



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS,
PROVENIENTES DA SECREÇÃO ORAL DE *Diatraea saccharalis* (Fabricius,
1794) (Lepidoptera: Crambidae) COLETADA EM CAMPO, ANTAGÔNICOS A
Fusarium verticillioides (Nirenberg, 1976) E *Colletotrichum falcatum* (Went,
1893)

LARISSA CHARIEL DOMINGOS DA SILVA

Araras
2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

LARISSA CHARIEL DOMINGOS DA SILVA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANE HACKBART DE MEDEIROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586b Silva, Larissa Chariel Domingos da
Bioprospecção de isolados de leveduras e
bactérias, provenientes da secreção oral de *Diatraea
saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera:
Crambidae) coletada em campo, antagônicos a *Fusarium
verticillioides* (Nirenberg, 1976) e *Colletotrichum
falcatum* (Went, 1893) / Larissa Chariel Domingos da
Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
46 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Controle biológico. 2. Broca-da-cana. 3.
Fitopatógenos. 4. Cana-deaçúcar. I. Título.

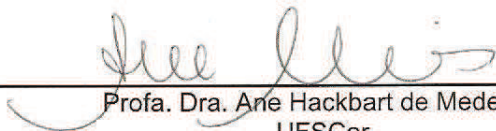


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos
Associados

Folha de Aprovação

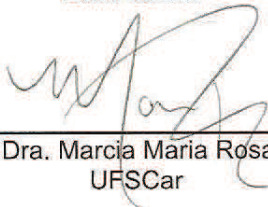
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Larissa Chariel Domingos da Silva, realizada em 28/06/2016:



Profa. Dra. Ane Hackbart de Medeiros
UFSCar



Profa. Dra. Ana Beatriz Rigueti Zanardo Botelho
ESALQ/USP



Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri
UFSCar

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Universidade Federal de São Carlos, ao Centro de Ciências Agrárias, à pós-graduação e aos professores, pela oportunidade de cursar o mestrado, pelo acolhimento e ensinamentos;

Ao meu pai, Miranda, pelo incentivo em me dedicar aos meus estudos e nunca fraquejar diante das dificuldades, persistir e assim alcançar meus objetivos e realizar meus sonhos e à memória de minha mãe, Ana Maria, que certamente, esteve e estará sempre ao meu lado, esteja ela aonde estiver;

Ao meu irmão Rômulo, que de seu modo sempre esteve ao meu lado;

Ao meu querido e amado Maurício, por todo apoio, companheirismo, incentivo, ânimo, paciência, amor e carinho. Obrigada por estar sempre ao meu lado, você torna a minha vida mais feliz e completa;

Aos meus futuros sogros, Marisa e Wilson por me incentivarem a continuar meus estudos e por toda a ajuda que me deram;

À professora Ane Hackbart de Medeiros, pela orientação, por me ensinar, pela paciência, dedicação, persistência, disposição e apoio. Sempre levarei seus ensinamentos comigo. Obrigada!

Ao professor Ítalo Delalibera Júnior pelo acolhimento e pela oportunidade de desenvolver meu projeto em seu laboratório;

Aos amigos do Laboratório de Patologia de insetos e Controle Microbiano da ESALQ/USP em especial a Solange Barros por todos os ensinamentos, paciência e dedicação, muito obrigada por tudo! À Celeste D'Alessandro, Vanessa Duarte e Ana Beatriz Zanardo pelos conselhos, ajuda e incentivos. À Ana Carolina Oliveira Siqueira pela amizade e companheirismo no laboratório e nos momentos de descontração e à Fabiana Garcia pelo acolhimento e risadas em minha estada em Piracicaba;

Ao Inácio, por toda ajuda, esforço e dedicação, pelos momentos de aprendizado mútuo e paciência. Obrigada por fazer parte dessa caminhada;

Ao professor Rodrigo Gazaffi pelo auxílio nas análises estatísticas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|-----------|
| ÍNDICE DE TABELAS..... | i |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | ii |
| RESUMO..... | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 2 OBJETIVOS..... | 04 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA..... | 04 |
| 3.1 Simbiontes de artrópodes..... | 04 |
| 3.2 Simbiontes de <i>D. saccharalis</i>..... | 06 |
| 3.3 Associação da broca-da-cana com fungos causadores de podridão..... | 07 |
| 3.4 Endossimbiontes usados no controle biológico..... | 09 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 10 |
| 4.1 Coleta de lagartas de <i>D. saccharalis</i> em lavouras de cana-de-açúcar..... | 10 |
| 4.2 Coleta da secreção oral e plaqueamento em meio seletivo..... | 10 |
| 4.3 Seleção do meio de cultura para co-cultivo de isolados da secreção oral e fitopatógenos <i>F. verticillioides</i> e <i>C. falcatum</i>..... | 11 |
| 4.4 <i>Screening</i> inicial de isolados de bactérias e leveduras, quanto à capacidade de inibição ao crescimento de fitopatógenos..... | 12 |
| 4.5 Avaliação da porcentagem de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos..... | 15 |
| 4.6 Identificação de Bactérias, amplificação do DNA e sequenciamento..... | 16 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 17 |
| 5.1 Isolamento de leveduras e bactérias provenientes da secreção oral de <i>D. saccharalis</i> coletada no campo..... | 17 |
| 5.2 Escolha do meio de cultura mais apropriado para co-cultivo de <i>F. verticillioides</i> ou <i>C. falcatum</i> e isolados de levedura ou bactéria..... | 17 |
| 5.3 <i>Screening</i> inicial de isolados de bactérias e leveduras, quanto à | 21 |

| | | |
|-----|--|----|
| | capacidade de inibição ao crescimento de fitopatógenos..... | |
| | 5.3.1 Categorização de isolados de bactérias na interação com <i>F. verticillioides</i> e <i>C. falcatum</i> | 21 |
| | 5.3.2 Categorização de isolados de leveduras na interação com <i>F. verticillioides</i> e <i>C. falcatum</i> | 21 |
| 5.4 | Porcentagem de inibição ao crescimento de <i>F. verticillioides</i> e <i>C. falcatum</i> , exercida pelos isolados da secreção oral de <i>D. saccharalis</i> | 24 |
| | 5.4.1 Inibição ao crescimento de <i>F. verticillioides</i> por isolados de leveduras..... | 24 |
| | 5.4.2. Inibição ao crescimento de <i>C. falcatum</i> por isolados de leveduras..... | 26 |
| | 5.4.3. Inibição ao crescimento de <i>F. verticillioides</i> por isolados de bactérias..... | 27 |
| | 5.4.4. Inibição ao crescimento de <i>C. falcatum</i> por isolados de bactérias..... | 28 |
| 5.5 | Identificação, por meio de sequenciamento de DNA, das bactérias e leveduras cultiváveis da secreção oral de <i>D. saccharalis</i> | 35 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 37 |
| 7 | LITERATURA CITADA..... | 38 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| <p>Tabela 1. Avaliação categórica, adaptada de Bell; Wells e Markham (1982) usada no screening inicial dos isolados de bactéria e levedura da secreção oral de <i>D. saccharalis</i></p> | 13 |
| <p>Tabela 2. Número de isolados, antes e após o <i>screening</i> inicial, onde foi realizada a categorização dos isolados quanto à influência no crescimento de <i>F. verticillioides</i> e <i>C. falcatum</i></p> | 14 |
| <p>Tabela 3. Percentual de inibição do crescimento de <i>F. verticillioides</i> exercida por isolados de levedura, medido aos 5, 9, 11 e 14 dias após a inoculação. Valores são a média de três repetições. Médias seguidas da mesma letra na vertical, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).....</p> | 30 |
| <p>Tabela 4. Percentual de inibição do crescimento de <i>C. falcatum</i> exercida por isolados de levedura, medido aos 6, 8, 15, 20 dias após a inoculação. Valores são a média de três repetições. Médias seguidas da mesma letra na vertical, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).....</p> | 31 |
| <p>Tabela 5. Percentual de inibição do crescimento de <i>F. verticillioides</i> exercida por isolados de bactéria, medido aos 4, 6, 13 e 18 dias após a inoculação. Valores são a média de três repetições. Médias seguidas da mesma letra na vertical, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).....</p> | 33 |
| <p>Tabela 6. – Percentual de inibição do crescimento de <i>C. falcatum</i> exercida por isolados de bactéria. Medido aos 4, 6, 13 e 18 dias após a inoculação. Valores são a média de três repetições. Médias seguidas da mesma letra na vertical, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).....</p> | 34 |
| <p>Tabela 7. Identificação de isolados de bactéria, provenientes de secreção oral de <i>D. saccharalis</i>, coletada no campo.....</p> | 36 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| <p>Figura 1. Escala de interação em co-cultivo, adaptada de Bell; Wells e Markham (1982). Categoria 1: fitopatógeno cresce por cima do microrganismo da secreção oral, nessa foto ilustrando a interação entre <i>F. verticillioides</i> e isolado de levedura 3.1; Categoria 2: fitopatógeno tem crescimento reduzido pelo isolado (levedura ou bactéria) da secreção oral, mas ao fim do período de incubação, o fitopatógeno cresce levemente por cima do isolado, nessa foto ilustrando a interação entre <i>C. falcatum</i> e isolado de levedura 1.2; Categoria 3: fitopatógeno cresce até próximo da colônia do microrganismo da secreção oral, e não cresce por cima, nessa foto mostrando a interação entre <i>F. verticillioides</i> e isolado de levedura 4.5; Categoria 4: fitopatógeno tem crescimento reduzido nas proximidades da colônia do isolado da secreção oral com formação do halo de inibição, que se mantém por todo o período de incubação, nessa foto mostrando a interação entre <i>C. falcatum</i> e isolado de bactéria 10.2.....</p> | 13 |
| <p>Figura 2. Exemplo de medição de crescimento do fitopatógenos para determinação de porcentagem de inibição.....</p> | 15 |
| <p>Figura 3. Coleta de lagartas de quarto e quinto ínstar de <i>D. saccharalis</i> no campo.....</p> | 19 |
| <p>Figura 4. Exemplo de placa em meio N.A. para seleção de bactérias da secreção oral de lagarta coletada em campo.....</p> | 19 |
| <p>Figura 5. Co-cultivo entre isolado 3.9 de levedura da secreção oral de <i>D. saccharalis</i> e <i>F. verticillioides</i> (fotos A a D) e <i>C. falcatum</i> (fotos E a H) e entre isolado 9.1 de bactéria e <i>F. verticillioides</i> (fotos I a L) e <i>C. falcatum</i> (fotos M a P) em relação aos meios de cultura utilizados. Os meios de cultivo utilizados foram BDA (A, E, I, M), YEPD (B, F, J, N), CCS (C, G, K, O) e NA (D, H, L, P) e as fotos foram retiradas, para todos os meios, aos 7 dias após inoculação.....</p> | 20 |
| <p>Figura 6. Porcentagem de classe de interação (adaptada de Bell; Wells e Markham, 1982), separadas por lagarta (eixo horizontal). Interação entre bactérias e <i>F. verticillioides</i> (A) e <i>C. falcatum</i> (B), e entre leveduras e <i>F.</i></p> | 23 |

verticillioides (C) e *C. falcatum* (D) em função do meio de cultura utilizado (BDA).....

Figura 7. Crescimento de *F. verticillioides* e *C. falcatum*, na presença ou ausência de isolados de bactéria e levedura da secreção oral de *D. saccharalis*. O crescimento foi avaliado em 4 dias após a inoculação, pela medição do raio do fungo em direção à colônia de bactéria ou levedura, comparado com o raio do fungo na placa controle, (ausência de isolado de bactéria ou levedura). (A) Co-cultivo de *F. verticillioides* e isolados 7.2, 9.1 e 10.2 de bactéria; (B) Co-cultivo de *C. falcatum* e isolados 7.2, 9.1 e 10.2 de bactéria; (C) Co-cultivo de *F. verticillioides* e isolados 1.3, 3.2 e 5.3 de levedura e (D) Co-cultivo de *C. falcatum* e isolados 1.14, 1.15 e 4.3 de levedura.....

29

BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS, PROVENIENTES DA SECREÇÃO ORAL DE *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) COLETADA EM CAMPO, ANTAGÔNICOS A *Fusarium verticillioides* (Nirenberg, 1976) E *Colletotrichum falcatum* (Went, 1893)

Autor: LARISSA CHARIEL DOMINGOS DA SILVA

Orientador: Prof^a. Dr^a. ANE HACKBART DE MEDEIROS

RESUMO

Simbiontes de insetos podem ter funções desconhecidas na interação entre inseto-planta e do inseto com microrganismos que co-habitam o mesmo espaço. O objetivo desse estudo foi investigar o potencial de antagonismo da microbiota simbiote, presentes na secreção oral de *Diatraea saccharalis*, com os fitopatógenos *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum* que habitam o colmo de cana-de-açúcar. Para isso, foram coletadas, nas variedades de cana RB-835054 e SP-813250, lagartas de 4^o e 5^o instar e trazidas para o laboratório junto aos toletes de cana. A microbiota da secreção oral foi transferida para dois meios de cultura seletivos, NA (nutrient agar) para bactérias e DRBC (Dicloran Rosa-de-Bengala Cloranfenicol) para leveduras. Baseado na morfologia e coloração das colônias, foram selecionadas, vinte colônias de bactéria e também de levedura de 5 lagartas. Foram testados quatro meios de cultura: BDA (batata, dextrose, agar), YEPD (yeast extract, peptone, dextrose), CCS (caldo-de-cana suplementado) e NA para os testes de cultivo pareado. O meio de cultura mais adequado para o crescimento da maioria dos microrganismos foi o BDA. O potencial de antagonismo de 82 isolados de bactéria e 87 isolados de levedura a *C. falcatum* e *F. verticillioides* foi avaliado através de uma escala visual de categorias de 1 a 4, sendo 4 o grau máximo de antagonismo. Os isolados a que foi atribuída categoria maior ou igual a dois foram avaliados em co-cultivo com *C. falcatum* e *F. verticillioides* quanto à porcentagem de inibição do crescimento. Foi possível identificar 4 isolados de bactéria que tem o potencial de inibir o crescimento dos fitopatógenos e 9 isolados com o mesmo potencial, porém com porcentagens menores. Esses resultados demonstram que alguns isolados de bactérias e leveduras podem influenciar na relação existente entre o complexo broca-podridão e a planta de cana-de-açúcar, podendo, futuramente, serem utilizados como controle biológico desses fitopatógenos ou terem algumas moléculas de interesse biotecnológico extraída e purificada.

Palavras-chave: Controle Biológico; Broca-da-cana; Fitopatógenos; Cana-de-açúcar.

BIOPROSPECTION OF YEAST AND BACTERIA ISOLATES FROM ORAL SECRETION OF FIELD-COLLECTED *DIATRAEA SACCHARALIS* (FABRICIUS, 1794) (LEPIDOPTERA: Crambidae) ANTAGONIC TO *Fusarium verticillioides* (Nirenberg, 1976) AND *Colletotrichum falcatum* (Went, 1893)

Author: LARISSA CHARIEL DOMINGOS DA SILVA

Adviser: Prof. Dr. ANE HACKBART DE MEDEIROS

ABSTRACT

Insect symbionts may have unknown functions in the interaction between insect-plant and insect with microorganisms that co-inhabit the same space. The objective of this study was to investigate the antagonism potential of symbiont microbiota from oral secretion *D. saccharalis* collected in the field, against *Fusarium verticillioides* and *Colletotrichum falcatum* pathogens commonly found inside the cane. For this, 4^o and 5^o instar caterpillars were collected inside sugarcane varieties RB-835 054 and SP-813 250, and brought to the lab inside the cane stalks. The microbiota of oral secretion was transferred to two selective media, NA (nutrient agar) for bacteria and DRBC (dicloran Rose Bengal Chloramphenicol) for yeast. Based on morphology and coloration of the colonies twenty colonies of bacteria and yeast were selected. Four culture media were tested in co-cultivation of *F. verticillioides* and *C. falcatum* versus bacteria or yeast isolates: PDA (potato, dextrose, agar), YEPD (yeast extract, peptone, dextrose), CCS (supplemented cane broth) and NA (Nutrient Agar). The most suitable culture medium for growth of most microorganisms was BDA. Antagonism potential of 82 bacterial isolates and 87 yeast isolates to *C. falcatum* and *F. verticillioides* was assessed using a visual scale of categories 1 to 4, with 4 being the maximum degree of antagonism. Isolates that allocated category greater than or equal to 2 were evaluated in co-culture with *C. falcatum* and *F. verticillioides* as the percentage of growth inhibition. It was possible to identify four isolates of bacteria which have the potential to inhibit growth of pathogens and 9 isolates with the same potential but with much lower percentages. These results demonstrate that some isolates of bacteria and yeast may influence the relationship between the bit-rot complex and sugarcane plant, may in future be used as a biological control of these pathogens or have some molecules of biotechnological interest extracted and purified.

