintomas agravam-se e o fungo pode destruir um volume muito maior de colmo (TOKESHI; RAGO, 2005). Quando na forma de podridão do colmo, os prejuízos são difíceis de serem separados daqueles causados pela podridão vermelha (*Colletotrichum falcatum*) devido à associação constante desses dois fungos (TOKESHI, 19-?).

O agente causal, na fase imperfeita, é o fungo *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sinônimo: *F. moniliforme* Sheldon) e na fase perfeita, *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw. *F. verticillioides* é heterotático (WINELAND, 1924) e apresenta elevada diversidade genotípica (COREL; KLITTICH; LESLIE, 1989; DANIELSEN; MEYER; JENSEN, 1998; CHULZE et al., 2000; GOHARI et al., 2008; MOHAMMADI; NEJAD; MOFRAD, 2012). Em sua fase imperfeita, o fungo produz grande número de esporos, microconídios e macroconídios e raramente produz clamidósporos, sendo que a fase conidial é a encontrada no Brasil. Os macroconídios são encontrados em esporodóquios alanjado-pálidos, longos, falcados quase retos, com três a sete séptos. Os microconídeos são catenulados e produzidos em fiálides de conidióforos ramificados ou em fiálides de hifas, clavados, unicelulares, com clamidósporos ausentes (TOKESHI, 1997).

Quando a broca da cana penetra no colmo e mata as células por ingestão e as depositam no interior da galeria, propicia a condição ideal para a imediata colonização por *F. verticillioides* (TOKESHI, 1997).

O controle dessa enfermidade se dá quase que exclusivamente por resistência genética. No caso de utilização de variedades intermediárias, recomenda-se executar o plantio nas melhores condições de solo e ambiente, uma vez que qualquer estresse favorece a manifestação dos sintomas da doença (SANTOS, 2010).

2.4 *Colletotrichum falcatum* e a Podridão Vermelha

A podridão vermelha causada por *Colletotrichum falcatum* é uma das principais doenças da cana-de-açúcar, sendo encontrada em várias partes do mundo. No Brasil não há relatos de grandes perdas, a não ser quando estão associadas à alta intensidade de infestação da broca da cana (*D. saccharalis*) (SANTOS, 2010).

Esta doença pode se manifestar sob diferentes formas de acordo com os órgãos afetados e estágio vegetativo da planta. Durante a brotação do tolete, causa a sua redução e a morte das gemas (TOKESHI, 1997).

O sintoma típico da doença é a podridão do colmo, tornando-o de cor avermelhada, dando origem ao nome da doença. Outros sintomas aparecem nas raízes, limbo e bainha foliar. Na nervura central das folhas ocorrem lesões de cor vermelho-intenso, que com o tempo apresentam o centro com coloração branca (TOKESHI, 1997). Como o avermelhamento é um sintoma comum de outras doenças em cana-de-açúcar, essa coloração branca no centro das lesões é uma importante característica para o diagnóstico da podridão vermelha (SANTOS, 2010).

O tamanho das lesões é variável, mas em folhas verdes imaturas podem atingir toda a extensão da nervura. Em variedades altamente suscetíveis, à medida que a planta se desenvolve e amadurece, as folhas do ponteiro amarelecem e têm paralisação total do crescimento. Estes colmos amarelados evoluem rapidamente para a completa necrose das folhas do ponteiro, sem a brotação de gemas laterais. As bainhas das folhas, de cor palha, ficam com a superfície recoberta de pontuações negras de frutificações do fungo (TOKESHI, 1997).

O agente causal da doença em sua fase imperfeita é chamado *Colletotrichum falcatum* Went, enquanto que em sua fase perfeita é conhecido por *Glomerella tucumanensis* (Speg) Von Arx. Suas colônias são brancas, cinzas ou escuras, com aspecto de algodão e esporulam com facilidade. Quando o fungo esporula sobre a planta, produz acérvulos subepidérmicos pardo-escuros, septados, abundantes e visíveis com lupa manual. Os conidióforos são curtos, simples, hialinos, com conídios falcados (em forma de canoa) unicelulares, granulosos e embebidos em massa gelatinosa, que dá ao conjunto um tom levemente rosado, quase branco. O tamanho dos conídios varia de 16-48µm (TOKESHI, 1997).

As variações genéticas no estado assexual do fungo podem ser originada por heterocariose, por meio de recombinação através de mecanismo parassexual, ou ainda por mutação, seleção e adaptação, em resposta às alterações no ambiente do hospedeiro. Heterocariose é o mecanismo através do qual o fungo recolhe e consolida dois ou mais núcleos geneticamente diferentes da hifa e obtém o benefício do material genético introduzido. Estes núcleos recém-reunidos também se multiplicam em conjunto com os núcleos originais (DUTTAMAJUMDER; SINGH; AGNIHOTRI, 1990).

O ciclo vital e transmissão do fungo são relativamente simples, pois as mudas de cana sempre levam o fungo nas folhas ou em infecções latentes em gemas ou primórdios de raízes. Com o desenvolvimento da planta, novas infecções ocorrem nas folhas basais a partir

dos restos de cultura anterior, de mudas mortas durante a germinação ou através de ascósporos levados pelo vento. Os conídios dos acérvulos tem limitado alcance, pois dependem dos respingos de chuva e vento para levá-los até as folhas situadas logo acima das folhas velhas (TOKESHI, 19-?).

A partir das lesões na nervura central os conídios são conduzidos para a região das gemas, para o furo da broca, os primórdios de raízes e as cicatrizes das folhas, ocorrendo a colonização com a presença ou não de *Fusarium verticillioides*. Ocorre baixa esporulação nos tecidos do xilema devido à ausência de luz e baixa oxigenação. Os conídios aí produzidos podem ser levados pela corrente de transpiração para outros pontos do colmo e iniciar novo foco de infecção (TOKESHI, 19-?).

A prática de controle mais utilizada para a podridão vermelha é o emprego de variedades resistentes. Outra forma de manejo da doença é por meio do controle da broca da cana, cujas galerias constituem a principal via de entrada do fungo no colmo da planta (SANTOS, 2010).

2.5 *Aspergillus nidulans* como organismo modelo

Aspergillus nidulans é muito utilizado como organismo modelo em estudos moleculares. A maior parte do conhecimento sobre os mecanismos de morfogênese em fungos filamentosos foi obtido utilizando-o como um sistema modelo (ADAMS; WIESER; YU, 1998; CALVO et al., 2002).

O gênero *Aspergillus* consiste de muitas espécies bem caracterizadas, pertencentes ao grupo dos ascomicetos. *A. nidulans* é um fungo filamentoso saprófita, que pode ser isolado do solo, podendo ocorrer como bolor em alimentos. O fato de ser saprófita permite que este fungo utilize uma grande variedade de nutrientes, além de ser capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura. (MALAVAZI, 2007).

O ciclo vegetativo do *A. nidulans* consiste na proliferação das hifas - células tubulares, multinucleadas, formadoras de um tecido vegetativo (micélio). Este organismo é classificado como um fungo perfeito, pois apresenta um ciclo sexual definido, sendo denominado *Emericella nidulans* em sua fase perfeita (MITCHELL; CHAPLIN; MACKENZIE, 1987).

O micélio de *A. nidulans* é uma teia de filamentos ramificados (hifas) de compartimentos ligados, ou células que contêm cada uma vários núcleos. Este micélio, que se desenvolve a partir de um esporo haplóide único, diferencia muitos esporos assexuados

idênticos, os conídios. *A. nidulans* é homotático, o que significa que é capaz de se autofecundar, mas cruzamentos podem ocorrer pela fusão de hifas entre heterocários com núcleos geneticamente diferentes. Além de um ciclo assexuado e ciclo sexual, um ciclo parassexual oferece os benefícios genéticos da meiose alcançados através de uma rota mitótica (CASSELTON; ZOLAN, 2002).

Muitos fungos de importância econômica ou médica, tais como *Fusarium verticillioides*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium chrysogenum*, que apresentam ou não um ciclo sexual, também são explorados experimentalmente ou geneticamente usando tecnologias desenvolvidas para *A. nidulans* (KAYS et al., 2000; CASSELTON; ZOLAN, 2002; BANNO et al., 2005; KRAPPMANN; BAYRAM; BRAUS, 2005; LI, et al., 2006).

2.6 *Saccharomyces cerevisiae* e a fermentação

Saccharomyces cerevisiae é um microrganismo eucariótico unicelular do grupo dos ascomicetos (SOKOLOV et al., 2002). Nas últimas décadas a levedura *S. cerevisiae* evoluiu progressivamente como a ferramenta de pesquisa preferida em diversas áreas da biologia celular. O seu fácil manuseio e tratabilidade técnica se assemelham às de bactérias, por serem unicelulares, mas são acopladas à vantagem funcional de ser um organismo eucarioto (CARMONA-GUTIERREZ et al., 2010).

Diferentemente dos fungos filamentosos, a levedura se multiplica por brotação, num processo extremamente coordenado com o ciclo celular. Na maioria das cepas de *S. cerevisiae*, a replicação do DNA e a duplicação do fuso polar ocorrem aproximadamente ao mesmo tempo com a emergência de brotos, enquanto a divisão nuclear ocorre pouco antes da citocinese. Uma célula de levedura cresce isotropicamente no G1. Os produtos dos genes *BUD* e *CDC42* estabelecem o eixo de crescimento e o broto emerge na fronteira G1/S. Uma mudança de crescimento de apical para isotrópico ocorre na célula filha que está brotando em G2. Finalmente, o crescimento é redirecionado para a região entre as duas células no final da fase M, e as duas células de levedura se separam (LEW; REED, 1995).

Por outro lado, *Saccharomyces cerevisiae* também é amplamente utilizada na produção de etanol. Dentre os fatores que levam esse microrganismo a ser o mais indicado para a fermentação alcoólica estão: a capacidade de converter os açúcares rapidamente em etanol, alta tolerância ao produto formado, osmotolerância, tolerância a variações de

temperatura e atividade celular em ambiente ácido. Todos esses fatores são fundamentais para sua utilização industrial (ANDRIETTA; STECKELBGRG; ANDRIETTA, 2006).

Para a levedura, o principal objetivo ao metabolizar anaerobicamente o açúcar é sintetizar energia na forma de ATP (adenosina trifosfato), a qual é necessária para sua manutenção, crescimento e multiplicação celular (BASSO; ALVES; AMORIM, 1996). Na fermentação alcoólica, a principal rota metabólica envolvida é a glicólise, na qual a partir de uma molécula de glicose são produzidas duas moléculas de piruvato. Sob condições de anaerobiose, o piruvato é reduzido a etanol com a liberação de CO₂, além de vários subprodutos sintetizados em rotas metabólicas alternativas (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

Dentre suas características, *S. cerevisiae* destaca-se, também, pela capacidade de ajustar-se metabolicamente para a fermentação de açúcares em presença ou ausência de oxigênio, produzindo álcool ou gás carbônico. Por serem microrganismos anaeróbios facultativos, metabolizam os açúcares tanto pela via fermentativa como pela via respiratória (oxidativa). O que determina a ocorrência de cada um destes processos é a condição do meio (FEREA et al., 1999).