Keywords: Biological Control; sugarcane Borer; Plant pathogens; Sugar cane.

1. INTRODUÇÃO

A associação entre simbiontes (bactérias, algas, fungos e protozoários) e artrópodes é documentada de longa data, e a literatura tem ótimas revisões sobre o assunto (DOUGLAS, 1998; BIGNELL, 1984; BOUSH; COPPEL, 1974; ANDERSON; RAYNER; WALTON, 1984). Insetos tem um dos estilos de vida com mais sucesso na Terra. Um fator importante para seu sucesso é que insetos podem se alimentar de uma variabilidade grande de dietas. Esses hábitos alimentares flexíveis são possíveis, pelo menos em parte, aos simbiontes que eles abrigam (ISHIKAWA, 2003).

Os simbiontes são frequentemente observados perto do trato digestório dos artrópodes, e é amplamente aceito que esse grupo tem função na nutrição do artrópode. Para os simbiontes, o trato digestório dos artrópodes representa um ambiente onde podem estabelecer populações estáveis e adquirir substratos ricos em energia. Para o artrópode, por outro lado, a simbiose promove a utilização de uma variedade de recursos alimentares (NARDI; MACKIE; DAWSON, 2002). Um dos exemplos clássicos é a importância dos endossimbiontes na nutrição dos cupins, pois, embora se saiba que os térmitas podem digerir lignocelulose sem a assistência dos simbiontes do trato digestório a fixação de nitrogênio ou conversão de dióxido de carbono a acetato seria difícil pois, é uma atividade anaeróbica feita pelos simbiontes (BIGNELL, 2000). Na literatura, tem-se vários exemplos de aminoácidos essenciais produzidos por simbiontes e secreção de enzimas capazes de digerir recursos alimentares dos insetos (WICKER, 1983; BORKOTT; INSAM, 1990; DOUGLAS; PROSSER, 1992; DOUGLAS, 2009).

Tem sido reportadas evidências que as contribuições dos simbiontes não estão limitadas à nutrição (DILLON; DILLON, 2004), há estudos que mostram a importância dos microrganismos simbiontes na interação inseto-planta e também como os mesmos influenciam a comunidade ecológica mudando a maneira com que a planta interage com o ambiente (FRAGO; DICKE; GODFRAY, 2012). Existem casos onde os simbiontes são essenciais para a defesa indireta do inseto hospedeiro, protegendo-o do ataque de inimigos naturais (FERRARI et al., 2004; KELLNER; DETTNER, 1996; OLIVER et al., 2003; VORBURGER; GEHRER; RODRIGUEZ, 2010, BROWNLIE; JOHNSON, 2009), e também agem na detoxificação de compostos produzidos pela planta (DOWD, 1991). Simbiontes de

artrópodes agem na produção de semioquímicos importantes nas interações entre insetos, sendo estes, em alguns casos, usados como feromônios de agregação (BRAND et al., 1975), tem também função na reprodução e desenvolvimento (CASPARI; WATSON 1959; GHERNA et al., 1991).

O inseto-alvo desse estudo foi (*Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), a broca-da-cana-de-açúcar. Estudos sobre microrganismos endossimbiontes da broca-da-cana ainda são poucos, conhecendo até o momento a presença de fungos filamentosos, leveduras e bactérias que podem ter grande importância. Ausique (2009) identificou a comunidade de bactérias da microbiota do mesêntero de lagartas de *D. saccharalis* e alguns dos isolados identificados foram capazes de degradar fontes de carbono como celulose, hemicelulose e lignina. O estudo de Milano (2012), mostrou que associado ao trato gastrointestinal de *D. saccharalis*, há um reservatório importante de microrganismos que produzem enzimas capazes de degradar compostos de celulose e xilano. Dantur e colaboradores (2015) identificaram bactérias, isoladas do intestino da broca-da-cana capazes de degradar celulose que podem auxiliar no processo de produção de etanol de segunda geração.

Os três estudos acima citados, trabalharam com a microbiota do trato digestório. Não se tem relatos de estudo com a microbiota da secreção oral. A identificação dos microrganismos presentes na secreção oral torna-se necessária, pois não se tem estudos sobre a função da microbiota da secreção oral na interação do inseto com a planta da cana-de-açúcar, tampouco sobre a função da microbiota na interação com os fitopatógenos que infectam o colmo da planta.

A broca-da-cana completa quase todo o ciclo de vida nas galerias que abre dentro do colmo da cana-de-açúcar. Pela abertura da galeria, há a colonização de fitopatógenos como *Colletotrichum falcatum* (Went, 1893) e *Fusarium verticillioides* (Nirenberg, 1976). Essa associação entre lagarta e fungos causadores de podridão já é conhecida há muito tempo, nas regiões onde existe cana-de-açúcar, (PANNUTI et al, 2013). No Brasil a associação entre a broca-da-cana e os fungos causadores de podridão é comumente chamada de complexo broca-podridão.

Nesse estudo, fez-se um levantamento da comunidade de leveduras e bactérias cultiváveis presentes na secreção oral de *D. saccharalis* coletada de lavouras de cana-de-açúcar. Através de co-cultivo com os fitopatógenos *F. verticillioides* e *C. falcatum*, verificou-se que alguns isolados não mostram retardo

algum do crescimento dos fitopatógenos. Existem alguns isolados que tem interação com o crescimento, destes, tem-se os dois extremos, ou tem fraca reação de inibição de crescimento de pelo menos um fitopatógeno, e outros tem forte reação de inibição.

Com base nesses resultados, pode-se investigar a identidade dos microrganismos, testar outras funções como digestão de celulose, quitina, produção de voláteis, identificação de compostos secretados no meio de cultura, testar com outros fitopatógenos, verificar se os microrganismos da secreção oral estão presentes também no trato digestivo.

A dificuldade central nos estudos de ecologia de microrganismos no trato digestivo é associar a diversidade microbiana com suas funções (NANNIPIERI et al., 2003). Os isolados de leveduras e bactérias selecionados nesse estudo podem servir como agentes de controle biológico desses fitopatógenos e seu potencial biotecnológico pode ser explorado. A utilização de microrganismos endossimbiontes como ferramenta de biocontrole de fitopatógenos tem se mostrado cada vez mais importante devido à necessidade de buscar alternativas a utilização de agroquímicos e seu uso indiscriminado (SHIOMI et al., 2008). O estudo das comunidades de microrganismos presentes em insetos é importante para o entendimento da capacidade e plasticidade dos microrganismos de se adaptar e explorar o trato digestivo dos insetos, e de como as comunidades podem interferir na biologia dos hospedeiros (CAMPBELL, 1990).

2.1. Objetivo Geral

Investigar o potencial de antagonismo de leveduras e bactérias simbiotes presentes na secreção oral de *D. saccharalis* contra *C. falcatum* e *F. verticillioides*.

2.2. Objetivos específicos

1 – Isolar bactérias e leveduras da secreção oral de *D. saccharalis* coletadas em campo;

2 - Escolher o meio de cultura mais adequado para co-cultivo de quatro microrganismos com necessidades nutricionais diferentes;

3 – Fazer um *screening* inicial de todos os isolados de leveduras e bactérias, e selecionar aqueles isolados com potencial de inibição do crescimento de *C. falcatum* e *F. verticillioides*;

4 – Medir, ao longo de 4 avaliações no tempo, o crescimento dos fitopatógenos *C. falcatum* e *F. verticillioides*, na presença de isolados de leveduras ou bactérias da secreção oral de *D. saccharalis*, em comparação com o crescimento de *C. falcatum* e *F. verticillioides* cultivado sem a presença de outro microrganismo.

5 – Identificação, através de técnicas moleculares, de alguns isolados de microrganismos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Simbiontes de artrópodes

Simbiose trata-se de uma associação íntima entre organismos de diferentes espécies. O termo é algumas vezes restrito a casos onde as duas partes se beneficiam (RIO et al., 2003; FRAGO, DICKE; GODFRAY, 2012). Microrganismos simbiotes de artrópodes (bactérias, algas, fungos e protozoa) têm sido encontrados em associação com vários tecidos diferentes. Endossimbiontes residem no interior do corpo ou das células do seu hospedeiro, dentro de órgãos especializados e também no espaço intercelular (WHITFIELD, 1979) e um ectossimbionte reside fora, na superfície do seu hospedeiro ou está fisicamente separado dele.

A maioria dos insetos está envolvida em algum tipo de simbiose com microrganismos (RIO et al., 2003). Os simbiotes são capazes de modificar a biologia de seus hospedeiros (NOGUEIRA, 2012) podendo estar envolvidos na alimentação dos insetos, facilitando sua digestão como complemento nutricional, auxiliando na desintoxicação do material vegetal e até mesmo na defesa do inseto

contra invasões de patógenos e ataque de parasitóides (HIROSE; PANIZZI, 2009) e em alguns casos podem trazer benefícios na competição intraespecífica (BROWNLIE et al., 2007).

Os microrganismos exercem uma função fundamental na digestão dos insetos podendo contribuir na transformação de macromoléculas em nutrientes essenciais (CAMPBELL, 1990). Alguns insetos como cupins e baratas que se alimentam de madeira, larvas de besouros, entre outros, podem usar substratos ricos em lignocelulose como sua principal fonte de alimento e são altamente eficientes na degradação de celulose à glicose como fonte de energia (SUN; SCHARF, 2010). Os insetos sozinhos não secretam todas as enzimas digestivas para hidrolisar as β ligações dos polímeros. Pelo contrário, grande parte da hidrólise desses polissacarídeos é realizada por enzimas produzidas pelos simbioss microbianos presentes no trato digestivo (CAZEMIER et al., 1997; BRUNE; FRIEDRICH, 2000; SUH et al., 2001; WENZEL et al., 2002). Já foi mostrado que os microrganismos do intestino de escarabeídeo *Holotrichia parallela* (HUANG et al., 2012), cupins (ZHOU et al., 2007), besouros que degradam madeira como *Anoplophora glabripennis* (GEIB et al., 2010) e *Saperda vestita* (DELALIBERA et al., 2005), larvas de coleópteros como *Tenebrio molitor* (FERREIRA et al., 2001) são considerados essenciais para a digestão de celulose.

Mais recentemente estudos mostraram que, comunidades microbianas de simbioss de insetos herbívoros tem importância na ecologia das interações entre planta-inseto (FRAGO, DICKE; GODFRAY; 2012). Os herbívoros são dependentes de seus microbiomas gastrointestinais para a detoxificação de compostos de plantas (DOWN, 1992) e outros compostos antinutricionais (MORRISON et al., 2009). Há evidências de que simbioss de insetos herbívoros alteram a fisiologia das plantas. Kaiser et al. (2010) mostraram que a mariposa *Phyllonorycter blancardella* usa as bactérias endossimbioss para se alimentar de folhas em senescência, induzindo a fotossíntese em alguns regiões da folha. Existem também relatos de interações entre fungos e bactérias simbioss de insetos. Por exemplo: no besouro que se alimenta de madeira *Dendroctonus frontalis* o fungo *Entomocorticium* sp. digere madeira para a larva em desenvolvimento e outro fungo (*Ophiostoma minus*) protege o inseto das defesas da planta (KLEPZIG; SIX, 2004), mas, após um certo período do desenvolvimento, *O. minus* passa a não ser mais benéfico para o inseto, então,

outro simbiote, uma bactéria (*Streptomyces* sp.) produz um antibiótico que inibe o crescimento de *O. minus* (SCOTT et al., 2008; AANEN et al., 2009).

3.2. Simbiontes de *D. saccharalis*

No Brasil, a principal praga da cultura da cana-de-açúcar é a *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). Essa lagarta tem ampla distribuição nos canaviais do Brasil e em outras localidades no continente americano (VENDRAMIM et al., 1991; DINARDO-MIRANDA, 2008; DINARDO-MIRANDA et al., 2011). O ataque da lagarta ocorre durante todo o desenvolvimento da planta de cana-de-açúcar, sendo mais significativo quando os entrenós já estão formados (MACEDO; BOTELHO, 1988).

As perdas causadas pela lagarta podem alcançar cerca de 35 Kg de açúcar por hectare e aproximadamente 30 litros de álcool por hectare com apenas 1% dos colmos afetados pelo ataque da broca (SANDOVAL; SENÔ, 2010). A colheita mecanizada, obrigatória desde 2008, colaborou para o aumento dos danos causados pela lagarta (SOUZA et al., 2008). A despalha da cana através da queima, contribuía com a destruição de ovos, pupas e insetos adultos, sem a realização da queima pragas como a broca passaram a ter maior ocorrência nesta cultura, tornando-se um dos principais desafios técnicos a ser equacionado em áreas de cana crua (MACEDO et al., 2002, SOUZA et al., 2008).

Inseticidas de contato não são eficazes pois a janela de ação do inseticida é somente entre o primeiro instar até a lagarta brocar no colmo (CIRELLI, PENTEADO-DIAS, 2003). Variedades resistentes de cana-de-açúcar à broca ainda não estão disponíveis, devido à dificuldade de combinar caracteres genéticos que não favorecem a infestação da cana-de-açúcar pela lagarta com caracteres agrônômicos favoráveis (DEMETRIO; ZONETTI; MUNHOZ, 2008). Uma das cultivares de cana-de-açúcar mais plantadas no estado de São Paulo com 5.312 ha (CENSO VARIETAL, 2012), SP80-1842, devido sua alta produtividade (FARONI et al., 2007) é suscetível ao ataque da broca da cana-de-açúcar (DINARDO-MIRANDA, 2003; CAMILLO, 2010). Atualmente, a forma mais eficiente de controle é o controle biológico com o parasitóide de lagarta *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (GALLO et al, 1988), combinada com o uso do parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* (Zucchi, 1988). Juntos, podem chegar a uma eficiência de controle de aproximadamente 71% (ARRUDA et al, 2014).

Os estudos sobre microrganismos endossimbiontes da broca-da-cana ainda são incipientes, conhecendo até o momento a presença de fungos filamentosos, leveduras e bactérias (AUSIQUE 2009; MILANO, 2012;) provenientes do intestino e que podem ter grande importância. Por exemplo, Milano (2012), mostrou que associado ao trato gastrointestinal de *Diatraea saccharalis*, *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Cerambycidae), *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae) e *Telchin licus licus* (Drury, 1773) (Lepdoptera: Castniidae) apresenta um reservatório importante de microrganismos com capacidade de degradação enzimática para compostos de celulose e xilano tais como a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* e as leveduras *Meyerozyma guilliermondii*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida pseudointermedia*, *C. parapsilosis*, *C. solani* e *Aureobasidium pullulans* bem como fungos filamentosos dos gêneros *Pyrenophora*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Dantur e colaboradores (2015), em busca de bactérias com atividades celulolíticas no intestino de *D. saccharalis* identificou as bactérias *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Bacillus pumilus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Microbacterium hominis*, *Microbacterium schleiferi*, que podem ter potencial industrial.

Ausique (2009) identificou a comunidade de bactérias da microbiota do mesêntero de lagartas de *D. saccharalis*, coletadas em diversas lavouras de cana-de-açúcar. Seus resultados indicaram que, as comunidades são compostas por membros dos filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria, sendo Proteobacteria o filo predominante. Os microrganismos podem estar associados a degradação de compostos de interesse industrial, como demonstrado nos estudos de Ausique (2009) onde os microrganismos foram capazes de degradar fontes de carbono como celulose, hemicelulose e lignina. Milano (2012), verificou que há microrganismos capazes de degradar lignina e celulose, e também como demonstrado por Dantur e colaboradores (2015), que identificou bactérias capazes de degradar celulose que podem auxiliar no processo de produção de bioetanol e etanol de segunda geração, por exemplo.