2.7 Resposta de plantas a herbívoros

Tanto o ataque de pragas, quanto os danos mecânicos, induzem respostas sistêmicas que são rapidamente propagados em toda a planta, assim como respostas que são restritas ao local da ferida (KESSLER; BALDWIN, 2002). Estes mecanismos de defesa visam diminuir o crescimento ou o desenvolvimento do agressor.

Durante as interações planta-inseto, elicitores presentes em secreções orais de insetos ativam ou reprimem uma variedade de vias de sinalização de defesa (WALLING, 2000). As principais vias de sinalização envolvidas na resposta da planta ao ferimento de herbívoros são as vias do ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET), que atuam sinergicamente para induzir genes de resposta ao ferimento (XU et al., 1994).

As plantas utilizam tanto defesas constitutivas quanto induzidas para a proteção contra ameaças bióticas. Defesas constitutivas incluem barreiras físicas, cutícula da folha e a parede celular, e armazenados metabólitos que inibem a alimentação, crescimento e desenvolvimento de herbívoros (WALLING, 2000).

Defesas induzidas incluem a ativação de mecanismos diretos e indiretos. Como mecanismos diretos, muitas plantas ativam genes de defesa cujos produtos inibem proteases

digestivas de herbívoros e reduzem a qualidade nutricional das proteínas ingeridas, desencorajando a alimentação adicional (RYAN, 1990). Como mecanismo de defesa indireto, ocorre a liberação de voláteis que sinalizam a localização dos insetos em plantas infestadas para atrair parasitóides e predadores destes herbívoros (KESSLER; BALDWIN, 2002).

2.8 Resposta de plantas a patógenos

As plantas são constantemente atacadas por uma grande gama de patógenos, que são geralmente divididos em necrotróficos e biotróficos (GLAZEBROOK, 2005). Os necrotróficos primeiro destroem as células do hospedeiro, frequentemente através da produção de fitotoxinas, e depois se alimentam do conteúdo celular. Já os biotróficos obtêm os nutrientes de células de tecido vivo, geralmente através de estruturas especializadas (haustório) que penetram na célula hospedeira sem destruí-la (PIETERSE et al., 2009).

Vários hormônios vegetais estão envolvidos na resposta da planta à patogênese. Estudos de expressão gênica mostram que a via do ácido salicílico (AS) é primariamente ativada em resposta a patógenos biotróficos, enquanto as vias de AJ e ET são induzidas em resposta a patógenos necrotróficos (THOMMA, B. P. et al., 1998).

O reconhecimento do patógeno pela planta desencadeia inúmeras respostas de defesa, dentre elas estão a fortificação da parede celular através da síntese de calose e lignina, a produção de metabólitos secundários com efeito antimicrobiano, tais como fitoalexinas, e o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR - *pathogenesis-related protein*), (PIETERSE et al., 2009).

O reconhecimento de patógenos pelo sistema de defesa induzido da planta é particularmente eficaz porque é seguido por uma explosão de espécies reativas de oxigênio que culminam em morte celular programada no local de invasão do patógeno (resposta de hipersensibilidade), mantendo o patógeno isolado do resto da planta, dificultando seu crescimento e impedindo danos futuros adicionais (DE WIT, 1997).

Acredita-se que a resposta de hipersensibilidade é ativa contra patógenos biotróficos, uma vez que, esta poderia favorecer o crescimento de patógenos necrotróficos, já que estes infectam a planta devido a sua capacidade de matar as células (GLAZEBROOK, 2005). Os patógenos necrotróficos estimulam respostas de defesa da planta devido à ação de toxinas ou padrões moleculares associados ao dano, como a decomposição de produtos da parede celular da planta (NÜRNBERGER; KEMMERLING, 2009).

As proteínas PR são acumuladas nos tecidos infectados e adjacentes (VAN LOON, 1985) e sua expressão tem sido apontada como um importante indicador molecular de resposta de defesa da planta (ZHU; SONG; ZHENG, 2006).

Um grande número de proteínas PR foram caracterizadas e agrupadas em 17 famílias com base em sua estrutura primária e atividade biológica (CHRISTENSEN et al., 2002). As proteínas PR-1 purificadas de tomate e tabaco mostram efeitos inibitórios *in vitro* sobre a germinação de oósporos de *Phytophthora infestans* (NIDERMAN et al., 1995). PR-2 (β -1,3-glucanase) e PR-3 (quitinase) têm mostrado degradar a parede celular de fungos e têm sido amplamente utilizadas em engenharia genética para resistência de planta a doença (SCHLUMBAUM et al., 1986; DATTA; MUTHUKRISHNAN; DATTA, 1999). As PR-5 (proteínas THAUMATIN-like, TLPs) também mostraram efeito inibitório através de um mecanismo de destruição das membranas celulares do patógeno (VIGERS et al., 1992). No trigo, genes PR-4 são induzidos por ativadores de resistência sistêmica adquirida, infecção por *Fusarium culmorum* e ferimento (BERTINI, et al., 2003). Há evidências de que proteínas PR-4 mostram atividades antifúngicas e de ribonuclease em várias plantas (CARUSO et al., 2001; CAPOREALE et al., 2004; ZHU; SONG; ZHENG, 2006; BERTINI et al., 2009; LI. et al., 2010).

Estas proteínas têm sido bem estudadas em plantas como cevada (HEJGAARD et al., 1992; SVENSSON et al., 1992), milho (BRAVO et al., 2003), trigo (CARUSO et al., 2001), batata (STANFORD; BEVAN; NORTHCOTE, 1989), fumo (LINTHORST et al., 1991; PONSTEIN et al., 1994), tomate (JOOSTEN et al., 1990), arroz (AGRAWAL et al., 2003; ZHU; SONG; ZHENG, 2006), pimenta (GUEVARA-MORATO et al., 2010) e borracha (PUJADE-RENAUD et al., 2005). A primeira proteína PR4 foi relatada em batata (STANFORD et al., 1989) e, depois, em cevada, na qual foi dado o nome de BARWIN (*barley wound induced protein*) (SVENSSON et al., 1992).

2.9 Interação entre as vias de resposta ao ataque de patógenos e herbívoros

As plantas respondem ao ataque de pragas e patógenos modulando a expressão de um grande número de genes, muitos dos quais acredita-se ter um papel na defesa da planta (AGRAWAL et al., 2003). Para se defender do ataque de patógenos e pragas as plantas desenvolveram mecanismos sofisticados fazendo desta percepção uma resposta adaptativa (JONES; DANGL, 2006).

Embora seja aceito que as vias de resposta ao ataque de patógenos ou de herbívoros são distintas, algumas evidências sugerem que o AJ também medeia a resistência induzida por alguns patógenos (SCHWEIZER et al., 1998; TERRAS et al., 1998). Além disso, o AS e as vias de sinalização do AJ podem interagir (BOSTOCK, 1999; STOUT; THALER; THOMMA, 2006). Neste caso, estas vias podem reprimir uma a outra (THALER et al., 1999; FELTON et al., 1999) ou podem apresentar um efeito sinérgico entre si (LAWTON et al., 1994; STENNIS et al., 1998). Porém essa interação vai depender da concentração relativa, tempo e sequência de iniciação de cada hormônio (MUR et al., 2006; KOORNNEEF et al., 2008).

Experimentos com *Arabidopsis* sugerem que a interação entre a resposta a patógenos e a resposta ao ferimento pode ser mais complexa do que a inibição direta. Uma explicação possível sugerida para os efeitos aparentemente contraditórios de AS na biossíntese de AJ é que AS estimula a formação de um precursor do AJ, ácido oxofitodienóico, que pode estar envolvido na defesa do patógeno. Ao mesmo tempo, AS inibe o passo final na biossíntese de AJ e assim suprime a resposta ao ferimento (LAUDERT; WEILER, 1998).

Outros estudos mostram que as vias de resposta a patógenos e ferimento podem ser co-reguladas. Lawton et al. (1994) demonstraram que o ET reduz o limiar de AS exigido para a expressão do gene *PR-1* (relacionado à patogênese). Do mesmo modo, verificou-se que a sistemina, o sinal celular necessária para a indução da resposta sistêmica ao ferimento, pode potencializar a explosão de espécies reativas de oxigênio, que é um evento que precede a reação de hipersensibilidade (STENNIS et al., 1998).

As moléculas de sinalização de ET e AJ regulam tanto os genes de resposta a ferimento, como a expressão de alguns genes PR básicos do tabaco, e alguns genes em *Arabidopsis* que codificam pequenos peptídeos antimicrobianos (*PDF1.2* e *TIONINA*). A superexpressão desses genes em *Arabidopsis* conduz a uma maior resistência a certos patógenos por uma via independente do AS (EPPLÉ; APEL; BOHLMANN, 1997).

Além da atividade bioquímica e a correlação da cinética de acúmulo de AJ e ET para a indução de genes de resistência, há evidência genética de um papel para AJ e ET também na resistência a patógeno. O mutante para a via do AJ (*jar1*) e o triplo mutante deficiente em AJ (*fad3-2-2 fad7 fad8*) são mais suscetíveis a fungos necrotróficos do que plantas do tipo selvagem (VIJAYAN et al., 1998; STASWICK; YUEN; LEHMAN, 1998).

Um esquema geral da interação entre as vias de sinalização do AS, AJ e ET, em resposta ao ataque de plantas por patógenos e herbívoros é apresentado na figura 1.

Figura 1 - Interação entre as vias do ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno em relação ao ataque de patógenos e herbívoros

Fonte: Extraído e adaptado de Paul, Hatcher e Taylor (2000)

2.10 Proteínas da família BARWIN

BARWIN é uma proteína básica composta por 125 aminoácidos que foi obtida a partir de sementes de cevada. É uma proteína induzida por fermento e patógenos em sementes e folhas (HEJGAARD et al., 1992; SVENSSON et al., 1992). Embora o domínio BARWIN possa ser encontrado em associação com um domínio de ligação à quitina (proteínas PR4 classe I) (BROEKAERT et al., 1990), uma série de proteínas tem sido isoladas de plantas que mostram apenas o domínio BARWIN (proteínas PR4 classe II): PR4 de tabaco (FRIEDRICH et al., 1991), P2 de tomate (LINTHORST et al., 1991), WHEATWINS (CARUSO et al., 1999), WjAMP-1 de *Wasabia japonica* (KIBA et al., 2003), ZmPR4 de milho (BRAVO et al., 2003), OsPR4 (AGRAWAL et al., 2003) e OsPR4b (ZHU; SONG; ZHENG, 2006) de arroz, e LrPR4 de *Lycoris radiata* (LI et al., 2010).