3.3. Associação da broca-da-cana com fungos causadores de podridão

Os danos provocados pela alimentação da lagarta podem ser diretos, por meio de abertura de galerias no interior do colmo da planta, reduzindo o fluxo de

seiva, e tornando-a mais suscetível ao tombamento pela ação do vento e chuvas (GALLO et al., 2002) e indiretamente, beneficiando a entrada de fungos nas plantas, causando a podridão vermelha do colmo e ou a podridão por *Fusarium*, levando assim a degradação da sacarose, contaminação o caldo e redução da produção de álcool (BOIÇA JR; LARA; BELLODI, 1997).

A associação entre a broca e os fitopatógenos causadores de podridões, é popularmente chamado de “complexo broca-podridão”. No Brasil, Pannuti e colaboradores (2013) verificaram uma correlação positiva entre o número de orifícios feitos pela broca da cana-de-açúcar no colmo com o número de internódios afetados pela podridão-vermelha. Os autores constataram também que o número de internódios com sintomas de podridão-vermelha correlacionou-se negativamente à porcentagem de açúcar no colmo. Turco, Pires, Rossato (2013) afirmam que o complexo ‘broca-podridão’ tem influência negativa significativa na brotação de gemas de cana-de-açúcar.

A associação entre a broca e os fungos causadores da podridão não ocorre somente nos canaviais brasileiros. No Sul dos Estados Unidos, por exemplo, Ogunwolu e colaboradores (1991) comprovaram a relação entre o dano mecânico simulado na planta de cana-de-açúcar e a presença do fungo *C. falcatum*, com aproximadamente 92% dos internódios infectados, mostraram o oportunismo deste fungo. No sul da África, o inseto brocador conhecido como *Eldana saccharina* (Walker, 1865) (Lepidoptera: Pyralidae) (GOVENDER; McFARLANE; RUTHERFORD, 2010; McFARLANE, GOVENDER; RUTHERFORD, 2009) e no México há relatos de *Diatraea* sp. e *Chilo loftini* (Dyar, 1917) (Lepidoptera: Crambidae), que também abrem galerias nos colmos da cana-de-açúcar facilitando a entrada de fungos fitopatogênicos (FLANDERS, 1930). Essa associação também ocorre em outras culturas como por exemplo, Na Europa também há uma relação estabelecida entre a injúria causada por um inseto broca *Ostrinia nubilalis* (Hubner, 1796) (Lepidoptera: Crambidae) e a entrada do fitopatógenos *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils. que causa podridão do colmo do milho (VENARD; VAILLANCOURT, 2007).

Entre os fungos causadores de podridão, destacam-se o *C. falcatum* e *F. verticillioides*. A podridão vermelha causada pelo *C. falcatum* pode ocorrer em diferentes partes da planta, mas geralmente instala-se no caule e nas sementes (SAKSENA, 2013), entretanto, é possível visualizar sintomas externos nas folhas e

no caule que apresentam uma coloração púrpura-avermelhado (KALAIMANI, 2012). Os sintomas da doença podem variar dependendo da suscetibilidade da cultivar de cana-de-açúcar, da virulência do patógeno e do ambiente (SAKSENA, 2013). Durante a germinação da cana-de-açúcar, a associação com esses fungos provoca o apodrecimento completo do tolete acarretando a morte de gemas e diminuição na germinação (SANTANA, 2010). Nos colmos, o patógeno provoca internamente uma podridão vermelha (RAGO; TOKESHI, 2005).

O fungo *F. verticillioides* está associado às doenças murcha por *Fusarium* e ao Pokkah Boeng e em casos agudos, a doença causa distorção do colmo com lesões externas e internas e apodrecimento da parte apical do colmo, podendo afetar a inflorescência da planta, as sementes e gemas (GATCH; MUNKVOLD, 2002; SANTOS, 2010; VISHWAKARMA et al., 2013). O patógeno eventualmente está presente na planta de maneira endofítica, dificultando a avaliação dos prejuízos causados por essa doença e qualquer estresse como dano mecânico e estresse hídrico, sofrido pela planta faz com que a infecção se manifeste (TOKESHI, 1997).

Diferentes isolados de *Fusarium* foram identificados em cana-de-açúcar, alguns causam a podridão do colmo enquanto outros são endofíticos, e não causam sintomas da doença (GOVENDER et al., 2010). McFarlane e colaboradores (2009) mostraram que existem isolados de *Fusarium* que são antagonistas e outros que são benéficos para o crescimento e desenvolvimento da broca do colmo da África, *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). Inclusive há trabalhos que mostram o potencial de uso de espécies de *Fusarium* para o controle biológico de *E. saccharina* (MAHLANZA et al., 2015). A podridão vermelha da cana-de-açúcar é uma doença muito antiga e devastadora, causada principalmente por isolados de *Colletotrichum falcatum*. *Colletotrichum* produz toxinas (SAIKIA et al., 2004) provocando uma resposta de defesa na cana-de-açúcar (PRATHIMA et al., 2013) que é dependente da variedade de cana (SUNDAR et al., 1999).

3.4 Endossimbiontes usados no controle biológico

Como alternativa aos métodos tradicionais no combate de pragas e agentes causadores de doenças o controle biológico tem sido uma alternativa para uma agricultura econômica, social e ecologicamente viáveis (SILVA; BRITO, 2015).

Parra e colaboradores (2002) definiram controle biológico como um fenômeno natural que consiste na regulação do número de plantas e animais por inimigos

naturais, os quais se constituem nos agentes de mortalidade biótica. De acordo com Berti Filho (1990), é certo que todas as espécies vivas são acometidas por inimigos naturais que se alimentam delas e, geralmente, regulam sua densidade populacional.

Diferentes grupos de microrganismos têm sido selecionados como fortes agentes de controle biológico, incluindo fungos, bactérias e actinomicetos (MELO, 2016). No entanto ainda não há estudos sobre endossimbiontes de *D. saccharalis* que possam servir como agentes de controle biológico dos fungos oportunistas *C. falcatum* e *F. verticillioides*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de lagartas de *D. saccharalis* em lavouras de cana-de-açúcar

Foram realizadas duas coletas, em fevereiro e março de 2015, em Itirapina/SP, variedade SP-813250, e em Limeira/SP, variedade RB-835054. Nas duas áreas a cana-de-açúcar estava no estágio de cana planta, com idade entre 4 e 5 meses. Foram selecionadas para a amostragem áreas onde não foram aplicados produtos químicos para controle de pragas, o que poderia influenciar o conteúdo e as características da microbiota no trato digestivo das lagartas. Em cada talhão, buscou-se por plantas de cana com sinais de ataque da broca. A cana foi cortada rente ao solo com auxílio de um facão. O colmo foi aberto longitudinalmente e se a lagarta apresentava-se nos instares finais de desenvolvimento, foram mantidas junto ao colmo e deixadas em uma caixa de isopor.

4.2. Coleta da secreção oral e plaqueamento em meio seletivo

Após transporte em caixa de isopor do campo ao laboratório, em câmara de fluxo laminar, de maneira asséptica, as lagartas foram separadas dos toletes e colocadas em placas entomológicas. Foi medida a cápsula cefálica para determinação do ínstar, de modo que somente foram selecionadas lagartas do 4º e 5º instares para o isolamento de microrganismos, totalizando 15 lagartas.

Com auxílio de micropipetas, de cada uma das lagartas, foram retirados aproximadamente 5 µL da secreção oral e transferido para um microtubo de centrifuga de 1,5mL e mantido no gelo. Em cada microtubo, foi adicionado 95 µl de solução de Cloreto de Sódio a 150 mM e agitado em vortex.

Para isolamento das bactérias cultiváveis, 50 µL da suspensão foram transferidos para meio semi-sólido N.A. (Nutrient Agar – Difco® composto de extrato de bife 3g/L, peptona 5g/L, ágar 15g/L;), e incubadas a 28°C em câmara climatizada tipo B.O.D. (*Biological Oxygen Demand*) por 1 a 7 dias, dependendo da taxa de crescimento dos microrganismos (MILANO, 2012).

Para isolamento das leveduras cultiváveis, 50 µL da suspensão foram plaqueados por superfície em meio semi-sólido DRBC (marca Difco®) composto de Dicloran, Rosa de Bengala e Cloranfenicol a 0,05g/L e incubados a 28°C em B.O.D. por 3 a 7 dias, dependendo da taxa de crescimento dos microrganismos (MILANO, 2012). Após o período de incubação, as placas de meio NA e DRBC provenientes da mesma lagarta foram agrupadas e os conjuntos que tinham mais de 50 colônias por placa e maior variabilidade de formas e coloração foram separadas.. Cada colônia foi então tocada com a alça de platina, transferida e agitada em um tubo com 50 µl de solução de 150 mM de cloreto de sódio, essa suspensão foi então homogeneizada e transferida para uma placa individual, sob as mesmas condições de temperatura.

4.3. Seleção do meio de cultura para co-cultivo de isolados da secreção oral e fitopatógenos *F. verticillioides* e *C. falcatum*

Em um primeiro momento, foi selecionado o meio de cultura mais apropriado para o co-cultivo de leveduras e bactérias e fungos filamentosos. O meio de cultura ideal seria aquele que não beneficiasse ou diminuísse o crescimento, tanto do fitopatógenos quanto dos microrganismos obtidos da secreção oral. Foram testados quatro meios de cultura.

1 - meio de cultura BDA (marca Difco®), composto de batata 200g/L; dextrose 20g/L; ágar 18g/L.

2 - meio de cultura YEPD, composto de dextrose 20g/L; peptona 20g/L; extrato de levedura 10g/L, ágar 15g/L),

3 - meio de cultura C.C.S. (caldo de cana-de-açúcar suplementado), preparado a partir de caldo de cana-de-açúcar clarificado (2 claras de ovo batidas em neve/L, fervura por 30 min, resfriamento e filtração em algodão), 5,0 ±0,1°brix, extrato de levedura (10g/L), peptona (10g/L), ágar (15g/L), pH 6,2±0,2 (ERNANDES; CRUZ, 2010).

4 - meio de cultura N.A. Nutrient Agar (marca Difco®), composto de extrato de bife 3g/L, peptona 5g/L, ágar 15g/L.

Em cada placa de Petri (90 x 15 mm sem divisão), contendo meio de cultura a ser testado, foi inoculado em disco de micélio com 0,7 cm de diâmetro de cada isolado de levedura ou bactéria. Na extremidade oposta, foi inoculado um disco (0,7 cm) de um dos fitopatógenos (*F. verticillioides* ou *C. falcatum*). Os isolados de *F. verticillioides* e *C. falcatum* utilizados nos experimentos foram obtidos da Coleção de Microrganismos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ – USP e inicialmente, foram isolados de cana-de-açúcar. Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a 28°C por 7 a 15 dias. Foram utilizados 3 isolados de bactéria e 3 isolados de levedura, escolhidos aleatoriamente, provenientes de lagarta coletada na variedade RB-835054.

4.4. Screening inicial de isolados de bactérias e leveduras, quanto à capacidade de inibição ao crescimento de fitopatógenos

O objetivo destes experimentos foi categorizar 82 isolados de bactérias e 87 isolados de leveduras, quanto à capacidade de inibição do crescimento dos fitopatógenos *C. falcatum* e *F. verticillioides*. Isso foi feito para selecionar aqueles isolados com interação negativa ao crescimento dos fitopatógenos, para em um segundo momento, avaliar a inibição do crescimento dos fitopatógenos através de medições do raio do fitopatógeno na presença do isolado da secreção oral.

A avaliação categórica para os tipos de interações dos co-cultivos foi utilizada para selecionar aqueles isolados (de bactéria e levedura) que tinham alguma interação negativa sobre o crescimento dos fitopatógenos. A escala descrita por Bell; Wells e Markham (1982) foi utilizada com algumas modificações (Tabela 1) e ilustrado na Figura 1.

Tabela 1 – Avaliação categórica, adaptada de Bell; Wells e Markham (1982) usada no *screening* inicial dos isolados de bactéria e levedura da secreção oral de *D. saccharalis*.

| Categoria | Descrição |
|-----------|--|
| 1 | Fitopatógeno cresce por cima do isolado (levedura ou bactéria) da secreção oral; |
| 2 | Fitopatógeno tem crescimento reduzido pelo isolado (levedura ou bactéria) da secreção oral, mas ao fim do período de incubação, o fitopatógeno cresce levemente por cima do isolado; |
| 3 | Fitopatógeno cresce até próximo da colônia do isolado (levedura ou bactéria) da secreção oral, e não cresce por cima; |
| 4 | Fitopatógeno tem crescimento reduzido nas proximidades da colônia do isolado da secreção oral com formação do halo de inibição, que se mantém por todo o período de incubação. |

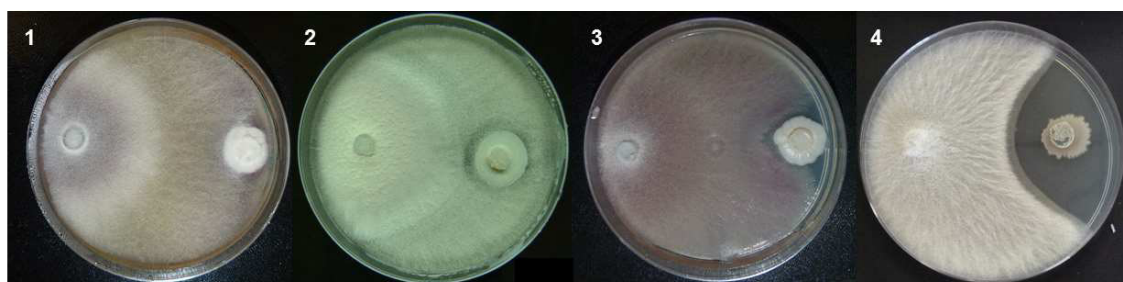


Figura 1 - Escala de interação em co-cultivo, adaptada de Bell; Wells e Markham (1982). Categoria 1: fitopatógeno cresce por cima do microrganismo da secreção oral, nessa foto ilustrando a interação entre *F. verticillioides* e isolado de levedura 3.1; Categoria 2: fitopatógeno tem crescimento reduzido pelo isolado (levedura ou bactéria) da secreção oral, mas ao fim do período de incubação, o fitopatógeno cresce levemente por cima do isolado, nessa foto ilustrando a interação entre *C. falcatum* e isolado de levedura 1.2; Categoria 3: fitopatógeno cresce até próximo da colônia do microrganismo da secreção oral, e não cresce por cima, nessa foto mostrando a interação entre *F. verticillioides* e isolado de levedura 4.5; Categoria 4: fitopatógeno tem crescimento reduzido nas proximidades da colônia do isolado da secreção oral com formação do halo de inibição, que se mantém por todo o período

de incubação, nessa foto mostrando a interação entre *C. falcatum* e isolado de bactéria 10.2.

Para essas avaliações, o meio BDA (Difco®) foi usado. Foram inoculados em extremidades opostas, um isolado de bactéria ou levedura da secreção oral e os fungos fitopatógenos *F. verticillioides* e *C. falcatum*, como descrito no item 4.3. Foram feitas quatro repetições para cada um dos isolados versus fitopatógeno.

É importante ressaltar que co-cultivos usando isolados de bactéria foram feitos com meio BDA sem suplementação de antibióticos, já os co-cultivos usando isolados de leveduras, o meio BDA Difco® foi suplementado com 0,05 g/L de antibiótico (Pentabiótico veterinário reforçado, Fort Dodge R Saúde Animal LDTA), com o intuito de evitar crescimento bacteriano.

Devido ao ritmo de crescimento dos microrganismos serem distintos, nos experimentos feitos com bactérias, os fungos fitopatogênicos foram colocados para crescer primeiro na placa de Petri com meio de cultura e somente após cinco dias as bactérias foram colocadas, a partir daí as placas foram incubadas por aproximadamente quinze dias. Já os experimentos feitos com levedura e *F. verticillioides* foi feito o contrário, o fitopatógeno foi colocado após cinco dias de crescimento da levedura, e posteriormente foram incubadas por aproximadamente quinze dias. Nos experimentos feitos com levedura e *C. falcatum*, os dois microrganismos foram inoculados no mesmo dia, pois ambos crescem na mesma velocidade. A avaliação foi realizada quando os controles (somente com o fitopatógenos) preencheram a placa toda.

A quantidade de isolados após os testes iniciais está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Número de total de isolados e número de isolados selecionados após categorização quanto à influência no crescimento de *F. verticillioides* e *C. falcatum*.

| Lagarta/ Variedade | Número total de isolados | | Número de isolados selecionados | |
|-----------------------|--------------------------|-----------|---------------------------------|-----------|
| | Bactérias | Leveduras | Bactérias | Leveduras |
| 1 / RB-835054 | 20 | 20 | 5 | 16 |
| 2 / SP-813250 | 20 | 19 | 5 | 2 |
| 3 / RB-835054 | 20 | 18 | 10 | 13 |
| 4 / SP-813250 | 5 | 15 | 1 | 5 |
| 5 / SP-813250 | 17 | 15 | 3 | 4 |

4.5. Avaliação da porcentagem de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos

Após avaliar a interação entre isolados da secreção oral e fitopatógenos, de acordo com as categorias da escala de Bell; Wells e Markham (1982), foram selecionados para medição da inibição do crescimento somente aqueles isolados que apresentaram valor igual ou superior à categoria 2. O co-cultivo foi feito como descrito anteriormente. Placas contendo somente o fitopatógeno foram usadas como controles. As placas foram incubadas a 28°C e a porcentagem de inibição do crescimento dos fitopatógenos foi avaliada em 4 datas após a inoculação, de acordo com o crescimento dos fitopatógenos e isolados de levedura e bactéria. O experimento foi considerado concluído quando o crescimento do fitopatógeno tocou a borda oposta à inoculação.

A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a fórmula de Ahmed et al. (1999).

$$I = 100 - (100 R_2/R_1)$$

Onde I é a inibição do crescimento vegetativo do fitopatógeno;

R_1 é a distância (em mm) da colônia controle do fitopatógeno, onde o fitopatógeno cresceu sem a presença do isolado de levedura ou bactéria;

R_2 é a distância (em mm) do desenvolvimento do micélio do fitopatógeno na presença de isolados de levedura ou bactéria.

A medição do crescimento do fitopatógenos na placa foi feito de acordo com a Figura 2.

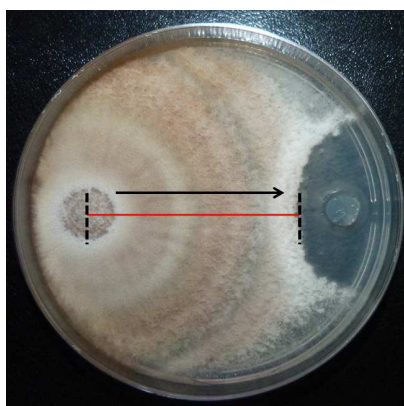


Figura 2 - Exemplo de medição de crescimento do fitopatógenos para determinação de porcentagem de inibição.

Os dados gerados nesses experimentos foram submetidos à análise estatística, feita com o software R (versão 3.02). A análise de variância com parcelas

subdivididas no tempo e, dado a interação significativa entre isolados na inibição ao crescimento dos fungos, foi avaliada a inibição dos isolados ao longo das quatro avaliações após inoculação. Dentro de cada avaliação no tempo, foi usado o teste de Scott-Knott ao nível de significância de 0,05 para separação de médias dos isolados.

4.6. Identificação de Bactérias, amplificação do DNA e sequenciamento

O DNA foi extraído segundo HEUER et al. (1997) e quantificado através de espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm e a integridade foi monitorada através de gel de agarose a 2%. Para a amplificação do DNA foram usados *primers* homólogos às regiões conservadas do gene que codifica o 16S rRNA (16S rDNA) para amplificação de regiões variáveis entre os *primers*, que distinguiam as sequências. As reações de amplificação do DNA foram realizadas com um volume final de 50 µl, contendo 10x Taq Buffer com (NH₄)₂SO₄ (Thermo Scientific), 0,2 mM de Mix de dNTP (10 mM), 2mM de MgCl₂ (25mM), Taq DNA polimerase (1.25U) e 1µM de cada iniciador F27 5'- AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG' e R1387 5'- CCGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG (HEUER et al., 1997) e 1 µl de DNA bacteriano (aproximadamente 3 ng). A amplificação foi feita em termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com programação de 36 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 55°C, extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 7 min a 72°C. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 uL, contendo tampão 1X (KCl 50mM, Tris-HCl 20 mM), 3,7 mM MgCl₂, 1mM de dNTP, 0,05U/uL Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,4 uM de cada primer (F27 e R1387) e, aproximadamente 3ng de cada DNA (HEUER et al., 1997).

O produto de PCR foi observado por eletroforese em gel de agarose 1,4% a 3 V/cm, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). O gel foi corado com Syber green e fotodocumentado em luz UV. Posteriormente, os produtos da PCR foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de acordo com instruções do fabricante e enviados para sequenciamento no Laboratório de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) da Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo.

Para a identificação das sequências, foi feita uma análise comparativa no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), por meio do Basic Local Alignment Search Tool (tBLASTx) (ALTSCHUL et al., 1997), que

procura na base de dados traduzida de sequências de RNA ribossômico 16S (Bacteria e Archaea) usando uma sequência de nucleotídeos traduzida. Essa metodologia usa o método heurístico para encontrar o melhor score de alinhamentos locais entre a sequência submetida de nucleotídeos e o banco de dados de proteínas. Dessa forma, para a identificação foram consideradas as sequências de linhagens bem caracterizadas que apresentaram os mais altos valores de identidade com as sequências submetidas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento de leveduras e bactérias provenientes da secreção oral de *D. saccharalis* coletada no campo

Foram coletadas (Figura 3) 19 lagartas na primeira coleta na variedade SP-813250 e 14 lagartas na segunda coleta, na variedade RB-835054. Após medição da cápsula cefálica em laboratório, somente foram selecionadas aquelas lagartas do 4º e 5º instar: 6 lagartas coletadas na variedade SP-813250 e 9 na RB-835054.

Três conjuntos de placas (meio NA e meio DRBC) provenientes de 3 lagartas coletadas na variedade SP-813250 foram selecionados, e 2 conjuntos de placas de lagartas coletadas na RB-835054. Posteriormente, colônias (Tabela 2) distintas e visualmente diferentes de cada placa foram escolhidas e transferidas para uma placa individual em meio semi-sólido NA (para bactérias) (Figura 4) e DRBC (para leveduras).

5.2. Escolha do meio de cultura mais apropriado para co-cultivo de *F. verticillioides* ou *C. falcatum* e isolados de levedura ou bactéria

Dos quatro meios testados o que visualmente atendeu melhor as necessidades das bactérias, leveduras e fitopatógenos, sem favorecer ou prejudicar o crescimento dos mesmos foi o meio BDA (Figura 5, primeira coluna), tanto para isolados de levedura co-cultivados com *F. verticillioides* (Figura 5 A) quanto com *C. falcatum* (Figura 5 E). O mesmo resultado se deu para bactérias (Figuras 5 I e 5 M). O meio BDA é o meio mais indicado para o cultivo dos fungos *F. verticillioides* e *C. falcatum* (SILVA et al., 2006), e onde, em comparação com os outros meios testados, os fungos se desenvolveram melhor, com a coloração e aspecto esperados.

O meio YEPD proporcionou um rápido crescimento dos fungos *F. verticillioides* e *C. falcatum*. Observa-se que, neste meio os fungos apresentam somente hifas, sem esporulação. Apesar de ser o meio indicado para o desenvolvimento de leveduras (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005; ANGELIS; VALSECHI, 2006), a comparação do crescimento dos dois organismos ficou prejudicada (Figura 5 B e 5 F). A maioria dos isolados de bactérias cresceu muito bem no meio YEPD (Figura 5 J e 5 N).

O meio de caldo de cana-de-açúcar (CCS) tem sido usado para produção de levanas em levedura (ERNANDES; CRUZ, 2010), e nas condições experimentais, foi o que visualmente menos favoreceu o crescimento, tanto da levedura quanto de *F. verticillioides* e *C. falcatum* (Figura 5 C e 5 G). Já a maioria dos isolados de bactéria cresceu vigorosamente nesse meio, e em alguns casos, ultrapassando a velocidade de crescimento de *F. verticillioides* e *C. falcatum* (Fig. 5 K e 5 O). Assim, o uso desse meio de cultivo, apesar de ser a alternativa mais abundante e econômica no estado de São Paulo, além de ser o substrato onde todos os microrganismos estudados aqui tem contato em condições naturais, foi descartado.

A quase totalidade dos isolados de levedura desse estudo não cresceram no meio NA (Figura 5 D e 5 H), inviabilizando a avaliação da interação com os fungos. Esse meio é o mais indicado para cultivo de bactérias, que, de uma maneira geral, precisam de poucos nutrientes para seu desenvolvimento (PEREIRA; MATOS; FORTES, 2003). E de fato, aqueles isolados de bactéria que apresentaram antagonismo a *F. verticillioides* e *C. falcatum* tiveram os melhores resultados de inibição do crescimento nesse meio (Figura 5 L e 5 P), inclusive, o halo de inibição perdurou por mais de dois meses depois do final do experimento (dados não mostrados). Nesse meio de cultivo, *F. verticillioides* e *C. falcatum* não tiveram impedimento ou favorecimento no crescimento, apresentando velocidade de crescimento comparável ao meio BDA.

Assim, entre todos os meios testados o meio BDA mostrou-se o mais satisfatório e foi o escolhido para o avaliar a interação entre isolados de levedura e bactéria e *F. verticillioides* e *C. falcatum* usando cultivo pareado.



Figura 3 - Coleta de lagartas de quarto e quinto ínstar de *D. saccharalis* no campo.



Figura 4 - Exemplo de placa em meio NA para seleção de bactérias da secreção oral de lagarta coletada em campo.

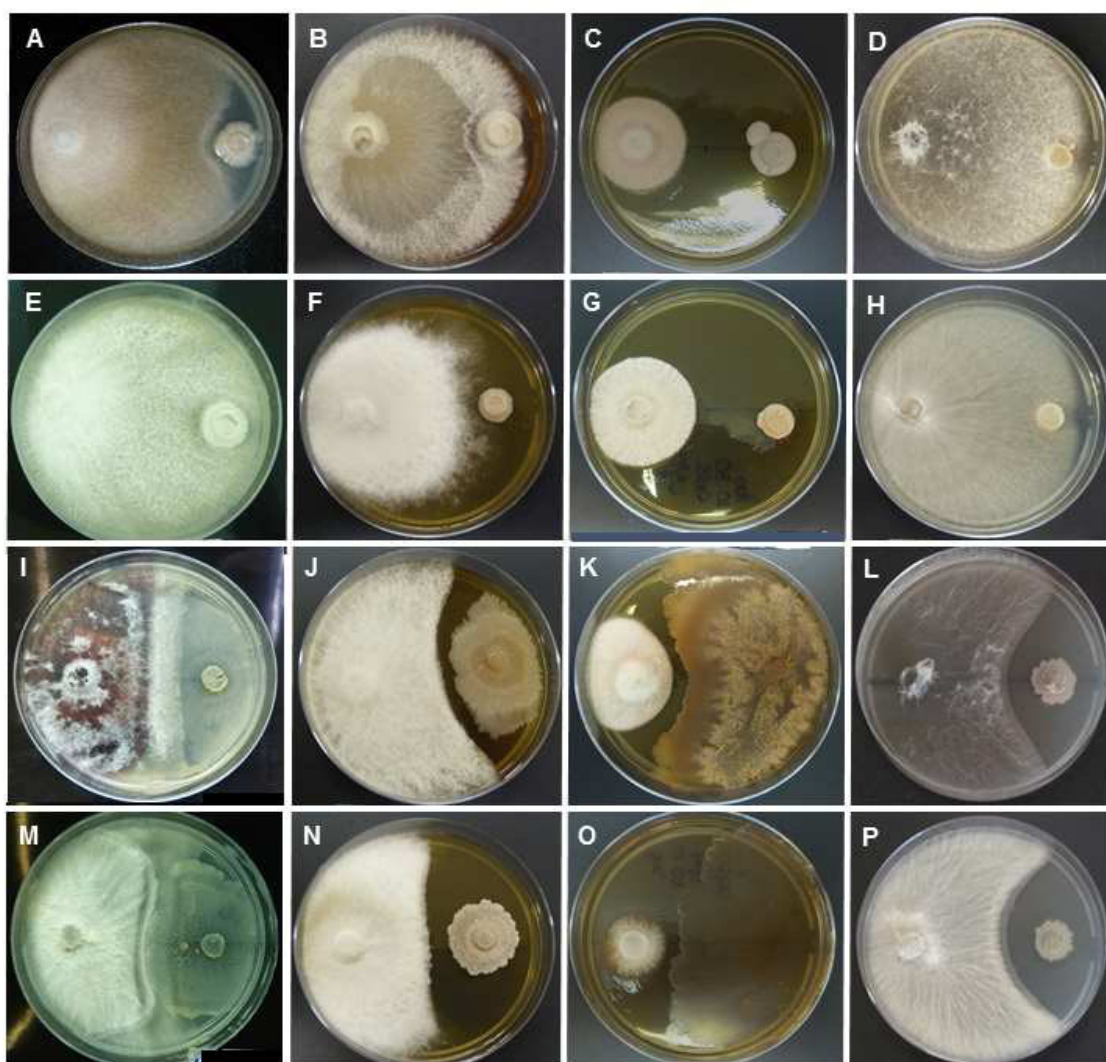


Figura 5 - Co-cultivo entre isolado 3.9 de levedura da secreção oral de *D. saccharalis* e *F. verticillioides* (fotos A a D) e *C. falcatum* (fotos E a H) e entre isolado 9.1 de bactéria e *F. verticillioides* (fotos I a L) e *C. falcatum* (fotos M a P) em relação aos meios de cultura utilizados. Os meios de cultivo utilizados foram BDA (A, E, I, M), YEPD (B, F, J, N), CCS (C, G, K, O) e NA (D, H, L, P) e as fotos foram retiradas, para todos os meios, aos 7 dias após inoculação.

5.3. Screening inicial de isolados de bactérias e leveduras, quanto à capacidade de inibição ao crescimento de fitopatógenos

O objetivo do *screening* inicial foi selecionar aqueles isolados com potencial de inibição do crescimento dos fungos *F. verticillioides* e *C. falcatum*, através de testes de cultivo pareado. Foram utilizados oitenta e dois isolados de bactérias e oitenta e sete isolados de leveduras com quatro repetições e em blocos inteiramente casualizados. O experimento foi repetido duas vezes no tempo.

5.3.1. Categorização de isolados de bactérias na interação com *F. verticillioides* e *C. falcatum*

Os resultados dos testes de interação entre as bactérias isoladas e o fitopatógeno *F. verticillioides* variaram de acordo com a lagarta de onde as colônias das bactérias foram isoladas (Fig. 6 A). Para a lagarta número 1, coletada na variedade de cana RB-835054, a categoria de interação predominante, para os isolados de bactérias, foi a “3”, com 42% dos 20 isolados analisados quando os fitopatógenos crescem até o limite da colônia do microrganismo (Figura 6). Para a lagarta 2 a categoria predominante foi a “1” para 55% dos isolados, quando o fitopatógeno cresce indiscriminadamente por cima do microrganismo. Para a lagarta 3 a categoria predominante obtida foi a “3” em 65% dos isolados. Para a lagarta 4 a categoria predominante foi a “1”, em 80% dos isolados analisados. Para a lagarta 5 a categoria predominante foi a “1”, com 76% dos isolados analisados.

Os resultados dos testes de interação entre as bactérias isoladas e o fitopatógeno *C. falcatum* variaram de acordo com a lagarta de onde as colônias das bactérias foram isoladas. Para a lagarta 1, a categoria de interação predominante, para os isolados de bactérias, foi a “1”, com 55% dos isolados (Fig. 6 B). Para a lagarta 2 a categoria predominante foi a “1” para 70% dos isolados. Para a lagarta 3 a categoria predominante obtida foi a “1” em 70% dos isolados. Para a lagarta 4 a categoria predominante foi a “1”, em 60% dos isolados. Para a lagarta enumerada 5 a categoria predominante foi a “2” em 47% dos isolados.

5.3.2. Categorização de isolados de leveduras na interação com *F. verticillioides* e *C. falcatum*

Os resultados dos testes de interação entre as leveduras isoladas e o fitopatógeno *F. verticillioides* variaram de acordo com a lagarta de onde as colônias das leveduras foram isoladas, no entanto houve uma categoria predominante.