Homólogos de BARWIN de várias espécies vegetais foram associados à resposta das plantas à infecção fúngica, como *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* em cevada (HEJGAARD et al., 1992); *Fusarium culmorum* no trigo (CARUSO et al., 1999); *Magnaporthe grisea* no

arroz (AGRAWAL et al., 2003) e em *L. radiata* (LI, et al., 2010); *F. verticillioides* no milho (BRAVO et al., 2003), e *Cladosporium fulvum* no tabaco (LINTHORST et al., 1991).

Atividade antifúngica tem sido descrita para proteínas BARWIN-like de cevada (HEJGAARD et al., 1992) e *Wasabia japonica* (KIBA et al., 2003), que mostraram atividade também contra bactérias, e proteínas BARWIN-like recombinantes de trigo (CARUSO, et al., 2001), milho (BRAVO et al., 2003) e arroz (ZHU; SONG; ZHENG, 2006). Medeiros et al. (2012) caracterizaram, pela primeira vez, genes WIN em cana de açúcar, *SUGARWIN1* e 2.

2.11 Proteínas SUGARWIN

SUGARWIN1 e 2 são proteínas de 152 e 148 aminoácidos, respectivamente. Estas proteínas possuem um peptídeo sinal para secreção seguido de um domínio BARWIN. O domínio BARWIN presente nestas proteínas apresenta elevado nível de similaridade e identidade com as demais proteínas de mono e dicotiledôneas (MEDEIROS et al., 2012).

A indução dos transcritos de *SUGARWINs* ocorre em resposta ao ferimento mecânico, tratamento com metil jasmonato e, principalmente, ao ataque de *Diatraea saccharalis*, mas não ocorre em resposta à infecção por patógenos (MEDEIROS et al., 2012).

Os níveis de expressão de *SUGARWIN1* e 2 aumentam com o tempo em plantas atacadas por *D. saccharalis*. Após 12 horas de tratamento, transcritos de *SUGARWIN1* e 2 aumentam 8 e 192 vezes em relação às plantas controle, respectivamente. Após 24 horas de tratamento estes valores sobem para 15 e 300 vezes em relação à planta controle, respectivamente para *SUGARWIN1* e 2 (MEDEIROS et al., 2012).

A expressão de *SUGARWIN1* e 2 é induzida por ferimento mecânico em menores proporções, cerca de 5 e 37 vezes em relação à planta controle após 12 horas de tratamento, respectivamente. Após cessar o ferimento a expressão desses genes é reduzida, indicando que a expressão dos genes *SUGARWIN1* e 2 é dependente do ferimento (MEDEIROS et al., 2012).

Esse aumento de expressão ocorre no tecido local do ferimento ou tratamento. Não foram observados níveis de expressão em tecidos onde não ocorre o ataque da broca, indicando um efeito sistêmico inexistente ou de difícil detecção (MEDEIROS et al., 2012).

Apesar de sua elevada expressão devido ao ataque de lagartas de *D. saccharalis* a proteína não possui nenhum efeito no desenvolvimento do inseto (MEDEIROS et al., 2012), o que sugere seu possível efeito em fungos oportunistas, que se aproveitam da abertura feita pela lagarta para infectar a planta de cana-de-açúcar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Proteína recombinante

Para testar seu efeito em fungos, as proteínas SUGARWIN1 e 2 foram fusionadas a uma cauda de seis histidinas gerando as proteínas recombinantes HisSUGARWIN1 e HisSUGARWIN2 que foram expressas na levedura *Pichia pastoris*. As cepas de levedura contendo as proteínas recombinantes foram cedidas pelo laboratório de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, e foi produzida de acordo com Medeiros, et al. (2012).

3.2 Expressão de HisSUGARWIN1 e HisSUGARWIN2 em *Pichia pastoris*

As proteínas foram expressas de acordo com o Kit de expressão *Pichia EasySelect*TM – Invitrogen. Uma colônia de *P. pastoris* contendo a construção de *SUGARWIN1* ou 2 foi inoculada em 10 mL de meio BMGY (1% de extrato de levedura; 2% de peptona; 100 mM de fosfato de potássio pH 7,0; 1,34% de YNB (*Yeast Nitrogen Base*); $4 \times 10^{-5}\%$ de biotina; 1% de glicerol) e crescida a 30°C, sob agitação até a $\text{DO}_{600} = 5$. Esta cultura inicial foi inoculada em 500 mL de BMGY e cresceu até $\text{DO}_{600} = 5$. As células foram centrifugadas a 1500 g por 5 minutos e ressuspensas em 100 mL de meio BMGY com 0,5% de metanol ao invés de glicerol, sendo, então, incubadas a 26°C para HisSUGARWIN1 e 30°C para HisSUGARWIN2 . Para induzir a expressão do gene, foi adicionado metanol em cada amostra a cada 24 horas para manter a concentração final de 0,75%. Após 96 horas, as células foram centrifugadas a 15000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 μm (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel (Qiagen) pré-equilibrada com tampão de purificação (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM de NaH_2PO_4 ; e 100 mM de NaCl). As proteínas foram eluídas com dois volumes de tampão de purificação contendo crescentes concentrações de imidazol (10, 25, 50, 75, 100, e 250 mM). As frações contendo as proteínas HisSUGARWIN1 e HisSUGARWIN2 foram dializadas em tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4 (137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 10 mM de Na_2PO_4 ; e 2 mM de KH_2PO_4) e esterilizadas com filtro de 22 μm (Millipore). A concentração das proteínas foi determinada utilizando o kit BCA (Pierce). A purificação de ambas as proteínas recombinante foi monitorada utilizando SDS-PAGE.

3.3 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O gel de poliacrilamida foi feito utilizando-se o sistema Mini Protean R Tetra Cell (Bio-Rad), em tampão de corrida Tris-Glicina (10X: 125 mM de Tris-base; 0,1% de SDS; 960 mM de Glicina). Às amostras foi adicionando tampão de amostra (4X: 125 mM de Tris-HCl, pH 6,8; 4% de SDS; 10% de glicerol; 0,2% de azul de bromofenol; 4% de 2-mercaptoetanol) e em seguida estas foram submetidas a 100°C por 10 minutos. Foram, então, aplicadas no gel de poliacrilamida 15%, composto pelo gel de resolução (0,1% de SDS; 375 mM de Tris-HCl pH 8,8; 15% de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8); 0,125% de TEMED; 0,675% de persulfato de amônia) e pelo gel de empilhamento (125 mM de Tris-HCl pH 6,8; 0,1% de SDS; 4,5% de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8); 0,25% de TEMED; 0,1% de persulfato de amônia). O gel foi revelado com corante comassie (0,2% de Comassie Brilliant Blue; 10% de ácido acético glacial; 50% de metanol), e descorados com solução descorante de comassie (ácido acético glacial 7%).

3.4 Condições de crescimento para *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum falcatum*, *Aspergillus nidulans* e *Saccharomyces cerevisiae*

Os isolados de *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*, utilizados nos experimentos, foram obtidos de cana-de-açúcar pelo Centro de Tecnologia Canavieira, e foram cedidos para a realização dos experimentos. Culturas foram iniciadas inoculando placas contendo meio BDA (200 g/L de batata; 20 g/L de dextrose; 15 g/L de ágar) com micélio do fungo e incubando as placas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Para obtenção de conídios, discos de micélio foram transferidos para meio ADA (40 g/L de aveia; 20 g/L de dextrose; 20 g/L de ágar) e as placas foram incubadas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Os conídios foram obtidos de culturas de duas semanas 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.

Os fungos *Aspergillus nidulans* e *Saccharomyces cerevisiae* utilizados nos experimentos foram cedidos pelo Laboratório de Genética Molecular da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto. O fungo *Aspergillus nidulans* foi cultivado em meio completo YUU [0,5% de extrato de levedura; 2% de glicose; 2% de ágar; 0,1% de elementos traços pH 6,7 (75 mM de sulfato de zinco heptahidratado; 180 mM de ácido bórico; 25 mM de cloreto de manganês tetrahidratado; 18 mM de sulfato de ferro heptahidratado; 6 mM de cloreto de cobalto pentahidratado; 6 mM de sulfato de cobre pentahidratado; 1 mM de molibdato de

amônio tetrahidratado; 140 mM de EDTA)] a 37°C. Enquanto que *Saccharomyces cerevisiae* foi cultivada em meio YPD (10 g/L de extrato de levedura; 20 g/L de peptona; 20 g/L de dextrose; 17 g/L de ágar) a 30°C.

3.5 Tratamento e determinação da concentração ideal de _{His}SUGARWIN2

Para os tratamentos com _{His}SUGARWIN2 em fungos filamentosos foram utilizadas placas de 24 poços com uma lamínula no fundo de cada poço. Foi adicionado 400 µL de meio BD para *F. verticillioides* e *C. falcatum* e 400 µL de meio completo YUU para *A. nidulans*, sendo, em seguida, adicionado 1,5 µL da suspensão de conídeos na concentração de 10⁴ conídeos/µL, do fungo em estudo, por poço. Após 8 horas foi adicionado o peptídeo antimicrobiano (_{His}SUGARWIN2 da cana-de-açúcar) em diferentes concentrações até ser determinada a concentração ideal. Os tratamentos foram feitos em triplicata e mantidos a 25°C por mais 16 horas, para *F. verticillioides* e *C. falcatum* e a 37°C para *A. nidulans*, sendo feito, em seguida, o tratamento necessário para cada teste. Para o controle negativo foi utilizado PBS. Todos os experimentos com os fungos filamentosos foram repetidos por, pelo menos, duas vezes.

3.6 Microscopia

As lâminas foram montadas e as imagens analisadas por microscopia de fluorescência à temperatura ambiente. As lâminas foram visualizadas com microscópio Carl Zeiss (Jena, Germany) utilizando lentes de aumento de 100X com imersão em óleo. Foi utilizado o filtro 43HE DsRed (excitação a 550/25 nm e emissão a 605/70 nm) para coloração com TUNEL e iodeto de propídio (PI). O filtro 49 DAPI (excitação a 365 nm e emissão a 445/50 nm) para coloração com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e Calcofluor White. E o filtro GFP (excitação a 489 nm e emissão a 509 nm) para coloração com Anexina-V. Contraste de fase para imagens de campo claro e de fluorescência foram capturadas com uma câmera Axio-Cam (Carl Zeiss), processadas utilizando o software AxioVision versão 3.1, e salvas como arquivo TIFF. As imagens foram subsequentemente processadas usando o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA).

Apenas o ensaio com TUNEL em *C. falcatum* foi analisado em microscópio confocal de varredura a laser Olympus® FV1000. Foram utilizados os filtros para DAPI (excitação a

365 nm e emissão a 445/50 nm) e para TUNEL (excitação a 550/25 nm e emissão a 605/70 nm). As imagens foram analisadas no programa Olympus Fluoview FV10-ASW.

3.7 Ensaio com Calcofluor White em *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*

Após tratamento com 160 μ M de $_{\text{His}}$ SUGARWIN2 lâminas de *F. verticillioides* e *C. falcatum* foram montadas com a adição de 2 μ L de solução Calcofluor White (Fluorescent Brightener 28) (Sigma, St. Louis, MO, USA) na concentração de 1 μ g/ml para cada amostra, as quais permaneceram por 10 minutos no escuro (BERTINI et al., 2009). Em seguida foi feita a análise com microscópio Carl Zeiss (Jena, Germany).