Para a lagarta número 1, a categoria de interação predominante, para os isolados de levedura, foi a “2” (Fig. 6 C) com 67% dos isolados, o que significa que os microrganismos inicialmente podem ter alguma influência no desenvolvimento do fitopatógenos, mas ao fim do período de incubação o fitopatógeno se desenvolve por cima do microrganismo, no entanto ainda são necessários mais estudos para entender se realmente acontece uma ação minimamente antagônica ou se há algum outro tipo de interação, como por exemplo a competição por nutrientes. Para a lagarta enumerada 2 a categoria predominante foi a “2”, para 67% dos isolados. Para a lagarta enumerada 3 a categoria predominante obtida foi a “2”, em 67% dos isolados. Para a lagarta enumerada 4 a categoria predominante encontrada quando os isolados de leveduras foram utilizados a foi a “2”, em 80% dos isolados. Para a lagarta enumerada 5 a categoria predominante foi a “2”, em 93% dos 15 isolados analisados.

Os testes feitos com os isolados de leveduras com o fitopatógeno *C. falcatum*, a categoria 1 foi a predominante para todos os microrganismos testados. Para a lagarta 1, a categoria de interação predominante foi a “2” com 67% dos isolados o que significa que os microrganismos inicialmente podem ter alguma influência no desenvolvimento do fitopatógenos, mas ao fim do período de incubação o fitopatógeno se desenvolve por cima do microrganismo, no entanto ainda são necessários mais estudos para entender se realmente acontece uma ação minimamente antagônica ou se há algum tipo de outra interação, como por exemplo competição por nutrientes. Para a lagarta enumerada 2 a categoria predominante foi a “2”, para 67% dos isolados. Para a lagarta enumerada 3 a categoria predominante obtida foi a “2”, em 67% dos isolados. Para a lagarta enumerada 4 a categoria predominante encontrada quando os isolados de leveduras foram utilizados a foi a “2”, em 80% dos isolados. Para a lagarta enumerada 5 a categoria predominante foi a “2”, em 93% dos isolados. Após a categorização, foram selecionados 24 isolados de bactérias e 40 isolados de levedura.

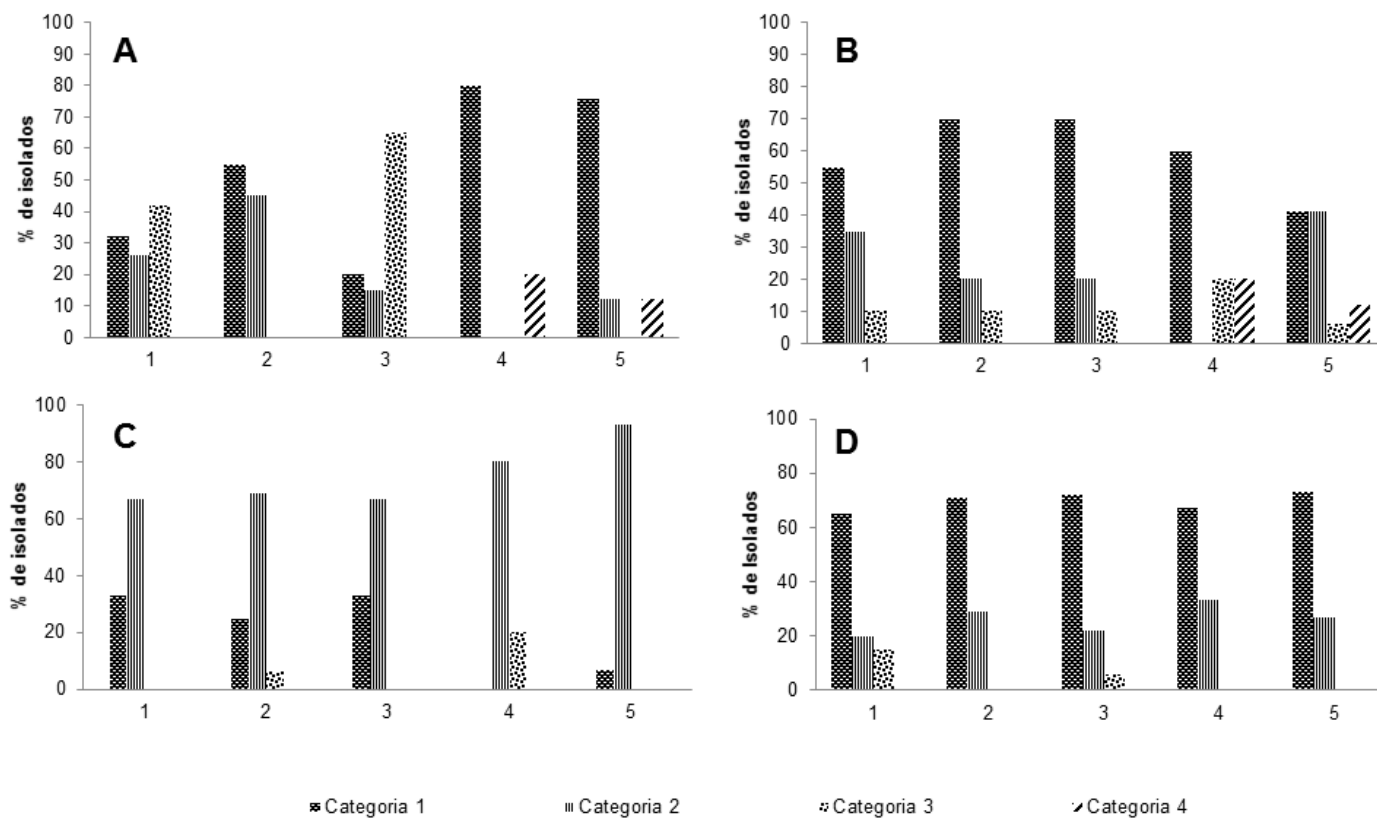


Figura 6. Porcentagem de classe de interação (adaptada de Bell; Wells e Markham, 1982), separadas por lagarta (eixo horizontal). Interação entre bactérias e *F. verticillioides* (A) e *C. falcatum* (B), e entre leveduras e *F. verticillioides* (C) e *C. falcatum* (D) em função do meio de cultura utilizado (BDA).

5.4. Porcentagem de inibição do crescimento de *F. verticillioides* e *C. falcatum*, exercida pelos isolados da secreção oral de *D. saccharalis*

Os testes de inibição de crescimento, que foram submetidos a análise estatística foram essenciais para complementar os testes de cultivo pareado com avaliação visual, através deles pode-se comparar estatisticamente os diferentes isolados testados.

Nesses testes, o raio de crescimento de *F. verticillioides* e *C. falcatum* em direção à colônia de bactéria ou levedura, foi medido em quatro avaliações no tempo, e comparado com o crescimento do fungo sem a presença da colônia do microrganismo. Na Figura 7, algumas interações foram plotadas nos gráficos, por exemplo, em A, o crescimento de *F. verticillioides* na presença dos isolados 7.2, 9.1 e 10.2 de bactérias foi comparado ao crescimento de *F. verticillioides* na placa controle. Os três isolados de bactéria tem comportamento similar, e exercem antagonismo ao fungo nas três avaliações finais após a inoculação. Na Figura 7 B foi plotado o crescimento de *C. falcatum* na presença dos mesmos isolados de bactéria. Pode-se notar visivelmente, que a inibição foi maior ao crescimento de *F. verticillioides* do que de *C. falcatum*. Quando a inibição exercida por isolados de levedura é comparada com bactéria, os últimos sempre exercem maior inibição do que isolados de levedura. Nas leveduras também se percebe que a inibição ao crescimento é maior em *F. verticillioides* do que em *C. falcatum*.

Os valores do raio dos fungos na presença ou ausência dos isolados estão dispostos nas tabelas de 3 a 6.

Os isolados com médias mais significativas, em sua maioria, são provenientes de lagartas coletadas no campo com a variedade RB-83-5054 este fato pode estar relacionado ao fato de que 3 das 5 lagartas foram coletadas em campos com essa variedade, mas também pode estar relacionado com alguma característica ou propriedade da variedade ou do local.

5.4.1. Inibição ao crescimento de *F. verticillioides* por isolados de leveduras

Os testes feitos com os isolados de levedura contra o fitopatógeno *F. verticillioides* (Tabela 3), mostram que alguns isolados podem exercer inibição sobre o fungo, porém com valores inferiores aos de bactérias (Tabela 5).

No primeiro dia de avaliação, que foi feito após cinco dias de inoculação o isolado, 3.8, exerceu uma inibição de 0%, todos os demais apresentaram uma

inibição negativa, sendo o pior deles o isolado 1.6 que obteve uma inibição de -34,1% (Tabela 3).

Aos nove dias após a inoculação (segundo dia de avaliação), as médias foram superiores ao primeiro dia de avaliação, porém todos os isolados obtiveram médias que não diferem estatisticamente, sendo que a maior média porém estatisticamente igual a outras, foi do isolado 3.4 com 26,3%, seguido do isolado 3.8 com 24,2% e pelo isolado 1.3 com 22%. Os demais valores variaram de 21,6 a 13% de inibição.

Na terceira avaliação, embora não estatisticamente diferentes, o isolado 3.8 obteve a melhor média, com 35% de inibição, seguido pelo isolado 3.3 com 29,5%, o isolado 3.2 com 27,2% e o 5.2 com 23,6% de inibição. O isolado 1.6 que apresentou a menor porcentagem de inibição com -6,3%.

Na última avaliação o isolado 1.3 foi o que apresentou a melhor média com 41%, seguido pelo isolado 3.2 com 37,8% e pelo isolado 5.3 com 36,7%, seguido pelos isolados 4.1, 3.6, 5.4 e 1.5. Esses isolados não diferem estatisticamente entre si.

Para essa interação o isolado 3.8 esteve entre os isolados com as maiores médias durante as três primeiras avaliações, mostrando que ele pode ser efetivo no controle deste fungo até aos 11 dias após a inoculação. Este isolado foi proveniente da lagarta 3 que foi coletada em campo com a variedade RB-83-5054.

O isolado 1.3 oscilou nos seus valores de inibição durante os dias de avaliação aos 5 e 11 dias após a inoculação esteve entre as médias que foram estatisticamente iguais classificadas no grupo B, ou seja, esteve no grupo com a segunda melhor média, porém as 9 e 11 dias após a inoculação esteve no grupo com a melhor média, sendo que na última avaliação foi o melhor isolado, porém com média estatisticamente igual a outros sete isolados. Este isolado foi proveniente da lagarta 1, sendo esta coletada na variedade RB-83-5054. Este isolado pode ser explorado em estudos posteriores.

O isolado 3.2 também pode ser destacado por estar no grupo a, com médias estatisticamente superiores a outros isolados em todas as avaliações, este isolado foi proveniente da lagarta 3 que também foi coletada na variedade RB-83-5054.

Para a interação com o isolado 4.1, os valores de inibição também obtiveram médias significativas em três avaliações (5, 9 e 14 d.a.i.), porém na terceira

avaliação sua média foi abaixo, sendo encontrada no terceiro grupo de médias, e este isolado é proveniente da lagarta 4 que foi coletada na variedade SP-81-3280.

O isolado 3.6 esteve no primeiro grupo de médias estatisticamente superiores na última avaliação, e seu potencial também pode ser explorado, este isolado também é proveniente da lagarta 3.

O isolado 3.6 esteve no primeiro grupo de médias estatisticamente superiores na última avaliação, e seu potencial também pode ser explorado, este isolado também é proveniente da lagarta 3.

O isolado 5.4, proveniente da lagarta 5, esteve no grupo com as melhores médias em todas as avaliações e também pode ter potencial para ser explorado.

Dos isolados que tiveram média significativamente superior na última avaliação (14 d.a.i.) que os demais isolados e que foram descritos acima, quatro são provenientes da variedade RB-83-5054 e desses três isolados são provenientes da lagarta 3, os demais isolados são provenientes da variedade SP-81-3280. Este fato pode ser decorrente ao fato de que 3 das 5 lagartas utilizadas são provenientes dessa variedade.

5.4.2. Inibição ao crescimento de *C. falcatum* por isolados de leveduras

Os resultados dos testes feitos com os isolados de leveduras com o fitopatógeno *C. falcatum* (Tabela 4) (Figura 7) apresentaram médias menores do que as obtidas com bactérias. Na primeira avaliação, feita aos seis dias após a inoculação dos microrganismos as maiores médias que não diferem estatisticamente variaram de 37,1 a 28,6%, sendo que os isolados 1.10 e 3.12 foram os que apresentaram a melhor média de 37,1%. As menores médias que foram estatisticamente iguais variaram de 3,8 a 0%.

Aos 8 dias após a inoculação as maiores médias estatisticamente iguais variaram de 23,7%, do isolado 3.1 a 15,9%, seguidos das médias que variaram de 11,2 a 5,2% e as menores médias foram de 3,3% dos isolados 3.2 e 3.3.

A terceira avaliação foi feita aos quinze dias após inoculação, a melhor média foi obtida pelo isolado 1.7, com 27,6%, porém é estatisticamente igual a outras médias que variaram de 26,7 a 22,7%. As menores médias foram de 7,6 a 12,8% de inibição.

A última avaliação foi feita aos 20 dias e as duas melhores médias foram de 23,9 a 17,0% respectivamente dos isolados 1.14 e 1.15. As médias seguintes foram

11,9; 10,5 e 9,0, respectivas dos isolados 4.3; 1.3 e 3.3. As demais médias foram iguais ou menores que 5,2%, sendo a menor 0%.

Os resultados dos melhores isolados foram bem variados durante os dias de avaliação, os isolados 1.10 e 3.12 foram os que apareceram entre os melhores em dois dias de avaliação, os demais isolados variaram. O mesmo também ocorreu com os isolados com as menores médias.

O isolado 1.14 juntamente com o isolado 1.15 foram significativamente superiores aos demais isolados na última avaliação realizada, aos 20 dias após a inoculação, porém nas avaliações anteriores ele obtiveram médias estatisticamente inferiores a o outros, os dois isolados são provenientes da lagarta 1 que foi coletada na variedade RB-83-5054, essa mesma variedade foi a que obteve isolados com potencial de inibição nos testes feitos com o fungo *F. verticillioides*.

5.4.3. Inibição ao crescimento de *F. verticillioides* por isolados de bactérias

O teste de inibição de crescimento feito entre os isolados de bactéria e *F. verticillioides* (Tabela 5), três isolados apareceram entre os melhores em praticamente todos os dias de avaliação, foram 9.1, 10.2 e 7.2, seguidos de 10.1 e 10.3.

Na ilustração das classes de interação (Figura 1) foi usada a placa contendo o isolado 10.3 e *F. verticillioides* para ilustrar a categoria 4, onde o halo de inibição permanece durante todo o tempo de avaliação do experimento.

No primeiro dia de avaliação, no quarto dia após inoculação dos microrganismos, as médias foram todas estatisticamente iguais, não diferindo entre si.

O isolado 9.1 foi ilustrado na Figura 5, nas últimas duas linhas, da Figura 5I até a 5P. Esse isolado foi testado com os meios de cultura BDA, YEPD, CCS e NA, e exibiu forte antagonismo a *F. verticillioides* e *C. falcatum*, independente do meio testado. Provavelmente esse isolado secreta um composto químico no meio, impedindo que o fungo cresça e se desenvolva normalmente.

Aos 6 dias após a inoculação dos microrganismos, os teste de inibição apresentaram as maiores médias com os isolados 9.1, 10.3 10.2, 7.1 e 101 com médias entre 55,3% a 44,4% de inibição, que foram estatisticamente superiores as médias dos demais isolados.

A terceira avaliação também teve os mesmos isolados da avaliação anterior com as maiores médias que variaram de 60,5% a 53,6%. As menores inibições foram negativas, com 42,7% a 28,6%.

A quarta e última avaliação, mais uma vez os isolados 9.1, 10.2 e 7.2 obtiveram as melhores médias de porcentagem de inibição com 55,7%, 50,7% e 46,8% respectivamente, essas médias são inferiores as da avaliação anterior.

Os isolados que obtiveram destaque com as maiores médias significativas são provenientes da lagarta 4 e 5 que foram coletadas na variedade RB-83-5054.

5.4.4. Inibição ao crescimento de *C. falcatum* por isolados de bactérias

Assim como nos testes feitos com *F. verticillioides* os testes feitos entre bactérias e *C. falcatum* (Tabela 6) os mesmos isolados foram os que apresentaram as maiores médias de porcentagem de inibição.

Na primeira avaliação as porcentagens de inibição dos isolados 10.1, 9.1, 10.2 e 7.2 variaram de 35,6% a 30,0% e foram estatisticamente superiores dos outros isolados.

Nas duas avaliações posteriores os mesmos isolados, exceto 7.2, obtiveram médias superiores e crescentes, sendo que na segunda avaliação as médias variaram de 44,7% a 36,4% e na terceira avaliação as médias variaram de 54,4% a 44,9% de inibição.

Na última avaliação as médias foram bem superiores às demais avaliações e os isolados 10.2, 9.1 e 7.2 foram estatisticamente superiores aos demais com as seguintes médias, respectivamente, 63,4%, 55,7% e 52,7%. Essas são as maiores médias obtidas em todos os testes feitos.

Quando comparamos os testes feitos com bactérias versus os fitopatógenos para o este fungo (*C. falcatum*) com o fungo *F. verticillioides* verificamos que eles foram superiores para o primeiro, isto pode estar relacionado a ele ser o fungo que obrigatoriamente está associado à podridão vermelha e por consequência ao complexo broca-podridão, assim a relação dessas bactérias a estes fungos pode ser mais recorrente. Outro fato que também pode ser considerado é que o fungo *F. verticillioides* é mais agressivo que o *C. falcatum*.

Os isolados que obtiveram destaque com as maiores médias significativas são provenientes da lagarta 4 e 5 que foram coletadas na variedade RB-83-5054.

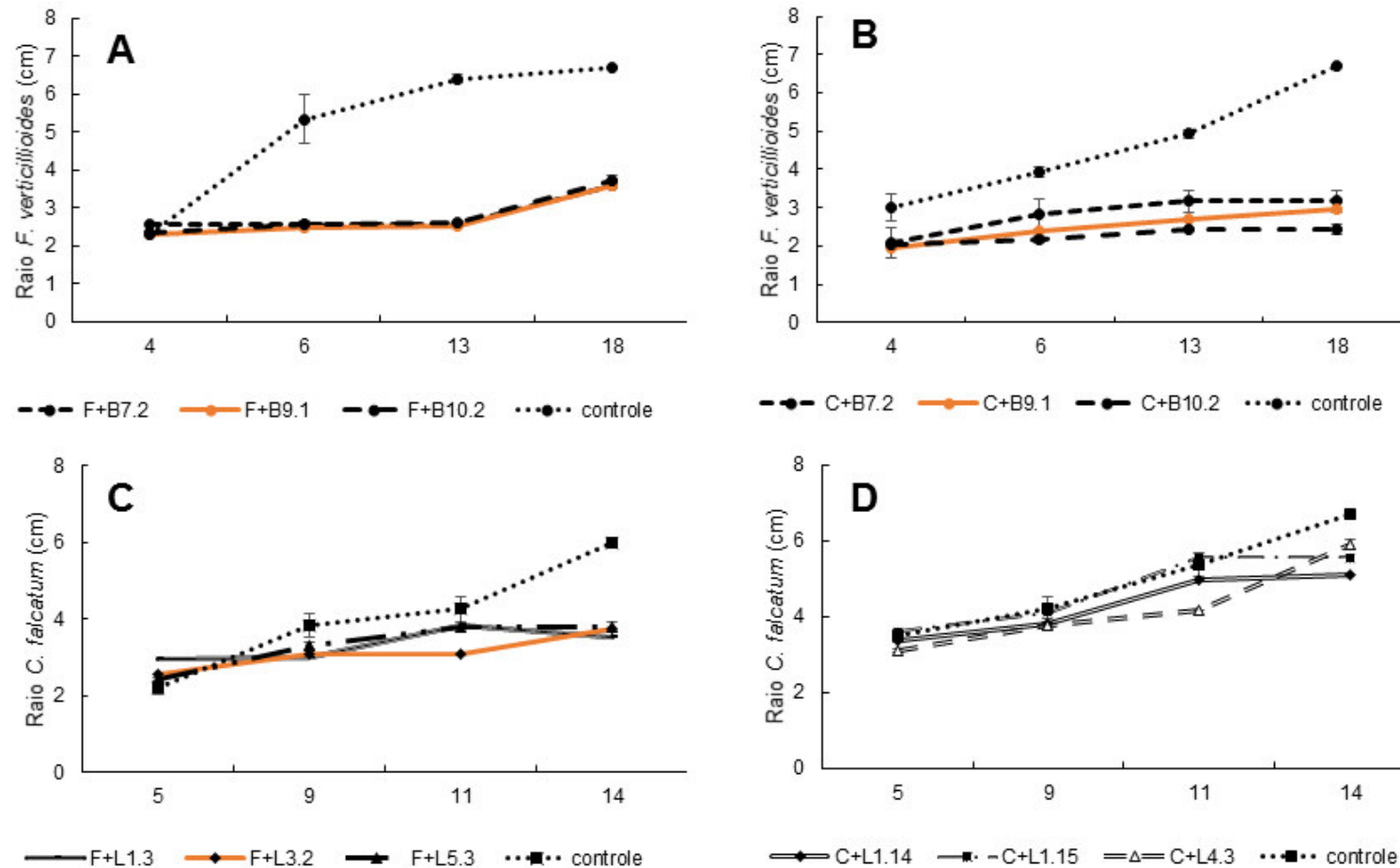


Figura 7 – Crescimento de *F. verticillioides* e *C. falcatum*, na presença ou ausência de isolados de bactéria e levedura da secreção oral de *D. saccharalis*. O crescimento foi avaliado em 4 dias após a inoculação, pela medição do raio do fungo em direção à colônia de bactéria ou levedura, comparado com o raio do fungo na placa controle, (ausência de isolado de bactéria ou levedura). (A) Co-cultivo de *F. verticillioides* e isolados 7.2, 9.1 e 10.2 de bactéria; (B) Co-cultivo de *C. falcatum* e isolados 7.2, 9.1 e 10.2 de bactéria; (C) Co-cultivo de *F. verticillioides* e isolados 1.3, 3.2 e 5.3 de levedura e (D) Co-cultivo de *C. falcatum* e isolados 1.14, 1.15 e 4.3 de levedura.

Tabela 3 – Percentual de inibição do crescimento de *F. verticillioides* exercida por isolados de levedura, medido aos 5, 9, 11 e 14 dias após a inoculação. Valores são a média de três repetições. Médias seguidas da mesma letra na vertical, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

| 5 d.a.i. | | | 9 d.a.i. | | | 11 d.a.i. | | | 14 d.a.i. | | |
|----------|------------|-------|----------|------------|-------|-----------|------------|-------|-----------|------------|-------|
| Isolado | % inibição | Teste | Isolado | % inibição | Teste | Isolado | % inibição | Teste | Isolado | % inibição | Teste |
| 3.8 | 0 | a | 3.4 | 26,3 | a | 3.8 | 35,0 | a | 1.3 | 41,0 | a |
| 5.4 | -3,2 | a | 3.8 | 24,2 | a | 3.3 | 29,5 | a | 3.2 | 37,8 | a |
| 3.9 | -5,3 | a | 1.3 | 22,0 | a | 3.2 | 27,2 | a | 5.3 | 36,7 | a |
| 3.3 | -6,8 | a | 1.2 | 21,6 | a | 5.2 | 23,6 | a | 4.1 | 34,2 | a |
| 2.2 | -8,0 | a | 3.9 | 21,6 | a | 4.4 | 17,2 | b | 3.6 | 33,8 | a |
| 5.2 | -9,1 | a | 3.6 | 21,6 | a | 5.4 | 16,7 | b | 5.4 | 31,7 | a |
| 5.3 | -10,6 | a | 5.4 | 20,5 | a | 3.9 | 14,2 | b | 1.5 | 30,0 | a |
| 4.1 | -12,5 | a | 3.3 | 20,3 | a | 4.3 | 13,7 | b | 4.3 | 28,1 | b |
| 1.2 | -13,6 | a | 1.4 | 19,9 | a | 3.4 | 13,1 | b | 3.7 | 27,3 | b |
| 4.5 | -14,4 | a | 3.2 | 19,9 | a | 5.3 | 10,7 | b | 4.4 | 26,3 | b |
| 3.7 | -15,5 | a | 4.5 | 19,4 | a | 1.3 | 10,4 | b | 4.5 | 20,8 | b |
| 4.3 | -16,2 | a | 3.1 | 19,0 | a | 2.2 | 7,8 | c | 3.4 | 19,3 | b |
| 3.2 | -16,7 | a | 2.2 | 18,4 | a | 3.6 | 7,8 | c | 3.9 | 18,3 | b |
| 5.1 | -17,0 | a | 3.7 | 16,9 | a | 4.1 | 7,2 | c | 3.8 | 15,0 | c |
| 4.4 | -19,3 | a | 5.2 | 16,4 | a | 4.5 | 6,4 | c | 3.5 | 14,7 | c |
| 1.1 | -19,3 | a | 3.5 | 15,5 | a | 1.1 | 3,1 | c | 3.3 | 8,3 | c |
| 3.1 | -20,5 | a | 1.6 | 15,1 | a | 1.5 | 1,3 | c | 1.1 | 0,0 | c |
| 3.4 | -20,9 | a | 1.1 | 15,1 | a | 1.2 | 1,3 | c | 1.2 | 0 | c |
| 2.1 | -21,2 | a | 4.4 | 15,1 | a | 1.4 | 0,5 | c | 1.4 | 0 | c |
| 3.5 | -22,0 | a | 5.1 | 15,1 | a | 3.7 | -0,1 | c | 1.6 | 0 | c |
| 4.2 | -23,9 | b | 1.5 | 14,7 | a | 3.5 | -2,2 | c | 2.1 | 0 | c |
| 3.6 | -30,7 | b | 4.1 | 13,8 | a | 3.1 | -2,2 | c | 2.2 | 0 | c |
| 1.3 | -33,8 | b | 5.3 | 13,8 | a | 5.1 | -3,4 | c | 3.1 | 0 | c |
| 1.6 | -34,1 | b | 4.3 | 13,0 | a | 1.6 | -6,3 | d | 4.2 | 0 | c |

Tabela 4 – Percentual de inibição do crescimento de *C. falcatum* exercida por isolados de levedura, medido aos 6, 8, 15, 20 dias após a inoculação. Valores são a média de três repetições. Médias seguidas da mesma letra na vertical, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

| 6 d.a.i. | | | 8 d.a.i. | | | 15 d.a.i. | | | 20 d.a.i. | | |
|----------|---------------|-------|----------|---------------|-------|-----------|---------------|-------|-----------|---------------|-------|
| Isolado | % inibição | Teste | Isolado | % inibição | Teste | Isolado | % inibição | Teste | Isolado | % inibição | Teste |
| 1.10 | 37,1 | a | 3.10 | 23,7 | a | 1.7 | 27,6 | a | 1.14 | 23,9 | a |
| 3.12 | 37,1 | a | 1.5 | 23,0 | a | 3.12 | 26,7 | a | 1.15 | 17,0 | a |
| 1.13 | 36,2 | a | 1.10 | 22,2 | a | 1.10 | 26,4 | a | 4.3 | 11,9 | b |
| 1.5 | 35,2 | a | 1.13 | 22,2 | a | 1.13 | 25,8 | a | 1.3 | 10,5 | b |
| 1.8 | 33,3 | a | 1.11 | 21,4 | a | 3.7 | 24,5 | a | 3.3 | 9,0 | b |
| 1.12 | 31,4 | a | 3.12 | 19,8 | a | 1.5 | 24,5 | a | 3.8 | 5,2 | c |
| 1.11 | 30,5 | a | 1.6 | 19,0 | a | 1.11 | 23,3 | a | 1.16 | 4,2 | c |
| 1.9 | 30,5 | a | 1.9 | 19,0 | a | 1.12 | 23,3 | a | 3.7 | 3,5 | c |
| 3.10 | 29,5 | a | 1.12 | 18,2 | a | 1.9 | 22,7 | a | 1.5 | 3,0 | c |
| 3.11 | 29,5 | a | 1.7 | 17,5 | a | 4.3 | 22,7 | a | 1.9 | 3,0 | c |
| 1.7 | 28,6 | a | 1.8 | 17,5 | a | 1.6 | 20,2 | b | 1.1 | 0 | c |
| 3.13 | 28,6 | a | 3.13 | 17,5 | a | 3.9 | 19,0 | b | 1.10 | 0 | c |
| 3.9 | 14,3 | b | 3.11 | 16,7 | a | 3.13 | 17,7 | b | 1.11 | 0 | c |
| 1.6 | 11,4 | b | 3.7 | 15,9 | a | 3.11 | 17,1 | b | 1.12 | 0 | c |
| 3.7 | 11,4 | b | 4.3 | 11,2 | b | 1.8 | 15,9 | b | 1.13 | 0 | c |
| 4.3 | 11,4 | b | 1.14 | 10,4 | b | 3.8 | 15,5 | b | 1.2 | 0 | c |
| 3.8 | 8,6 | b | 1.1 | 10,4 | b | 3.4 | 14,0 | b | 1.4 | 0 | c |
| 3.2 | 3,8 | c | 3.4 | 10,4 | b | 3.3 | 12,8 | c | 1.6 | 0 | c |
| 1.14 | 3,4 | c | 3.9 | 8,8 | b | 3.10 | 12,1 | c | 1.7 | 0 | c |
| 1.4 | 2,9 | c | 1.3 | 8,0 | b | 1.2 | 10,9 | c | 1.8 | 0 | c |
| 3.3 | 2,9 | c | 3.8 | 6,8 | b | 1.4 | 10,9 | c | 3.1 | 0 | c |
| 3.6 | 1,4 | c | 1.15 | 5,2 | b | 3.2 | 10,9 | c | 3.10 | 0 | c |
| 1.2 | 1,0 | c | 3.2 | 3,3 | c | 1.1 | 8,4 | c | 3.11 | 0 | c |
| 1.1 | 0,0 | c | 3.3 | 3,3 | c | 1.14 | 7,6 | c | 3.12 | 0 | c |

Continuação da Tabela 4

| | | | | | | | | | | | |
|------|------|---|------|------|---|------|------|---|------|---|---|
| 1.3 | 0,0 | c | 3.5 | 1,7 | c | 3.5 | 5,3 | c | 3.13 | 0 | c |
| 5.1 | -1,0 | c | 3.1 | 1,7 | c | 3.1 | 3,5 | d | 3.2 | 0 | c |
| 3.4 | -1,9 | c | 1.2 | 0,9 | c | 3.6 | 0,7 | d | 3.4 | 0 | c |
| 1.15 | -2,9 | c | 1.4 | 0,9 | c | 1.3 | 0,4 | d | 3.5 | 0 | c |
| 3.1 | -2,9 | c | 3.6 | -1,4 | c | 1.16 | -0,2 | d | 3.6 | 0 | c |
| 1.16 | -3,8 | c | 4.1 | -2,6 | c | 4.1 | -1,2 | d | 3.9 | 0 | c |
| 3.5 | -4,8 | c | 1.16 | -5,7 | c | 5.1 | -1,5 | d | 4.1 | 0 | c |
| 4.1 | -7,1 | c | 5.1 | -7,7 | c | 1.15 | -3,2 | d | 5.1 | 0 | c |