3.8 Protoplastização de *Fusarium verticillioides*

Foram inoculados cerca de 10^4 conídios de *F. verticillioides* em 25 mL de meio BD, que permaneceram incubados a 25°C por 24 horas a 200 rpm. As hifas foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em 20 mL de solução 1 de protoplastização (0,8 M de sulfato de amônio; 100 mM de ácido cítrico pH 6,0), 20 mL de solução 2 de protoplastização (1% de extrato de levedura; 2% de sacarose), 6,5 ml de sulfato de magnésio 1 M, 1g de soroalbumina bovina (BSA) (Sigma) e 1g de Allzyme MMX (Lallemand). Os protoplastos foram obtidos após 3 horas de incubação a 30°C sob agitação a 100 rpm, sendo então separados dos restos celulares por filtração em lã de vidro estéril. Os protoplastos foram coletados por centrifugação a 1800 rpm por 3 minutos e lavados duas vezes com tampão sorbitol (1,2 M de sorbitol; 0,06 M de K_2HPO_4 , pH 7,5).

3.9 Ensaio com Anexina-V e Iodeto de Propídio (PI) em protoplastos de *Fusarium verticillioides*

A exposição de fosfatidilserina foi detectado por Anexina-V (Roche, EUA), como descrito por Madeo et al. (1999) com modificações. Os protoplastos foram submetidos ao tratamento com $_{\text{His}}$ SUGARWIN2 (160 μ M) por 4 horas e, em seguida, foram lavadas com tampão de ligação (10 mM de HEPES/NaOH, pH 7,4; 140 mM de NaCl; 2,5 mM de CaCl_2 , contendo 1,2 M de sorbitol). Para 38 μ L de suspensão de células em tampão de ligação/sorbitol foi adicionado 2 μ L de Anexina-V (Roche, EUA) e incubado por 15 minutos

no escuro. Em seguida, foi adicionado 2 μL de uma solução de trabalho PI (50 $\mu\text{g/mL}$) que permaneceu por mais 2 minutos no escuro. As células foram então lavadas e ressuspensas em tampão de ligação/sorbitol. Finalmente as lâminas foram montadas com as suspensões de células. Para o controle positivo de morte por apoptose os protoplastos foram tratados com 80 mM de ácido acético pH 3,0 por 200 minutos. Já para o controle positivo de morte por necrose as células foram fixadas com solução de fixação [3,7% de formaldeído; 50 mM de tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4) pH 7,0; 0,2% de Tween 80] por 1 minuto em temperatura ambiente.

3.10 Ensaio com TUNEL (*transferase dUTP nick-mediated end labeling*) em *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*

Após o tratamento com 160 μM de His SUGARWIN2 as hifas foram submetidas ao tratamento com TUNEL de acordo com o descrito por Madeo, Fröhlic e Fröhlic (1997) para a levedura *S. cerevisiae*, com modificações. A princípio as hifas, que cresceram em placas de 24 poços, foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e fixadas com solução de fixação por 30 minutos em temperatura ambiente, seguida de uma lavagem com tampão sorbitol. Entre cada lavagem e mudança de solução foi necessário centrifugar o material por 1 minuto a 2000 rpm, e remover o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta. Em seguida as hifas foram incubadas em solução de digestão (Lyticase 1 mg/mL) por 1 hora a 37°C, seguida por uma lavagem com PBS. Para, então, serem incubadas em solução de permeabilização (0,1% de Triton X-100; 0,1% de citrato de sódio) por 10 minutos no gelo, seguida de uma nova lavagem com PBS. As amostras foram incubadas com solução de reação TUNEL por 1 hora a 37°C, seguida de uma nova lavagem com PBS. A seguir as hifas foram submetidas a coloração dos núcleos por 3 minutos com 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de DAPI (Sigma, EUA). O controle positivo foi tratado com 10U de DNase (Fermentas), por 1 hora a 37°C antes do tratamento com TUNEL. As lâminas foram analisadas em microscópio Carl Zeiss (Jena, Germany), para *F. verticillioides* e em microscópio confocal de varredura a laser Olympus® FV1000 para *C. falcatum*.

3.11 Teste de viabilidade em *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*

Todos os tratamentos foram feitos para ambos os fungos separadamente. No teste de viabilidade hifas com 8 horas de germinação foram tratadas com His SUGARWIN2 nas

concentrações de 20, 40, 80 e 160 μM por 16 horas. Sendo em seguida plaqueadas em meio sólido. Foi utilizado meio batata-dextrose para *F. verticillioides* e meio de aveia para *C. falcatum*. As placas foram incubadas a 25°C por 36 horas para *F. verticillioides* e 48 horas para *C. falcatum*.

3.12 Teste da atividade de HisSUGARWIN em *Saccharomyces cerevisiae*

Para o teste, foram utilizadas microplacas de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 200 μL de meio YPD contendo 10^4 células de levedura e a proteína em diferentes concentrações (128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 μM) tanto para HisSUGARWIN1 quanto para HisSUGARWIN2 . Mais tarde foram utilizadas concentrações mais altas (125, 187, 250 e 312 μM). O controle negativo foi representado pelo meio de cultura (YPD), sem levedura e sem proteína. O controle positivo foi representado pelo meio de cultura com levedura e sem a proteína, no qual a levedura pode crescer sem a interferência da proteína. O experimento foi feito com pelo menos duas repetições e a placa foi mantida a 30°C e analisada 24 horas após a inoculação. O experimento foi repetido duas vezes.

3.13 Ensaio com Iodeto de propídio (PI) em *Saccharomyces cerevisiae*

O ensaio foi realizado de acordo com Madeo, Fröhlic e Fröhlic (1997). Foi adicionado 100 μL de proteína, para uma concentração final de 160 μM num total de 400 μL de meio YPD contendo 2×10^3 células de levedura. Os tratamentos foram mantidos a 30°C por 15 horas. Após, os microtubos foram centrifugados a 2000 rpm por 2 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X, centrifugadas novamente, e ressuspensas em 500 μL de PBS, sendo, então, adicionado 2 μL de PI (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Os microtubos contendo as células foram mantidos por 2 minutos no escuro. Em seguida as células foram analisadas no microscópio Carl Zeiss (Jena, Germany). O experimento foi feito em triplicata e repetido duas vezes.

4 RESULTADOS

4.1 SUGARWIN2 recombinante causa deformações morfológicas e morte por apoptose em *Fusarium verticillioides*

4.1.1 Determinação da concentração ideal de HisSUGARWIN2

A proteína HisSUGARWIN2 foi utilizada por se tratar do homólogo expresso em maior quantidade na cana-de-açúcar, cerca de 20 vezes mais que a *SUGARWIN1* (MEDEIROS et al., 2012), e porque sua expressão heteróloga em *Pichia pastoris* é mais eficiente em relação a HisSUGARWIN1 .

Inicialmente para analisar os efeitos de HisSUGARWIN2 em *F. verticillioides* foi feito um ensaio de dose-resposta usando as seguintes concentrações: 20, 40, 80 e 160 μM . Apenas os tratamentos com 80 e 160 μM de HisSUGARWIN2 provocaram anomalias na parede celular do fungo, como aumento da vacuolização, vários pontos de fratura, liberação de material intracelular e formação de calos na região dos séptos (Figura 2).

Figura 2 - Efeito da atividade de HisSUGARWIN2 na morfologia das hifas de *F. verticillioides*. Os esporos germinados cresceram na ausência de HisSUGARWIN2 e foram expostos a PBS (A) ou cresceram na presença de HisSUGARWIN2 a 160 μM por 16 horas (B). As setas apontam as regiões de deformações. Barras representam 5 μm

Na concentração de 80 μM foi possível visualizar cerca de 44% das hifas com estas deformações enquanto na concentração de 160 μM foi possível visualizar cerca de 78% das hifas com as mesmas deformações (Figura 3). Dessa forma, foi adotada a concentração de 160 μM para a realização dos demais testes.

Para a avaliação quantitativa das deformações nas hifas pelo menos 100 hifas foram contadas por amostra, sendo consideradas afetadas as hifas que apresentassem pelo menos um dos sintomas descritos.

Figura 3 - Porcentagem de hifas de *F. verticillioides* que apresentaram mudanças morfológicas após tratamento com diferentes concentrações de HisSUGARWIN2

4.1.2 Ensaio com Calcofluor White em *Fusarium verticillioides*

A coloração com Calcofluor White (Fluorescent Brightener 28) (Sigma, St. Louis, MO, USA) é utilizada para verificar a integridade da parede celular de fungos, devido à sua capacidade de ligação à quitina. Os branqueadores ópticos do tipo diaminostilbene, como Calcofluor White, parecem não ser tóxicos, sendo úteis em estudos de morfologia e desenvolvimento de fungos (MONHEIT; COWAN; MOORE, 1984).

As hifas de *F. verticillioides* foram analisadas com 2, 4, 6, 8 e 16 horas de tratamento com 160 µM de HisSUGARWIN2. As regiões dos séptos foram fortemente marcadas com Calcofluor White, indicando acúmulo de quitina nestas regiões, o que provavelmente, causa a formação dos calos (Figura 4). Cerca de 2, 5, 30, 40 e 80% das hifas apresentaram mudanças morfológicas, respectivamente (Figura 5).

Para a avaliação quantitativa das regiões com acúmulo de quitina (calos) pelo menos 100 hifas foram contadas por amostra, sendo consideradas afetadas as hifas que apresentassem pelo menos um calo.

Figura 4 - Ensaio com Calcofluor White em *F. verticillioides*. Os esporos germinados cresceram na ausência de HisSUGARWIN2 e foram expostos a PBS ou cresceram na presença de 160 μM de HisSUGARWIN2 por 16 horas. As setas indicam a região dos septos com a formação de calos. Barras representam 5 μm

Figura 5 - Porcentagem de hifas de *F. verticillioides* deformadas, com a presença de calos, após diferentes tempos de exposição a 160 μM de HisSUGARWIN2 ou PBS (controle negativo)

4.1.3 Ensaio com Anexina-V e Iodeto de Propídio (PI) em protoplastos de *Fusarium verticillioides*

A Anexina-V é uma proteína que se liga a fosfolipídios e na presença de íons de cálcio possui alta afinidade pela fosfatidilserina. A fosfatidilserina está presente na superfície interna da bicamada lipídica, porém, em células no início da apoptose, quando a membrana ainda está intacta mas com leve desorganização, a fosfatidilserina é translocada para a superfície exterior da bicamada. A Anexina-V pode, então, se ligar a esta região indicando a morte da célula por apoptose. A Anexina-V conjugada ao FITC (Isotiocianato de fluoresceína) permite a visualização dessas regiões por microscopia de fluorescência (MELLO; CASTILHO, 2007).