Tabela 5 – Percentual de inibição do crescimento de *F. verticillioides* exercida por isolados de bactéria, medido aos 4, 6, 13 e 18 dias após a inoculação. Valores são a média de três repetições. Médias seguidas da mesma letra na vertical, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

| 4 d.a.i. | | | 6 d.a.i. | | | 13 d.a.i. | | | 18 d.a.i. | | |
|----------|------------|--------|----------|------------|-------|-----------|------------|-------|-----------|------------|-------|
| Isolado | % inibição | Teste* | Isolado | % inibição | Teste | Isolado | % inibição | Teste | Isolado | % inibição | Teste |
| 10.1 | -5,8 | | 9.1 | 55,3 | a | 9.1 | 60,5 | a | 9.1 | 55,7 | a |
| 10.2 | 0,0 | | 10.3 | 54,1 | a | 7.2 | 59,9 | a | 10.2 | 50,7 | a |
| 10.3 | -2,2 | | 10.2 | 52,3 | a | 10.3 | 59,4 | a | 7.2 | 46,8 | a |
| 6.1 | -8,7 | | 7.2 | 51,9 | a | 10.2 | 58,5 | a | 6.4 | 44,3 | b |
| 6.2 | -7,3 | | 10.1 | 44,4 | a | 10.1 | 53,6 | a | 10.3 | 42,5 | b |
| 6.3 | 4,4 | | 8.6 | 41,2 | b | 6.3 | 42,7 | b | 8.10 | 42,3 | b |
| 6.4 | 7,3 | | 6.1 | 40,6 | b | 6.4 | 41,7 | b | 8.6 | 42,3 | b |
| 6.5 | -2,2 | | 6.3 | 39,4 | b | 6.1 | 41,1 | b | 8.4 | 40,8 | b |
| 7.1 | -6,5 | | 6.4 | 39,4 | b | 8.6 | 39,6 | b | 7.3 | 40,5 | b |
| 7.2 | -11,6 | | 8.10 | 39,4 | b | 8.10 | 39,6 | b | 7.4 | 40,3 | b |
| 7.3 | -9,4 | | 6.2 | 36,9 | b | 8.4 | 38,0 | b | 6.2 | 39,8 | b |
| 7.4 | -1,5 | | 8.2 | 36,9 | b | 7.3 | 37,8 | b | 8.1 | 39,8 | b |
| 7.5 | -2,9 | | 7.4 | 35,6 | b | 8.2 | 37,5 | b | 8.2 | 39,3 | b |
| 8.1 | -2,9 | | 8.4 | 35,6 | b | 7.4 | 37,5 | b | 8.3 | 39,3 | b |
| 8.10 | -7,3 | | 7.3 | 34,7 | b | 6.2 | 37,0 | b | 10.1 | 38,8 | b |
| 8.2 | -4,4 | | 8.3 | 34,4 | b | 8.1 | 37,0 | b | 6.5 | 38,8 | b |
| 8.3 | -5,8 | | 6.5 | 34,4 | b | 8.3 | 36,5 | b | 8.7 | 38,8 | b |
| 8.4 | -4,4 | | 8.1 | 34,4 | b | 6.5 | 35,9 | b | 8.5 | 36,8 | c |
| 8.5 | -10,1 | | 8.7 | 33,7 | b | 8.7 | 34,9 | b | 7.5 | 34,8 | c |
| 8.6 | -8,7 | | 7.5 | 33,1 | b | 8.9 | 34,4 | b | 8.9 | 31,8 | c |
| 8.7 | 1,5 | | 8.5 | 31,9 | b | 8.5 | 33,9 | b | 8.8 | 31,8 | c |
| 8.8 | -14,5 | | 8.8 | 31,3 | b | 7.5 | 31,8 | b | 6.1 | 30,3 | c |
| 8.9 | -5,8 | | 8.9 | 30,6 | b | 7.1 | 31,3 | b | 6.3 | 30,3 | c |
| 9.1 | 1,9 | | 7.1 | 28,8 | b | 8.8 | 28,6 | b | 7.1 | 27,6 | c |

*De acordo com o teste F, as médias desse fator não diferem entre si.

Tabela 6 – Percentual de inibição do crescimento de *C. falcatum* exercida por isolados de bactéria. Medido aos 4, 6, 13 e 18 dias após a inoculação. Valores são a média de três repetições. Médias seguidas da mesma letra na vertical, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

| 4 d.a.i. | | | 6 d.a.i. | | | 13 d.a.i. | | | 18 d.a.i. | | |
|----------|------------|-------|----------|------------|-------|-----------|------------|-------|-----------|------------|-------|
| Isolado | % inibição | Teste | Isolado | % inibição | Teste | Isolado | % inibição | Teste | Isolado | % inibição | Teste |
| 10.1 | 35,6 | a | 10.2 | 44,7 | a | 10.3 | 54,4 | a | 10.2 | 63,4 | a |
| 9.1 | 35,0 | a | 9.1 | 39,4 | a | 10.2 | 50,3 | a | 9.1 | 55,7 | b |
| 10.2 | 32,5 | a | 10.3 | 36,4 | a | 9.1 | 44,9 | a | 7.2 | 52,7 | b |
| 7.2 | 30,0 | a | 7.3 | 29,7 | b | 7.2 | 35,8 | b | 10.3 | 43,3 | c |
| 7.3 | 24,4 | b | 10.1 | 28,0 | b | 10.1 | 35,8 | b | 7.3 | 40,3 | c |
| 10.3 | 21,7 | c | 7.2 | 28,0 | b | 7.3 | 18,9 | c | 10.1 | 38,3 | c |
| 8.7 | 18,3 | c | 6.1 | 11,0 | c | 6.3 | 13,5 | c | 6.1 | 8,5 | d |
| 8.3 | 17,8 | c | 6.3 | 11,0 | c | 6.1 | 10,1 | d | 6.2 | 0 | d |
| 6.3 | 17,8 | c | 7.4 | 10,2 | c | 6.2 | 9,5 | d | 6.3 | 0 | d |
| 6.4 | 17,8 | c | 8.3 | 9,3 | c | 8.10 | 8,8 | d | 6.4 | 0 | d |
| 7.1 | 16,7 | c | 6.4 | 7,6 | c | 8.4 | 8,8 | d | 6.5 | 0 | d |
| 8.4 | 16,7 | c | 8.2 | 7,2 | c | 8.3 | 8,1 | d | 7.1 | 0 | d |
| 7.4 | 15,6 | c | 8.1 | 6,8 | c | 6.4 | 6,8 | d | 7.4 | 0 | d |
| 6.5 | 14,4 | c | 8.4 | 6,8 | c | 6.5 | 6,8 | d | 7.5 | 0 | d |
| 8.10 | 14,4 | c | 8.5 | 5,9 | c | 7.4 | 6,8 | d | 8.1 | 0 | d |
| 6.2 | 13,3 | d | 8.7 | 5,1 | c | 8.7 | 6,8 | d | 8.10 | 0 | d |
| 8.1 | 12,2 | d | 7.1 | 5,1 | c | 8.2 | 4,7 | e | 8.2 | 0 | d |
| 8.2 | 11,7 | d | 8.10 | 4,2 | c | 8.1 | 3,4 | e | 8.3 | 0 | d |
| 8.5 | 11,7 | d | 6.5 | 3,4 | d | 7.1 | 2,7 | e | 8.4 | 0 | d |
| 6.1 | 11,1 | d | 6.2 | 3,4 | d | 8.8 | 2,7 | e | 8.5 | 0 | d |
| 7.5 | 10,0 | d | 7.5 | 1,7 | d | 8.6 | 2,0 | e | 8.6 | 0 | d |
| 8.6 | 10,0 | d | 8.8 | -0,9 | d | 8.5 | 1,7 | e | 8.7 | 0 | d |
| 8.9 | 10,0 | d | 8.9 | -1,7 | d | 8.9 | -0,3 | e | 8.8 | 0 | d |
| 8.8 | 7,8 | d | 8.6 | -3,4 | d | 7.5 | -1,4 | e | 8.9 | 0 | d |

5.5 Identificação, por meio de sequenciamento de DNA, das bactérias e leveduras cultiváveis da secreção oral de *D. saccharalis*

O domínio variável 1 e 2 (D1/D2) é uma região de 600 nucleotídeos da parte 5' da subunidade maior (LSU) do RNA ribossômico e foi usado para identificar as leveduras, resultando em uma base de dados (barcode) (KURZMAN; ROBNETT, 1997, 1998; FELL et al., 2000). No entanto, houveram alguns problemas com os *primers* desenhados para amplificar o DNA de levedura e os resultados aqui apresentados são da identificação de algumas amostras de isolados de bactérias.

Para a identificação das bactérias, usou-se *primers* para amplificar a região da subunidade menor do ribossomo o 16S rDNA (HEUER et al., 1997). Embora ainda preliminares, nossos resultados (Tabela 7) mostram a sequência de três isolados de bactéria, que foi analisada e identificada como sendo similar a do gênero *Klebsiella*. Ausique (2009) também identificou esse gênero como sendo o mais comum entre as bactérias isoladas do mesêntero de *D. saccharalis*, coletadas em lavouras do estado de SP.

Embora ainda seja necessário identificar a maior parte dos microrganismos, há na literatura trabalhos mostrando que microrganismos com ações antagonicas à aqueles que são fitopatogênicos. Bell, Wells e Markhan (1982), testaram isolados de *Trichoderma* spp. contra patógenos de plantas, obtendo alguns resultados positivos, com níveis diferentes de antagonismo durante seu estudo. A utilização de microrganismos no controle de fitopatógenos já possuem resultados promissores, Rosa, Tauk-Tornisielo e Ceccato-Antonini (2011), utilizaram estirpes de *Torulaspora globosa* e *Candida intermedia* isoladas da rizosfera e superfície foliar de milho e sorgo, para teste de antagonismos contra *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum graminicola*, fitopatógenos dessas culturas. Com *C. graminicola*, as estirpes exerceram um antagonismo que variou de 45,9% a 52,7%, já para *C. sublineolum* a porcentagem variou de 47,7% a 60,3%. Em outro trabalho, Rosa e colaboradores (2010) obtiveram resultados satisfatórios quando testaram estirpes de *Torulaspora globosa* contra o fungo causador da antracnose do sorgo *Colletotrichum sublineolum*, onde se teve sucesso em testes 'in vitro' e 'in vivo'.

Figueiredo et al. (2010) testou a bactéria *Bacillus subtilis*, contra seis fungos fitopatogênicos do milho e sorgo, dentre eles *Fusarium moliniforme* e *Colletotrichum sublineolum*, e demonstrou que a bactéria inibiu o crescimento dos fungos.

Tabela 7 - Identificação de isolados de bactéria, provenientes de secreção oral de *D. saccharalis*, coletada no campo.

| E-value | % Identidade | Blast hit ^a | Descrição ^b | Referência |
|---------|------------------|------------------------|--|----------------------|
| 8e-83 | 122/133 (92%) | NR_0256 35 | <i>Klebsiella variicola</i> strain F2R9 16S ribosomal RNA gene | Não publicad o |
| 7e-66 | 79/98 (81%) | NR_0747 29 | <i>Klebsiella variicola</i> At-22 strain At-22 16S ribosomal RNA, complete sequence <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> HS11286 strain HS11286 16S ribosomal RNA, complete sequence | |
| 3e-79 | 115/130 (88%) | NR_1039 36 | Staphylococcus warneri SG1 strain SG1 16S ribosomal RNA, complete sequence | |
| 2e-131 | 186/194 (96%) | NR_1024 99 | <i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112 16S ribosomal RNA gene, complete sequence | |
| 3e-92 | 138/140 (99%) | NR_1217 61 | <i>Klebsiella variicola</i> strain F2R9 16S ribosomal RNA gene | Não publicad o |
| 6e-97 | 149/188 (79%) | NR_0256 35 | <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> strain DSM 30104 16S ribosomal RNA gene | Não publicad o |
| 9e-128 | 192/201 (96%) | NR_1176 83 | <i>Klebsiella variicola</i> strain F2R9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | |
| 5e-91 | 133/135 (99%) | NR_0256 35 | <i>Klebsiella variicola</i> At-22 strain At-22 16S ribosomal RNA, complete sequence | |
| 8e-90 | 129/133 (97%) | NR_0747 29 | | |

6. CONCLUSÕES

Esse trabalho explorou a microbiota presente na secreção oral, por ser o local onde se dá primeiro contato com a planta e também com os microrganismos e fitopatógenos que habitam o interior do colmo de cana.

A microbiota da secreção oral foi corretamente coletada e os co-cultivos indicaram 9 isolados, de levedura e 4 isolados de bactéria com potencial de antagonismo contra os dois fungos causadores da podridão, no entanto, resta atribuir uma função à cada um dos isolados da microbiota da secreção oral da lagarta.

As diversas funções desempenhadas pela microbiota simbiote podem ser exploradas comercialmente com o desenvolvimento de estratégias de controle dos insetos hospedeiros, como fonte de enzimas ou moléculas com aplicações biotecnológicas, industriais ou agrícolas.

7. LITERATURA CITADA

AANEN, D. K.; LICHT, H. H. F.; DEBETS, A. J. M.; KERSTES, N. A. G.; HOEKSTRA, R. F.; BOOMSMA, J. J. High Symbiont Relatedness Stabilizes Mutualistic Cooperation in Fungus-Growing Termites. **Science**, v. 326, p. 1103 – 1106, 2009.

AHMED, A.S.; SANCHEZ, C.P.; EGEA, E.; CANDELA, M. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. **Plant Pathology**, v.48, p. 58–65, 1999.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, n. 17 p. 3389-3402, 1997.

ANDERSON, J.M., RAYNER, A.D.M., WALTON, D.W.H. (Eds.) Invertebrate-Microbial Interactions. **Cambridge University Press**, 1984

ANGELIS, D. F.; VALSECHI, O. A. **Monitoramento Teórico e Prático da Fermentação Etalônica: Meios de cultura para Leveduras**. Disponível em: <<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Meios%20de%20cultivo%20para%20leveduras.pdf>>. Acesso em 02/03/2015.

AUSIQUE, J. J. S; **Caracterização das comunidades de microrganismos associados ao mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: Crambidae e Noctuidae)** Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP, Piracicaba/SP, 2009.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAN, C. R. In vitro Antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Ecology and Epidemiology**, v. 72, n.4, 379-382p., 1982.

BERTI FILHO, E. **O controle biológico dos insetos-praga**, p. 87-104. In: Crocomo, W. B. (ed.), Manejo Integrado de Pragas. São Paulo, Unesp, 358 p., 1990.

BIGNELL, D.E. The arthropod gut as an environment for microorganisms. In: ANDERSON, J.M., RAYNER, A.D.M., WALTON, D.W.H. (Ed.), Invertebrate-Microbial Interactions. **Cambridge University Press**, p. 205–227, 1984.

BOIÇA JR., A. L.; LARA, F. M.; BELLODI, M. P. Influência de variedades de cana-de-açúcar, incorporadas em dieta artificial, no desenvolvimento de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e no seu parasitismo por *Cotesia flavipes* (Cam.) **An. Soc. Entomol. Bras.**, Londrina , v. 26,n. 3,p. 537-542, 1997.

BORKOTT, H., INSAM, H. Symbiosis with bacteria enhances the use of chitin by the springtail, *Folsomia candida* (Collembola). **Biology and Fertility of Soils** n.9, v.126–129, 1990.

BOUSH, B.M., COPPEL, H.C. Symbiology: arthropods and microorganisms. In: Cantwell, G.E. (Ed.), **Insect Diseases**, Vol. II. Marcel Dekker, New York, p. 301–326, 1974.

BRAND, J.M.; BRACKE, J.W.; MARKOVETZ, A.J.; WOOD, D.L.; BROWNE, L.E. Production of verbenol pheromone by a bacterium isolated from bark beetles. **Nature**, v. 254, p. 136-137, 1975.

BROWNLIE, J.C.; JOHNSON, K.N. Symbiont-mediated protection in insect hosts. **Trends in microbiology**, v. 17, n. 8, p. 348-354, 2009.

BRUNE, A.; FRIEDRICH, M. Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 3, p. 263–269, 2000.

CAMPBELL, B. C. On the role of microbial symbiontes in herbivorous insects. In: Bernays, E. (Ed.). Insect-plant interactions. Boca Raton: **CRC Press**, 1990.

CASPARI, E.; WATSON, G.S. On the evolutionary importance of cytoplasmic sterility in mosquitos. **Evolution**, v.13, p. 568–570, 1959.

CAZEMIER, A.E.; DEN CAMP O.P.; HACKSTEIN; H.J.M.,; VOGELS, J.H.P.; G.D. Fibre digestion in arthropods. **Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.**, v.118, p.101–109, 1997

CHAPOLA, R. G.; CRUZ, J. A.; NUNES, I. K.; FERNADES JÚNIOR, A. R.(Ed.) **Censo Varietal 2012**. Araras: CCA-UFSCar, 2013. 55p.

CHAVES, S.; NETO, M.; TERNEIRO, R. Insect symbiont systems: From complex relationships to biotechnological applications. *Biotechnology Journal*, Weinhem, v. 4, n. 12, p. 1753-1765, 2009.

CIRELLI, K. R. N.; PENTEADO-DIAS, A. M. Análise da riqueza da fauna de Braconidae (Hymenoptera, Ichneumonoidea) em remanescentes naturais da Área de Proteção Ambiental (APA) de Descalvado/SP. **Revista Brasileira de entomologia**, v. 47,n. 1,p. 89-98, 2003.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: Microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Bioprospecção**. p. 43 – 47, 2012.

DANTUR, K. I.; ENRIQUE, R.; WELIN, B.;CASTAGNARO, A.P. Isolation of cellulolytic bactéria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. **AMB Express**, v.5, n.1, p. 1-11, 2015.

DELALIBERA, I.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, A. K. Contrasts in Cellulolytic Activities of Gut Microorganisms between the wood borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the bark beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 34, n. 3, p. 541-547, 2005.

DEMETRIO, P. A.; ZONETTI, P. C.; MUNHOZ, R. E. F. Avaliação de clones de cana-de-açúcar promissores RBs quanto à resistência à broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*), na região noroeste do Paraná. **Cezumar**, v. 10, n.1, p. 13 – 16, 2008.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annual Reviews in Entomology**, v. 49, n. 1, p. 71-92, 2004.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. Cana-de-açúcar. Campinas: **Instituto Biológico**, p. 349-404, 2008.

DINARDO-MIRANDA, L. L; FRACASSO, J. V.; PERECIN, D. Variabilidade espacial de população de *Diatraea saccharalis* em canaviais e sugestão de método de amostragem. **Bragantia, Campinas**, v. 70, n. 3, p. 577-585, 2011.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Cigarrinha das raízes em cana-de-açúcar. **Campinas: Instituto Agrônomo**, 72p., 2003.

DOUGLAS, A.E. Lessons from studying insect symbioses. **Cell host & Microbe**, v. 10, n. 4, p. 359-367, 2011.

DOUGLAS, A.E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria Buchnera. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.17–37, 1998.

DOUGLAS, A.E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. **Functional Ecology**, v.23, n. 1, p. 38-47, 2009

DOUGLAS, A.E.; PROSSER, W.A. Synthesis of the essential amino acid tryptophan in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis. **J. Insect Physiol.**, v. 38, p. 565–568, 1992.

DOWD, P.F. Insect fungal symbionts: A promising source of detoxifying enzymes. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 149-161, 1992.

ERNANDES, F. M. P. G.; CRUZ, C. H. G. Uso De Caldo De Cana-De-Açúcar Para Produção De Levana Por *Zymomonas Mobilis* CCT4494. **Ciênc. agrotec.**, v. 35, n. 2, p. 354-360, 2011.

FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 50, pp. 1351-1371, 2000.

FERRARI, J., DARBY, A.C., DANIELL, T.J., GODFRAY, H.C.J.; DOUGLAS, A.E. Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. **Ecol. Entomol.**, v.29, p.60–65, 2004.

FERREIRA, A. H.; MARANA, S. R.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Purification, molecular cloning, and properties of a beta-glycosidase isolated from midgut lumen

of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 31, 1065–1076, 2001.

FIGUEIREDO, J. E. F.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; BRESSAN, W.; PINTO, N. F. J.; CASELA, C. R. Atividade antagonista in vitro de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo. **Anais do XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**. P. 667 – 673, 2010.

FLANDERS, S. E. Mexican Sugar Cane-borers and the Parasite *Trichogramma*. **Journal of Economic Entomology**, v. 23, n. 3, p. 603-606, 1930.

FRAGO, E.; DICKE, M.; GODFRAY, H.C. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. **Trends in Ecology and Evolution**, v.27, n.12, p. 705-711, 2012.

GALLO, D., O. NAKANO, S.S. NETO, R.P.L. CARVALHO, G.C. BATISTA, E. BERTI FILHO, J.R.P. PARRA, R.A. ZUCCHI, S.B. ALVES & J.D. VENDRAMIM. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo, Agrônômica Ceres, 1988, 649p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GATCH, E. W.; MUNVOLD, G. P. Fungal Species Composition in Maize Stalks in Relation to European Corn Borer Injury and Transgenic Insect Protection. **Plant Disease**, v. 86, n.10, p.1156 – 1162, 2002.

GEIB, S.M.; TIEN, M.; HOOVER, K. Identification of proteins involved in lignocellulose degradation using in gel zymogram analysis combined with mass spectroscopy-based peptide analysis of gut proteins from larval asian longhorned beetles, *Anoplophora glabripennis*. **Insect Sci.**, v.17, p. 253–264. 2010.

GHERNA, R.L.; WERREN, J.H.; WEISBURG, W.; COTE, R.; WOESE, C.R.; MANDELCO, L.; BRENNER, D.J. *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **Internat. J. Systemic Bacteriol.**, v.41, p.563–565, 1991.

GOVENDER, P.; McFARLANE, S. A.; RUTHERFORD, R. S. *Fusarium* species causing pokkah boeng and their effect on *Eldana saccharina* walker (Lepidoptera:Pyralidae). **Proc S Afr Sug Technol Ass**, v. 83, p. 267-270, 2010.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HIROSE, E.; PANIZZI, A. R. Os simbiotes e a nutrição dos insetos. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.) **Bioecologia e nutrição de insetos**: base para o manejo

integrado de pragas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Londrina: Embrapa Soja, p. 251-276, 2009.

HUANG, S; SHENG, P; ZHANG, H. Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). **International Journal of Molecular Sciences**, 13, p. 2563-2577, 2012.

ISHIKAWA H. Biochemical and molecular aspects of endosymbiosis in insects. **International Review of Cytology**; v. 116, p.1-45, 1989.

JHA, G.; ANJIAH, V. Metabolites of rhizobacteria antagonistic towards fungal plant pathogens. **Annals of Microbiology**. v. 57, n. 1, p. 127 – 130, 2007.

KAISER, W.; HUGUET, E.; CASAS, J.; COMMIN, C.; GIRON, D. Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. **Proc Biol Sci.**, n. 7; n.277 (1692) p. 2311-2319, 2010.

KALAIMANI, T.; JAYARAJ, T.; RAJENDERAN, B.; THIRUMURUGAN, A. Review Of The Management Of Sugarcane Red Rot Caused By *Colletotrichum Falcatum* Went In India. **Proc Aust Soc Sugar Cane Technol**. v. 34, p.1 – 9, 2012.

KELLNER, R.I.I. AND DETTNER, K. Differential efficacy of toxic pederin in deterring potential arthropod predators of *Paelenus* (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. **Oerologica**, v.107, p. 293-300, 1996.

KLEPZIG, K. D.; SIX, D. L. Bark beetle-fungal symbiosis:context dependency in complex associations. **Symbiosis**, v.37, p.189–205, 2004.

KURTMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 50 end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p.1216–1223, 1997.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 331-371, 1998.

MACEDO, N.; BOTELHO, P. S. M. Controle integrado da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae). **Brasil Açucareiro**, v. 162, n. 2, p. 2-11, 1988.

MACEDO, C. L; MARTINS, E. S; MACEDO, L. L. P; SANTOS, A. C; PRAÇA, L. B; GÓIS, L. A. B; MONNERAT, R. G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thurigiensis* eficientes contra *Diatraea saccharalis* (Lepdoptera: Crambidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 12, p. 1759 - 1765, 2012.

MADHUSUDAN, S.; JALALI, S. K.; VENKATESAN, T.; LALITHA, Y.; SRINIVAS, P. 16S rRNA gene based identification of gut bacteria from field collected larvae of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from tomato ecosystem. **Asian Journal of Bio Science**, v. 6, n 1, 106-113, 2011.

MAHLANZA, T.; RUTHERFORD, R. S.; SNYMAN, S. J.; WATT, M. P. Potential of *Fusarium sacchari*-tolerant mutants in controlling *Eldana saccharina* and borer-associated *Fusarium* stem rot in sugarcane. **European Journal of Plant Pathology**, v.141, p.825-837, 2015.

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**, v.155, n.3, p. 349-359, 2009.

MELO, I. S. **Controle biológico.** Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_2_210200792813.html. Acesso em 11 julho de 2016.

MIKA, N; ZORN, H; RÜHL, M. Insect-derived enzymes: a treasure for industrial biotechnology and food biotechnology. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 136, p.1 - 17, 2013.

MILANO, H. S; **Identificação de microrganismos do trato digestivo de pragas de cana-de-açúcar com atividade enzimática para degradação de substratos lignocelulósicos e potencial de bioconversão de D-xilose em xilitol.** Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, Piracicaba/SP, 2012.

MORRISON, M.; POPE, P. B.; DENMAN, S. E.; McSWEENEY, C.S. Plant biomass degradation by gut microbiomes: more of the same or something new? **Curr Opin Biotechnol**. v. 2, n. 3 p. 358-63, 2009.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 655-670, 2003.

NARDI, J. B.; MACKIE, I. R.; DAWSON, J. O.; Could microbial symbionts of arthropod guts contribute significantly to nitrogen fixation in terrestrial ecosystems? **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 751 – 763, 2002.

NOGUEIRA, I. **Levantamento e localização de alguns endossimbiontes de Bemisia tabaci.** 2012. 48f.Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Agrônômica). Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

OGUNWOLU, E.O.; REAGAN, T. E.; FLYNN, J. L.; HENSLEY, S. D. Effects of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepdoptera: Pyralidae) damage and stalk rot fungi on sugarcane yield in Lousiana. **Crop Protection**, v. 10, p. 57-61, 1991.

OLIVEIRA, R. F.; SOUSDALEFF, M.; LIMA, M. V. S.; LIMA, H. O. S. Produção fermentativa de ácido láctico a partir domelaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brasilian Journal of Food Technology**, v. 7, 2009.

OLIVER, K.M., RUSSELL, J.A., MORAN, N.A. AND HUNTER. M.S. Facultative bacteria in aphids confer resistance to parasitic wasps. **Proc. Natural Academy Sci.**,v.100, p.1803–1807, 2003.

PANNUTI, L. E. R.; BALSIN, E. L. L.; GAVA, G. J. C. KÖLLN, O. T.; CRUZ, J. C. S. Danos do Complexo broca-podridão à produtividade e à qualidade da cana-de-açúcar fertirrigada com doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 4, 2013.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, S.; BENTO, J. M. S. **Controle Biológico: Terminologia**, pág. 143-164. In: Parra, J. R.; Botelho, P. S. M.; Corrêa-Ferreira, S.; Bento, J. M. S. *Controle Biológico no Brasil, Parasitóides e Predadores*, São Paulo: Manole, 635 p., 2002.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003

PRATHIMA, P. T.; RAVEENDRAN, M.; KUMAR, K. K.; RAHUL, P. R.; KUMAR, V. G.; VISWANATHAN, R.; SUNDAR, A. R.; MALATHI, P.; SUDHAKAR, D.; BALASUBRAMANIAM, P. Differential Regulation of Defense-Related Gene Expression in Response to Red Rot Pathogen *Colletotrichum falcatum* Infection in Sugarcane. **Appl Biochem Biotechnol**. v.171, n.2, p.488-503, 2013

RAGO, A.; TOKESHI, H. Doenças da Cana-de-açúcar In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p. 185-196, 2005.

RIO, R. V.; LEFEVRE, C.; HEDDI, A.; AKSOY, S. Comparative genomics of insect-symbiotic bacteria: Influence of host environment on microbial genome composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6825 – 6832, 2003.

ROSA, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; ANTONINI, S. R. C. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulasporea globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *World J Microbiol Biotechnol* v.26, p.1491–1502, 2010

ROSA, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. **Braz. Arch. Biol. Technol**. v. 54, n. 1, p. 1-5, 2011.

SAIKIA, R.; AZAD, P.; ARORA, D.K. Toxin produced by *Colletotrichum falcatum* causing red rot of sugarcane. **Mycobiology**, v.32, p.149-154, 2004.

SAKSENA, P.; VISHWAKARMA, S. K.; TIWARI, A. K.; SINGH,, A.; KUMAR, A. Pathological And Molecular Variation In *Colletotrichum Falcatum* Went Isolates Causing Red Rot Of Sugarcane In The Northwest Zone Of India. **Journal Of Plant Protection Research**, v. 53, n. 1, p. 37 – 41, 2013.

SANDOVAL, S. S; SENÔ, K. C. A. Compartimento e Controle da *Diatraea saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar. **Nucleus**, v.7, n.1, p. 243 – 257, 2010.

SANTANA, M. V. **Podridão-vermelha (*Colletotrichum falcatum*) incidente em folha de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. Disponível em: <<http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/07/podridao-vermelha-colletotrichum.html>>. Acesso em 30 Maio 2015.

SANTOS, A. S. Doenças causadas por fungos. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas:Instituto Agronomico, cap. 1, p. 423 – 435, 2010.

SASAN, R.K.; BIDOCHKA, M.J. Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 35, n. 3, p. 288–293, 2013.

SCOTT A.J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.

SCOTT J.J.; OH, D.C.; YUCEER, M.C.; KLEPZIG, K.D.; CLARDY, J.; CURRIE, C.R. Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. **Science**. v.3; n.322 (5898) p.63, 2008.

SILVA, A. B.; BRITO, J. M. Controle biológico de insetos-pragas e suas perspectivas para o futuro. **Revista AGROTEC**, v. 36, n. 1, p. 248-258, 2015.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta bot. bras.* n. 20 v. 3, p. 649-655, 2006.

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S.; MINHONI, M. T. A. Seleção de bactérias com ação antagonica a fitopatógenos. **Scientia Agrária**. v. 9, n.4, p. 535 – 538, 2008.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v. 41, n. 1, p. 95-100, 2005.

SOUZA, A. P.; LEITE, D. C. C.; PATTATHIL, S.; HAHN, M. G.; BUCKERIDGE, M. S. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: Implications for second-generation bioethanol production. **BioEnergy Research**, v.6, n. 2, p. 564-579, 2013.

SOUZA, Z. M.; PAIXÃO, A. C. S.; PRADO, R. M.; CESARIN, L. G.; SOUZA, S. R.; MONTANARI, R. Produtividade agrícola de variedades de cana-de-açúcar e incidência de broca-comum e cigarrinha-da-raiz em canavial colhido sem queima. **Bragantia. Instituto Agrônômico de Campinas**, v. 67, n. 2, p. 413-419, 2008.

SUH, S. O.; NODA, H.; BLACKWELL, M. **Insect symbiosis: derivation of yeast-like endosymbionts within an entomopathogenic filamentous lineage**. *Molecular Biology and Evolution*, v. 18, n. 6, p. 995-1000, 2001.

SUN, J.Z.; SCHARF, M.E. Exploring and integrating cellulolytic systems of insects to advance biofuel technology. **Insect Sci.** v.17, p.163–165, 2010.

SUNDAR AR, VISWANATHAN R, PADMANAHAN P, MAHANRAJ D. Studies on the possible use of pathogen toxin as molecular marker for red rot resistance sugarcane. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica.** v.34, n. 3, p.211-217, 1999.

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. **Suprema.** p. 658-751, 1997.

TURCO, L. S; PIRES, A. L. M; ROSSATO JÚNIOR, J. A. S. Influência do complexo broca-Podridão na brotação da cana-de-açúcar. **Nucleus**, v. 11, n.1, p. 161 – 168, 2014.

VENDRAMIM, J. D; SILVA, F. C. D.; CÉSAR, M. A. A.; CAMARGO, A. P. D. Intensity of damage a new index for evaluation of borer-rot complex on sugarcane cultivars. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 20, p. 319-332, 1991.

VERNARD, C. VAILLANCOURT, L. Penetration and colonization of unwounded maize tissues by the maize anthracnose pathogen *Colletotrichum graminicola* and relates nonpathogen *C. sublineolum*. **Mycologia**, n.99, v.3, 2007.

VISHWAKARMA, S.K.; KUMAR, P.; NIGAM, A.; SINGH, A.; KUMAR, A. Pokkah Boeng: an emerging disease of sugarcane. **Journal of Plant Pathology and Microbiology** v. 4, p. 3. 2013.

VORBURGER, C.; GEHRER, L.; RODRIGUEZ, P. A strain of the bacterial *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. *Biology Letters*, London, v. 6, n. 1, p. 109-111, 2010.

WENZEL, M.; SCHÖNIG, I.; BERCHTOLD, M.; KÄMPFER, P.; KÖNIG, H. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 32–40, 2002.

WICKER, C. Differential vitamin and choline requirements of symbiotic and aposymbiotic *S. oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Comparative Biochem. Physiol.**,v. 76A, p.177–182, 1983.

ZHOU, X.; SMITH, J.A.; OI, F.M.; KOEHLER, P.G.; BENNETT, G.W.; SCHARF, M.E. Correlation of cellulase gene expression and cellulolytic activity throughout the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. **Gene**, v.395, p. 29–39. 2007.