O Iodeto de Propídio (PI) é uma molécula que se intercala com qualquer DNA desde que a membrana celular esteja permeável, uma vez que, devido ao seu tamanho, não consegue penetrar em células intactas. Sendo assim, ele não consegue marcar células apoptóticas, a não ser que estas estejam nos estágios finais de apoptose, quando já apresentam permeabilidade na membrana plasmática (ERICSSON et al., 2000).

Desse modo, corando-se células simultaneamente com Anexina-V e PI pode-se identificar células em apoptose precoce, que é caracterizada por um aumento do número de células Anexina-V positiva [A (+)] e PI negativo [PI (-)]; células em apoptose tardia (levando à necrose secundária) com um aumento do número de células [A (+)] e [PI (+)]; ou necrose primária, caracterizada por um aumento do número de células [A (-)] e [PI (+)]. Para a avaliação quantitativa da coloração com Anexina-V e PI, pelo menos 100 protoplastos foram contados por amostra.

Neste experimento foi observado cerca de 0,5% de protoplastos [A (+)] e [PI (+)] no controle negativo (PBS) e 97% de células [A (+)] e [PI (+)] no controle positivo. Após 4 horas de exposição a 160 μ M de _{His}SUGARWIN2 foram observadas cerca de 93% de células [A (+)] e [PI (+)] sugerindo a ocorrência de apoptose tardia em *F. verticillioides* (Figuras 6 e 7).

Figura 6 - Porcentagem de protoplastos de *F. verticillioides* marcados com PI e Anexina-V após 4 horas de exposição a 160 μ M de HisSUGARWIN2, controle negativo [C (-)] (PBS), ou controle positivo [C (+)] (tratamento com 80 mM de ácido acético pH 3,0 e solução de fixação)

Figura 7 - Efeito da atividade de HisSUGARWIN2 em protoplastos de *F. verticillioides*. (A) Controle Negativo (PBS); (B) Controle Positivo (80 mM de ácido acético pH 3,0 e solução de fixação); (C) Tratamento com 160 μ M de HisSUGARWIN2 por 4 horas

4.1.4 Ensaio com TUNEL (*transferase dUTP nick-mediated end labeling*) em *Fusarium verticillioides*

O ensaio com TUNEL foi utilizado para verificar se HisSUGARWIN2 induz a fragmentação do DNA. Este ensaio utiliza a deoxitidiltransferase com FITC-dUTP para se ligar à região hidroxila da extremidade 3' da cadeia de DNA, podendo ser diretamente visualizado por microscopia de fluorescência, indicando morte celular por apoptose tardia, uma vez que esta é caracterizada pela fragmentação da cromatina nuclear (MADEO; FRÖHLICH; FRÖHLICH, 1997).

A avaliação da porcentagem de núcleos marcados com TUNEL foi baseada na contagem de pelo menos 100 núcleos corados com DAPI, por repetição. O controle negativo (PBS) não apresentou núcleos marcados com TUNEL, enquanto que no controle positivo (DNase) 77% dos núcleos foram marcados. O tratamento com 160 μM de HisSUGARWIN2 apresentou cerca de 82% das hifas marcadas com TUNEL, indicando que a morte celular em *F. verticillioides* ocorre por apoptose (Figura 8).

Figura 8 - Porcentagem de hifas de *F. verticillioides* marcadas com TUNEL para tratamentos com 160 μM de HisSUGARWIN2 , DNase (controle positivo) e PBS (controle negativo)

A figura 9 mostra núcleos marcados com DAPI, que é uma coloração fluorescente que se liga fortemente às regiões ricas de AT do DNA, evidenciando os núcleos que se coram de azul brilhante e núcleos marcados com TUNEL indicando morte por apoptose.

Figura 9 - Ensaio TUNEL em *F. verticillioides*. Esporos germinados cresceram na ausência de HisSUGARWIN2 e foram expostos a DNase (controle positivo) ou PBS (controle negativo) ou cresceram na presença de 160 μM de HisSUGARWIN2. Barras representam 5 μm

4.1.5 Teste de viabilidade em *Fusarium verticillioides*

O teste de viabilidade mostrou que, concentrações abaixo de 80 μM não são capazes de prejudicar o desenvolvimento do fungo, sendo que este cresce normalmente em meio sólido após tratamento com HisSUGARWIN2 . Porém, concentrações acima de 80 μM causam danos celulares tornando-os incapazes de se desenvolver após o tratamento. Apesar da presença de deformações nas hifa tratadas com 80 e 160 μM de HisSUGARWIN2 variar de 44 a 78% respectivamente (Figura 3), ambas são capazes de inviabilizar o desenvolvimento do fungo após o tratamento (Figura 10).

Figura 10 - Teste de viabilidade em *F. verticillioides*. Os esporos germinados foram tratados com diferentes concentrações de HisSUGARWIN2 (20, 40, 80 e 160 μM) por 16 horas. Posteriormente, estes foram transferidos para novas placas contendo meio sólido. Foram mantidos a 25°C por 36 horas. Para o controle negativo foi utilizado PBS

4.2 SUGARWIN2 recombinante causa deformações morfológicas e morte por apoptose em *Colletotrichum falcatum*

4.2.1 Ensaio com Calcofluor White em *Colletotrichum falcatum*

Resultados semelhantes aos obtidos para *F. verticillioides* foram observados em *C. falcatum*, que apresentou 77% de suas hifas deformadas após o tratamento com 160 μM de HisSUGARWIN2 (Figura 11). Foram observadas anomalias na parede celular do fungo, com aumento da vacuolização, vários pontos de fratura, liberação de material intracelular e formação de calos na região dos séptos, com o acúmulo de quitina (Figura 12). Para a avaliação quantitativa das deformações nas hifas pelo menos 100 hifas foram contadas, por amostra, sendo considerada afetada a hifa que apresentasse pelo menos um dos sintomas descritos.

Figura 11 - Porcentagem de hifas de *C. falcatum* que apresentaram mudanças morfológicas após tratamento com 160 μ M de HisSUGARWIN2

Figura 12 - Ensaio com Calcofluor White em *C. falcatum*. Os esporos germinados cresceram na ausência de HisSUGARWIN2 e foram expostos a PBS ou cresceram na presença de 160 μ M de HisSUGARWIN2. Barras representam 10 μ m

4.2.2 Ensaio com TUNEL (*transferase dUTP nick-mediated end labeling*) em *Colletotrichum falcatum*

Colletotrichum falcatum apresentou cerca de 91% de núcleos marcados com TUNEL quando tratadas com 160 μ M de 35 SUGARWIN2, indicando a morte celular por apoptose. O controle positivo, com DNase, mostrou 97% de marcação com TUNEL, enquanto no controle negativo, com PBS, não foram observadas marcações (Figuras 13 e 14). A avaliação da porcentagem de núcleos marcados com TUNEL foi baseada na contagem de pelo menos 100 núcleos corados com DAPI, por repetição.

Figura 13 - Porcentagem de hifas de *C. falcatum* marcadas com TUNEL para tratamentos com 160 μ M de 35 SUGARWIN2, DNase (controle positivo) e PBS (controle negativo)

Figura 14 - Ensaio TUNEL em *C. falcatum*. Esporos germinados cresceram na ausência de HisSUGARWIN2 e foram expostos a DNase (controle positivo) ou PBS (controle negativo) ou cresceram na presença de 160 μM de HisSUGARWIN2. Barras representam 10 μm

4.2.3 Teste de viabilidade em *Colletotrichum falcatum*

Apenas os tratamentos com 80 e 160 μM de HisSUGARWIN2 causaram danos à viabilidade do fungo, sendo que estes se tornaram incapazes de se desenvolver após o tratamento (Figura 15).

Figura 15 - Teste de viabilidade em *C. falcatum*. Os esporos germinados foram tratados com diferentes concentrações de HisSUGARWIN2 (20, 40, 80 e 160 μM) por 16 horas. Posteriormente, estes foram transferidos para novas placas contendo meio sólido e mantidos a 25°C por 48 horas. Para o controle negativo foi utilizado PBS

4.3 SUGARWIN2 recombinante não apresenta efeito em *Aspergillus nidulans*

4.3.1 Efeito da HisSUGARWIN2 em *Aspergillus nidulans*

Após os testes com *F. verticillioides* e *C. falcatum*, foram realizados testes em *A. nidulans* para verificar se a atividade da HisSUGARWIN2 afetava fungos filamentosos em geral, ou se seria específica para os fungos fitopatogênicos em estudo. Os resultados mostraram que 160 μM de HisSUGARWIN2 não causam danos sobre *A. nidulans* sendo possível visualizar o mesmo padrão de crescimento de hifas para o controle (PBS) e o tratado com 160 μM de HisSUGARWIN2 (Figura 16).

Figura 16 - Hifas de *Aspergillus nidulans* tratadas com 160 μM de HisSUGARWIN2. Os esporos germinados cresceram na ausência de HisSUGARWIN2 e foram expostos a PBS (A) ou cresceram na presença de 160 μM de HisSUGARWIN2 (B). Barras representam 5 μm

4.4 SUGARWIN1 e 2 recombinantes não apresentam efeito em *Saccharomyces cerevisiae*

4.4.1 Teste da atividade de HisSUGARWIN1 e 2 em *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é um fungo utilizado para a produção de etanol devido a sua capacidade de conversão de açúcar em álcool etílico (ANDRIETTA; STECKELBGRG; ANDRIETTA, 2006). Buscou-se avaliar se a HisSUGARWIN poderia causar danos à levedura, podendo então prejudicar a fermentação, uma vez que a proteína pode estar presente na planta e consequentemente no caldo que será utilizado na fermentação. O interesse neste experimento surgiu do pressuposto de que, talvez, variedades de cana que produzam maior quantidade de SUGARWINs apresentem maior resistência a patógenos favorecendo seu uso biotecnológico. O que torna necessário o conhecimento de seu efeito em *Saccharomyces cerevisiae*. Como no caldo da cana-de-açúcar de uma planta estarão presentes tanto a SUGARWIN1 quanto a SUGARWIN2, para este experimento foram utilizados ambos os homólogos recombinantes.

A princípio, foram utilizadas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 μM tanto para HisSUGARWIN1 quanto para HisSUGARWIN2 , porém os resultados mostraram que tanto HisSUGARWIN1 quanto HisSUGARWIN2 nestas concentrações não inibem o crescimento de *S. cerevisiae* (Figura 17).

Figura 17 - Teste de atividade da HisSUGARWIN1 e 2 em *Saccharomyces cerevisiae*. Em cada poço foram inoculadas 10^4 células de *S. cerevisiae*. Do lado esquerdo, o controle negativo foi representado apenas pelo meio de cultura (YPD), sem levedura e sem a proteína. Do lado direito, o controle positivo foi representado pelo meio de cultura com levedura, sem a proteína. Nas fileiras A, B, C e D foi adicionada a HisSUGARWIN2 e nas fileiras E, F, G e H foi adicionada a HisSUGARWIN1 , nas concentrações de: **1** – 128 μM ; **2** – 64 μM ; **3** – 32 μM ; **4** – 16 μM ; **5** – 8 μM ; **6** – 4 μM ; **7** – 2 μM ; **8** – 1 μM . Volume total do poço: 200 μL . As placas foram mantidas a 30°C por 24 horas

Posteriormente, foram utilizadas maiores concentrações: 125, 187, 250 e 312 μM de HisSUGARWIN1 ou 2. Estas concentrações, também, mostraram não inibir o crescimento de *S. cerevisiae* (Figura 18), indicando que uma planta com maior quantidade de HisSUGARWINs não teria sua fermentação prejudicada.

Figura 18 - Teste de atividade de HisSUGARWIN1 e 2 em *Saccharomyces cerevisiae*. Em cada poço foram inoculadas 10^4 células de *S. cerevisiae*. Do lado esquerdo, o controle negativo foi representado apenas pelo meio de cultura, sem levedura e sem a proteína. Do lado direito, o controle positivo foi representado pelo meio de cultura com a levedura, mas sem a proteína. Nas fileiras A e B foi adicionada a HisSUGARWIN1 e nas fileiras C e D foi adicionada a HisSUGARWIN2 , nas concentrações de: 1 – 125 μM ; 2 - 187 μM ; 3 - 250 μM ; 4 - 312 μM . Volume total do poço: 200 μL . As placas foram mantidas a 30°C e analisadas 24 horas após a inoculação

4.4.2 Ensaio com Iodeto de Propídio em *Saccharomyces cerevisiae*

Este experimento foi utilizado para verificar se poderia estar ocorrendo morte celular em *S. cerevisiae*. As marcações vermelhas indicam células mortas. Os resultados mostram que não há morte celular em *S. cerevisiae* pela ação de HisSUGARWIN1 e 2, como pode ser visto na figura 19, uma vez que o tratamento com ambas as proteínas mostraram índice de mortalidade de 1%, inferior ao próprio controle que foi de 5% (Figura 20). Pode-se ver ao microscópio, também, que nenhuma modificação morfológica ocorreu neste fungo (Figura 19). Para a avaliação quantitativa da coloração com PI, pelo menos 100 células foram contadas por amostra.

Figura 19 - Ensaio com Iodeto de Propídio em *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Controle negativo com PBS; (B) HisSUGARWIN1 na concentração de $160 \mu\text{M}$; (C) HisSUGARWIN2 na concentração de $160 \mu\text{M}$. Barras representam $5 \mu\text{m}$

Figura 20 - Porcentagem de células de *S. cerevisiae* marcadas com PI após tratamento com $160 \mu\text{M}$ de HisSUGARWIN1 ou 2 e PBS (controle negativo)

5 DISCUSSÃO

O sistema de defesa de plantas está sob constante pressão seletiva para aperfeiçoar a sua resposta aos microrganismos patogênicos e aos insetos de forma sincronizada (CUI et al., 2002). Este trabalho mostrou que homólogos da proteína BARWIN em cana-de-açúcar apresentam efeito, *in vitro*, em fungos fitopatogênicos envolvidos no complexo broca-podridão.

Foi possível visualizar alterações na morfologia de hifas de *F. verticillioides* (Figura 4) e *C. falcatum* (Figura 12) quando estes foram tratados com HisSUGARWIN2. As hifas apresentaram visíveis anomalias, e o ensaio com TUNEL mostrou que a proteína induz a fragmentação do DNA nestes fungos (Figuras 9 e 14, para *F. verticillioides* e *C. falcatum*, respectivamente). Os danos morfológicos em *F. verticillioides* aumentam com o tempo de exposição à HisSUGARWIN2 (Figura 5) chegando a mostrar cerca de 80% de hifas com deformações após 16 horas de tratamento. Após tratamento com HisSUGARWIN2, os fungos *F. verticillioides* e *C. falcatum* perdem sua viabilidade e não conseguem crescer novamente em meio de cultura (Figuras 10 e 15).

O padrão de expressão tardia, a exclusiva expressão de SUGARWIN mRNA no local do ferimento e sua localização extracelular (MEDEIROS et al., 2012) suportam a atividade antipatogênica da SUGARWIN.

Outras proteínas da família BARWIN já mostraram efeito contra microrganismos patogênicos *in vitro*. A OsPR-4b de arroz possui atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani* mostrando redução no crescimento do fungo, e também micélios distorcidos ou contraídos (ZHU; SONG; ZHENG, 2006). A proteína WHEATWIN1, de trigo, inibe o crescimento do *Fusarium culmorum* tanto na germinação de esporos quanto no alongamento do tubo germinativo, combinado com alterações morfológicas como inchaço e enrugamento, apresentando também efeito de ribonuclease (BERTINI et al., 2009).

A menor concentração de HisSUGARWIN2 que apresentou atividade em fungos (Figura 3) foi maior do que as testadas em experimentos anteriores com outras proteínas BARWIN (80 µM de HisSGARWIN2 equivale a 1,28 mg/mL). No trabalho de Bertini et al. (2009), tanto a proteína WHEATWIN1 recombinante quanto a proteína nativa, de trigo, na concentração de 75 µg/mL mostrou efeito em *Fusarium culmorum*. Kiba et al. (2003) mostraram que WjAMP-1 purificada, de *Wasabia japonica*, na concentração de 10 a 500 µg/mL inibem o crescimento de vários fungos. Uma diminuição na atividade da proteína HisSUGARWIN2 pode ter ocorrido devido à adição da calda de histidina na proteína expressa.

Os níveis de proteínas da família BARWIN nas plantas podem variar. Os níveis de WHEATWIN2 e 3 em sementes de trigo, são de 10 µg/g e de WHEATWIN4, é de 2 µg/g (CARUSO et al., 2001). Ainda não se sabe os níveis das proteínas SUGARWINs presentes no colmo da cana-de-açúcar atacado por *D. saccharalis*. Novos estudos devem ser realizados para elucidar a atividade das SUGARWINs *in vivo*.

A proteína _{His}SUGARWIN2 não mostrou efeito sobre *S. cerevisiae*, um fungo utilizado na fermentação do caldo da cana para produção de etanol (Figuras 18 e 19), e nem em *A. nidulans*, um fungo filamentoso muito utilizado em pesquisas na área de biologia molecular (Figura 16), indicando sua especificidade para determinados fungos fitopatogênicos como uma estratégia de proteção contra fungos oportunistas.

Com exceção das leveduras, que são unicelulares, os fungos crescem tipicamente por meio de hifas que se estendem apenas no seu ápice e ramificam-se em micélio, com formação de séptos (WESSELS, 1993), sendo esta a região de maior atividade da quitina sintetase (GUEST; LIN; MOMANI, 2004). A diferença na forma de desenvolvimento entre leveduras e fungos filamentosos pode ser a principal causa da ausência do efeito de _{His}SUGARWIN2 em *S. cerevisiae* (Figuras 18 e 19) uma vez que os principais danos são causados na região dos séptos, presentes apenas em fungos filamentosos.

Por outro lado, muitos estudos sugerem que o crescimento filamentoso e formação de conídios são controlados por mecanismos antagônicos em fungos (BOYLAN et al., 1987; ADAMS, et al., 1992; LEE; ADAMS, 1994; MARHOUL; ADAMS, 1995; KAYS et al., 2000; SHIMIZU; KELLER, 2001; BANNO et al., 2005).

Estudos realizados por Jeong et al. (2003) e Li et al. (2006) mostraram que o mecanismo de regulação de proteínas envolvidas na formação da parede celular em *F. verticillioides* e *A. nidulans* não são iguais. O gene *VEA* em *A. nidulans* está envolvido na regulação da formação da parede celular, porém mutantes de *A. nidulans* com deleção em *VEA* não mostram nenhuma alteração na integridade da parede celular do fungo (JEONG et al., 2003). Por outro lado, seu homólogo, *FvVE1* de *F. verticillioides*, é necessário para a composição normal e integridade da parede celular, sendo que seus mutantes apresentam deformações nesta (LI, et al., 2006).

Embora ainda não tenha sido elucidado o mecanismo pelo qual a _{His}SUGARWIN2 afeta a parede celular de *F. verticillioides* (Figura 4) e *C. falcatum* (Figura 12), levando estes fitopatógenos à morte por apoptose (Figuras 9 e 14), fica claro que a proteína está envolvida em algum mecanismo específico para estes fungos, sendo este diferente em *A. nidulans*, que não apresentou alterações morfológicas após o tratamento com _{His}SUGARWIN2 (Figura 16).

Os resultados da ação de ^{His}SUGARWIN2 em *F. verticillioides* e *C. falcatum* sugerem fortemente que a indução dos genes *SUGARWINs* está relacionada com a defesa da planta ao ataque de patógenos oportunistas que se aproveitam da abertura causada pela broca para invadir a planta, visando minimizar seus danos. Vale ressaltar que a expressão dos genes *SUGARWINs* é induzida pelo ataque de lagartas de *D. saccharalis* e fermento (MEDEIROS et al., 2012), ao passo que outros genes da família *BARWIN* são geralmente induzidos por patógenos e fermentos (AGRAWAL et al., 2003; BRAVO et al., 2003; CAPORALE et al., 2004).

Muitos estudos mostram interações entre o ataque de insetos e patógenos em plantas, podendo estas ser favoráveis a ambos, ou não (HATCHER; PAUL, 2000; CUI et al., 2002; GATCH; MUNKVOLD, 2002; SCHULTHESS; CARDWELL; GOUNOUS, 2002; BURG; ALVAREZ-ALFAGEME; ROMEIS, 2012). McFarlane, Govender e Rutherford (2009) demonstraram que, em cana-de-açúcar, alguns isolados de *Fusarium spp.* apresentam efeito positivo na sobrevivência das larvas, e na taxa de desenvolvimento, de *Eldana saccharina* de tal modo que, variedades consideradas com aceitável resistência à broca do caule, mas suscetíveis à infecção por certas espécies de *Fusarium spp.*, mostram aumento nos danos causados por *E. saccharina*. Carruthers, Bergstrom e Haynes (1986) mostraram que a broca europeia do milho *Ostrinia nubilalis* (Hübner), se desenvolve 20% mais rápido em tecidos de milho infectado com *Colletotrichum graminicola*.

Provavelmente, a expressão de genes induzidos por herbivoria, mas com efeito em fitopatógenos, como a SUGARWIN, é uma tentativa da planta diminuir danos maiores causados pela interação entre o patógeno e o inseto.

Neste estudo foi proposto um papel para a indução e função da SUGARWIN2 em cana-de-açúcar. Sua ação foi demonstrada como parte de uma estratégia de defesa da planta contra fungos oportunistas que colonizam a planta após o ataque de *D. saccharalis*. A ausência de efeito contra lagartas de *D. saccharalis* (MEDEIROS et al., 2012), aliada à atividade antipatogênica de SUGARWIN2, mostrada no presente trabalho, suportam a hipótese destes genes serem expressos como parte de uma resposta desencadeada por insetos contra patógenos em cana-de-açúcar.

6 CONCLUSÕES

- A proteína _{His}SUGARWIN2 possui efeito antipatogênico em fungos específicos.
- _{His}SUGARWIN2 causa anomalias morfológicas tanto em *F. verticillioides* quanto em *C. falcatum*, levando estes fitopatógenos à morte por apoptose.
- _{His}SUGARWIN2 não apresenta efeito em *A. nidulans*.
- _{His}SUGARWIN1 e 2 não apresentam efeito em *S. cerevisiae*
- Os genes *SUGARWINS* podem fazer parte de uma estratégia de defesa da cana-de-açúcar contra fungos oportunistas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, T H; HIDE, W. A.; YAGER, L. N.; LEE, B. N. Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 12, n. 9, p. 3827–3833, Sept. 1992.
- ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 1, p. 35–54, Mar. 1998.
- AGRAWAL, G. K.; JWA, N. S.; HAN, K.-S.; AGRAWAL, V. P.; RAKWAL, R. Isolation of a novel rice PR4 type gene whose mRNA expression is modulated by blast pathogen attack and signaling components. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 81–90, Jan. 2003.
- AGUIRRE JUNIOR, J. M. de. Criação de novas variedades de cana de açúcar no estado de São Paulo. Campinas: Instituto Agrônômico, 1936. p. 64.
- ANDRIETTA, M.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. Bioetanol–Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência**, Campinas, n. 7, p. 1–16, out. 2006.
- BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 1, p. 89–105, Jan. 2008.
- 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.
- BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H.V. (Ed.). **Processo de Produção de Álcool**: controle e monitoramento. 2 ed. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996. chap. 4, p. 38–85.
- BERTINI, L.; LEONARDI, L.; CAPORALE, C.; TUCCI, M.; CASCONI, N.; DI BERARDINO, I.; BUONOCORE, V.; CARUSO, C. Pathogen-responsive wheat PR4 genes are induced by activators of systemic acquired resistance and wounding. **Plant Science**, Oxford, v. 164, n. 6, p. 1067–1078, June. 2003.
- BERTINI, L.; CAPORALE, C.; TESTA, M.; PROIETTI, S.; CARUSO, C. Structural basis of the antifungal activity of wheat PR4 proteins. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 583, n. 17, p. 2865–2871, Sept. 2009.
- BOSTOCK, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistances to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.55, p. 99–109, 1999.
- BOYLAN, M. T.; MIRABITO, P. M.; WILLETT, C. E.; ZIMMERMAN, C. R.; TIMBERLAKE, W. E. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 7, n. 9, p. 3113–8, June. 1987.
- BRAVO, J. M.; CAMPO, S.; MURILLO, I.; COCA, M.; SAN SEGUNDO, B. Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 52, n. 4, p. 745–59, Mar. 2003.
- BROEKAERT, I.; LEE, H. I.; KUSH, A.; CHUA, N. H.; RAIKHEL, N. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Boston, v. 87, n. 19, p. 7633–7, Oct. 1990.
- BURG, S. Von; ALVAREZ-ALFAGEME, F.; ROMEIS, J. Indirect effect of a transgenic wheat on aphids through enhanced powdery mildew resistance. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 10, p. e46333, June, 2012.
- CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 3, p. 446–459, Sept. 2002.

- CAPORALE, C.; BERARDINO, I. DI; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; CASCONI, A.; BUONOCORE, V.; CARUSO, C. Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 575, n. 1-3, p. 71–6, Jul. 2004.
- CARMONA-GUTIERREZ, D.; EISENBERG, T.; BÜTTNER, S.; MEISINGER, C.; KROEMER, G.; MADEO, F. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 17, n. 5, p. 763–73, Jan. 2010.
- CARUSO, C.; BERTINI, L.; TUCCI, M.; CAPORALE, C.; LEONARDI, L.; SACCARDO, F.; BRESSAN, R. A.; VERONESE, P.; BUONOCORE, V. Isolation and characterisation of wheat cDNA clones encoding PR4 proteins. **DNA Sequence: The Journal of DNA Sequencing and Mapping**, London, v. 10, p. 301-307, 1999.
- CARUSO, C.; NOBILE, M.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; BUONOCORE, V.; CAPORALE, C. Isolation and amino acid sequence of two new PR-4 proteins from wheat. **Journal of Protein Chemistry**, Viterbo, v. 20, n. 4, p. 327–335, May 2001.
- CARRUTHERS, R. I.; BERGSTROM, G. C.; HAYNES, P. A. Accelerated development of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae), induced by interactions with *Colletotrichum graminicola* (Melanconiales: Melanconiaceae), the causal fungus of maize anthracnose. **Annals of the Entomological Society of America**, Maryland, v. 79, n. 3, p.385– 389, May 1986.
- CASSELTON, L.; ZOLAN, M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 3, n. 9, p. 683–97, Sep. 2002.
- CHRISTENSEN, A. B.; CHO, B. H.; NÆSBY, M. GREGERSEN, P. L.; BRANDT, J.; MADRIZ-ORDEÑANA, K.; COLLINGE, D. B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 135–44, May. 2002.
- CHULZE, S. N.; RAMIREZ, M. L.; TORRES, A.; LESLIE, J. F. Genetic variation in *Fusarium* section *Liseola* from no-till maize in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5312–5315, Dez. 2000.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2012 - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília : Conab, 2012. p. 18.
- CORELL J.C.; KLITTICH C.J.R.; LESLIE J.F. Heterokaryon self-incompatibility in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). **Mycological Research**, Manchester, v. 93, n. 1, p. 21–27, July. 1989
- CUI, J.; JANDER, G.; RACKI, L. R.; KIM, P. D.; PIERCE, N. E.; AUSUBEL, F. M. Signals involved in *Arabidopsis* resistance to *Trichoplusia ni* caterpillars induced by virulent and avirulent strains of the phytopathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n., p. 551–564, June, 2002.
- DANIELSEN, S.; MEYER, U. M.; JENSEN, D. F. Genetic characteristics of *Fusarium verticillioides* isolates from maize in Costa Rica. **Plant Pathology**, San Diego, v. 47, n. 5, p. 615–622, Oct. 1998.
- DATTA K.; MUTHUKRISHNAN, S.; DATTA S. K. Expression and function of PR-protein genes in transgenic plants. In: DATTA, S. K, MUTHUKRISHNAN, S. (Ed), **Pathogenesis-Related Proteins in Plants**, Boca Raton, 1999. chap. 13, p. 261–277.
- DE WIT, P.J.G.M. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. **Trends Plant Science**, Wageningen, v. 2, p. 452–458, Dec. 1997.
- DINARDO-MIRANDA, L. L. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L. L., VASCONCELOS, A. C. M. de, LANDELL, M. G. de A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2010. chap 1, p. 394-404.
- DUTTAMAJUMDER, S.K., SINGH, N.; AGNIHOTRI, V.P. Behavior of *Colletotrichum falcatum* under waterlogged condition. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 43, n. 2, p. 227-229, 1990

- EPPLÉ, P.; APEL, K.; BOHLMANN, H. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 4, p. 509–20, Apr. 1997.
- ERICSSON, M.; HANSTORP, D.; HAGBERG, P.; ENGER, J.; NYSTRÖM, T. Sorting out bacterial viability with optical tweezers. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 19, p. 5551–5555, Oct. 2000.
- FELTON, G. W.; KORTH, K. L.; BI, J. L. WESLEY, S. V.; HUHMANN, D. V.; MATHEWS, M. C.; MURPHY, J. B.; LAMB, C.; DIXON, R. A. Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and to insect herbivory. **Current Biology : CB**, Cambridge, v. 9, n. 6, p. 317–20, Mar. 1999.
- FEREA, T. L.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O.; ROSENZWEIG, R. F. Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Boston, v. 96, n. 17, p. 9721–6, June, 1999.
- FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do instituto agrônômico no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L. L., VASCONCELOS, A. C. M. de, LANDELL, M. G. de A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2010. chap 1, p. 31-44.
- FRIEDRICH, L.; MOYER, M.; WARD, E.; RYALS, J. Pathogenesis-related protein 4 is structurally homologous to the carboxy-terminal domains of hevein, Win-1 and Win-2. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 230, n. 1-2, p. 113–9, May 1991.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; BERTI FLHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. p. 450-462.
- GATCH, E. W.; MUNKVOLD, G. P. Fungal species composition in maize stalks in relation to european corn borer injury and transgenic insect protection. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 10, p. 1156–1162, June. 2002.
- GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205–27, Mar. 2005.
- GOHARI, A. M.; JAVAN-NIKKHAH, M.; HEDJAROUDE, G. A.; ABBASI, M.; RAHJOO, V.; SEDAGHAT, N. Genetic diversity of *Fusarium verticillioides* isolates from maize in Iran based on vegetative compatibility grouping. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 90, n. 1, p. 113-116, 2008.
- GUEST, G.M.; LIN, X.; MOMANI, M. *Aspergillus nidulans* Rho A is involved in polar growth and cell wall synthesis. **Fungal Genetics and Biology**, Madison, v. 41, pp. 13–22, Jan. 2004.
- GUEVARA-MORATO, M.A.; DE LACOBIA, M. G.; GARCÍA-LUQUE, I.; SERRA, M. T. Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L3 plants with dual RNase and DNase activities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.61, p. 3259–3271, May. 2010.
- HATCHER, P. E.; PAUL, N. D. On integrating molecular and ecological studies of plant resistance: variety of mechanisms and breadth of antagonists. **Journal of Ecology**, London, v. 88, n. 4, p. 702–706, Aug. 2000.
- HEJGAARD, J.; JACOBSEN, S.; BJØRN, S. E.; KRAGH, K. M. Antifungal activity of chitin-binding PR-4 type proteins from barley grain and stressed leaf. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 307, n. 3, p. 389–92, Aug. 1992.
- JEONG, H.Y.; KIM, H.; HAN, D.M.; JAHNG, K.Y.; CHAE, K.S. Expression of the *mnpA* gene that encodes the mannoprotein of *Aspergillus nidulans* is dependent on *fadA* and *flbA* as well as *veA*. **Fungal Genetics and Biology**, Jeonju, v. 38, n. 2, p. 228– 236, Mar. 2003.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, n. 16, p. 323–329, Nov. 2006.
- JOOSTEN, M. H. A. H.; BERGMANS, C. J. B.; MEULENHOF, E. J. S.; CORNELISSEN, B. J. C.; DEWIT, P. J. G. M. Purification and serological characterization of three basic 15 kDa pathogenesis-related proteins from tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 94, p. 585–591, June, 1990.

KAYS, A. M.; ROWLEY, P. S.; BAASIRI, R. A.; BORKOVICH, K. A. Regulation of conidiation and adenylyl cyclase levels by the galpha protein GNA-3 in *Neurospora crassa*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 20, n. 20, p. 7693–7705, Oct. 2000.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 299–328, June. 2002.

KIBA, A.; SAITOH, H.; NISHIHARA, M.; OMIYA, K.; YAMAMURA, S. C-terminal domain of a hevein-like protein from *Wasabia japonica* has potent antimicrobial activity. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 296–303, Mar. 2003.

KOORNNEEF, A.; LEON-REYES, A.; RITSEMA, T.; VERHAGE, A.; DEN OTTER, F. C.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 3, p. 1358–68, July 2008.

KRAPPMANN, S.; BAYRAM, O.; BRAUS, G. H. 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.

LAUDERT, D.; WEILER, E. W. Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. **The Plant Journal**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 675–84, Mar. 1998.

LAWTON, K. A.; POTTER, S. L.; UKNES, S.; RYALS, J. Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 5, p. 581–588, May 1994.

LEE, B.N.; ADAMS, T.H. Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. **Molecular Microbiology**, Texas, v. 14, n. 2, p. 323–334, Oct. 1994.

LEW, D. J.; REED, S. I. Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 5, p. 17–23, Feb., 1995.

LI, S.; MYUNG, K.; GUSE, D.; DONKIN, B.; PROCTOR, R. H.; GRAYBURN, W. S.; CALVO, A. M. *FvVE1* regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides*. **Molecular Microbiology**, Texas, v. 62, n. 5, p. 1418–1432, Oct. 2006.

LI, X.; XIA, B.; JIANG, Y.; WU, Q.; WANG, C.; HE, L.; PENG, F.; WANG, R. A new pathogenesis-related protein, LrPR4, from *Lycoris radiata*, and its antifungal activity against *Magnaporthe grisea*. **Molecular Biology Reports**, Basel, v. 37, n. 2, p. 995–1001, Aug. 2010.

LINTHORST, H. J. M.; DANHASH, N.; BREDERODE, F. T.; VAN KAN, J. A. L.; DE WIT, P. J. G. M.; BOL, J. F. Tobacco and tomato PR proteins homologous to win and pro-hevein lack the ‘hevein’ domain. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 4, p. 585–592, Dec. 1991.

MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; FRÖHLICH, K. U. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 139, n. 3, p. 729–34, Nov. 1997.

MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; LIGR, M.; GREY, M.; SIGRIST, S. J.; WOLF, D. H.; FRÖHLICH, K. U. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 145, n. 4, p. 757–67, May 1999.

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 (Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

MARHOUL, J.; ADAMS, T. Identification of developmental regulatory genes in *Aspergillus nidulans* by overexpression. **Genetics**, Baltimore, v. 139, p. 537–547, Oct. 1995.

- MCFARLANE, S. A.; GOVENDER, P.; RUTHERFORD, R. S. Interactions between *Fusarium* species from sugarcane and the stalk borer, *Eldana saccharina* (Lepidoptera: Pyralidae). **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 155, n. 3, p. 349–359, May 2009.
- MEDEIROS, A. H.; FRANCO, F. P.; MATOS, J. L.; DE CASTRO, P. A.; SANTOS-SILVA, L. K.; HENRIQUE-SILVA, F.; GOLDMAN, G. H.; MOURA, D. S. SILVA-FILHO, M. C. Sugarwin: A sugarcane insect-induced gene with antipathogenic activity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 25, n. 5, p. 613–624, May 2012.
- MELLO, M. L. S.; CASTILHO, R.F. Morte celular. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. 2. ed. Barueri: Manoele, 2007. chap. 26, p. 364-373.
- MENOSSE, M.; SILVA-FILHO, M. C.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M.; SOUZA, G. M. Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. **International Journal of Plant Genomics**, Cairo, v. 2008, p. 1-11, Nov. 2008.
- MITCHELL, R. G.; CHAPLIN, A J.; MACKENZIE, D. W. *Emericella nidulans* in a maxillary sinus fungal mass. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 25, n. 5, p. 339–41, June 1987.
- MOHAMMADI, A.; NEJAD, R.; MOFRAD, N. *Fusarium verticillioides* from sugarcane, vegetative compatibility groups and pathogenicity. **Plant Protection Science**, Prague, v. 48, n. 2, p. 80–84, 2012.
- MONHEIT, J.E.; COWAN, D.F.; MOORE, D.G. Rapid detection of fungi in tissues using Calcofluor White and fluorescence microscopy. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Northfield, v. 108, n. 8, p. 616–618, Aug. 1984.
- MUR, L.A.J.; KENTON, P.; ATZORN, R.; MIERSCH, O.; WASTERACK, C. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 249–262, Jan. 2006.
- NIDERMAN, T.; GENETET, I.; BRUYÈRE, T.; GEES, R.; STINTZI, A.; LEGRAND, M.; FRITIG, B.; MOSINGER, E. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal: Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 17–27, May 1995.
- NÜRNBERGER, T.; KEMMERLING, B. Pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and PAMP-triggered immunity. **Annual Plant Reviews**, New York, v. 34, p. 16–47, Oct. 2009.
- OGUNWOLU, E.; REAGAN, T.; FLYNN, J.; HENSLEY, S. Effects of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) damage and stalk rot fungi on sugarcane yield in Louisiana. **Crop Protection**, Guildford, v. 10, p. 57–61, Feb 1991.
- PAUL, N.; HATCHER, P.; TAYLOR, J. Coping with multiple enemies: an integration of molecular and ecological perspectives. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 5, p. 220–225, May 2000.
- PIETERSE, C. M. J.; LEON-REYES, A.; ENT, S. VAN DER; WEES, S. C. M. VAN. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, London, v. 5, n. 5, p. 308–16, Apr. 2009.
- POMPERMAYER P. **Identificação e caracterização de um promotor de cana-de-açúcar induzido por herbivoria**. 2004. 142 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- PONSTEIN, A. S.; BRES-VLOEMANS, S. A.; SELA-BUURLAGE, M. B.; VAN DEN ELZEN, P. J. M.; MELCHERS, L. S.; CORNELISSEN, B. J. C. A novel pathogen and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, p. 109–118, 1994.
- PUJADE-RENAUD, V.; SANIER, C.; CAMBILLAU, L.; PAPPUSAMY, A.; JONES, H.; RUENGSR, N.; THARREAU, D.; CHRESTIN, H.; MONTORO, P.; NARANGAJAVANA, J. Molecular characterization of new members of the *Hevea brasiliensis* hevein multigene family and analysis of their promoter region in rice. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1727, n. 3, p. 151–61, 2005.

- RYAN, CA. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, n. 1, p. 425–449, Sep. 1990.
- SANTOS, A. da S. 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 Agronômico, 2010. chap 1, p. 423–435.
- SCHULTHESS, F.; CARDWELL, K. F.; GOUNOU, S. The effect of endophytic *Fusarium verticillioides* on infestation of two maize varieties by lepidopterous stemborers and coleopteran grain feeders. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 2, p. 120–8, Oct. 2002.
- SCHLUMBAUM, A.; MAUCH, F.; VOGELI, U.; BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, London, v. 324, p. 365–367, Nov. 1986.
- SCHWEIZER, P.; BUCHALA, A.; DUDLER, R.; MÉTRAUX, J. P. Induced systemic resistance in wounded rice plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 14, p. 475–481, Feb. 1998.
- SHIMIZU, K.; KELLER, N. P. Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, Baltimore, v. 157, n. 2, p. 591–600, 2001.
- SINGH, R. K.; MISHRA, S. K.; SINGH, S. P.; MISHRA, N. SHARMA, M. L. 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.
- SOKOLOV, S. S.; KALEBINA, T. S.; AGAFONOV, M. O.; ARBATSKII, N. P.; KULAEV, I. S. Comparative analysis of the structural role of proteins and polysaccharides in cell walls of the yeasts *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 384, n. 3, p. 172–5, May, 2002.
- STANFORD, A.; BEVAN, M.; NORTHCOTE, D. Differential expression within a family of novel wound-induced genes in potato. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 215, p. 200–208, 1989.
- STASWICK, P. E.; YUEN, G. Y.; LEHMAN, C. C. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 747–54, July 1998.
- STENNIS, M.; CHANDRA, S.; RYAN, CA; LOW, P. Systemin potentiates the oxidative burst in cultured tomato cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 3, p. 1031–6, July 1998.
- STOUT, M. J.; THALER, J. S.; THOMMA, B. P. H. J. Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 663–89, Mes, 2006.
- SVENSSON, B.; SVENDSEN, I.; HØJRUP, P.; ROEPSTORFF, P.; LUDVIGSEN, S.; POULSEN, F. M. Primary structure of barwin: a barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. **Biochemistry**, Washington, v. 31, n. 37, p. 8767–70, June 1992.
- TERRAS, F. R.; PENNINGCKX, I. A.; GODERIS, I. J.; BROEKAERT, W. F. Evidence that the role of plant defensins in radish defense responses is independent of salicylic acid. **Planta**, Berlin, v. 206, n. 1, p. 117–24, Mar. 1998.
- THALER, J.; FIDANTSEF, A.; DUFFEY, S.; BOSTOCK, R. Trade-offs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration of chemical elicitors of induced resistance. **Journal of Chemical Ecology**, London, v. 25, n. 7, p. 1597–1609, Mar. 1999.
- THOMMA, B. P.; EGGERMONT, K.; PENNINGCKX, I. A.; MAUCH-MANI, B.; VOGELSANG, R.; CAMMUE, B. P.; BROEKAERT, W. F. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Boston, v. 95, n. 25, p. 15107–11, Sep. 1998.

TOKESHI, H. **Doenças da cana-de-açúcar**. Piracicaba: IAA, 19-?. p. 31-43.

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, 1997. p. 658-751.

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, 2005. v. 2. chap. 21, p. 185-196.

UNICA. **União da Agroindústria de cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br/>>. Acesso em: 15 nov. 2012.

VAN LOON, L. Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 4, p. 111–116, 1985.

VIGERS, A. J.; WIEDEMA, N. N. S.; ROBERTS, W. K.; LEGRAND, M.; SELITRENNIKOFF, C. P.; FRITIG, B. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. **Plant Science**, Oxford, v. 83, p. 155–161, 1992.

VIJAYAN, P.; SHOCKEY, J.; LÉVESQUE, C. A.; COOK, R. J.; BROWSE, J. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Boston, v. 95, n. 12, p. 7209–14, Mar. 1998.

WALLING, L. L. The myriad plant responses to herbivores. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 19, p. 195–216, Jun. 2000.

WESSELS, J. G. H. Tansley Review No. 45. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. **New Phytologist**, Oxford, v. 123, n. 3, p. 397–413, Mar. 1993.

WINELAND, G.O. An ascigerous stage and synonymy for *Fusarium moniliforme*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 28, n. 9, p. 909–922, May 1924.

XU, Y.; CHANG, P.; LIU, D.; NARASIMHAN, M. L.; RAGHOTHAMA, K. G.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 8, p. 1077–1085, Aug. 1994.

ZHU, T.; SONG, F.; ZHENG, Z. Molecular characterization of the rice pathogenesis-related protein, OsPR-4b, and its antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, 154, n. 6, p. 378–384, 2006.