



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THIAGO AUGUSTO PAES FERNANDES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO DE
NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO UENP n-04 E DE SUA
BACTÉRIA SIMBIONTE NO NORTE DO PARANÁ, BRASIL.**

THIAGO AUGUSTO PAES FERNANDES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO DE
NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO UENP n-04 E DE SUA
BACTÉRIA SIMBIONTE NO NORTE DO PARANÁ, BRASIL.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Oliveira Janeiro Neves.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Viviane Sandra Alves

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F363i Fernandes, Thiago Augusto Paes.
Identificação e caracterização do isolado de nematoide entomopatogênico UENP n-04 e de sua bactéria simbiote no Norte Paraná, Brasil / Thiago Augusto Paes Fernandes. - Londrina, 2020.
60 f. : il.

Orientador: Pedro Manoel Oliveira Janeiro Neves.
Coorientador: Viviane Sandra Alves.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Agronomia - Tese. 2. Nematóides entomopatogênicos - Tese. 3. Nematóides entomopatogênicos - Patogenicidade - Tese. 4. Bactérias gram-negativas - Tese. I. Neves, Pedro Manoel Oliveira Janeiro. II. Alves, Viviane Sandra. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

THIAGO AUGUSTO PAES FERNANDES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO DE
NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO UENP n-04 E DE SUA
BACTÉRIA SIMBIONTE NO NORTE DO PARANÁ, BRASIL.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Viviane Sandra Alves
Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP

Prof. Dr. Fernando Teruhiko Hata
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Dhiago Gomes Ferreira
Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP

Londrina, 30 de março de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha amada mãe Ester, por toda sua dedicação e esforço para que seus filhos sejam felizes.

Você merece o mundo. Te amo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda graça, bênçãos e forças concedidas a cada dia.

Aos meus amados Pais, Ester e Roberto (*in memoriam*) e Irmã, Thaise por todo amor e por me ensinarem sobre o respeito. Tudo o que eu sou e vou me tornar, devo a vocês. Muito Obrigado.

Aos meus sogros, Edson e Rosângela, por todos esses anos de carinho respeito e acolhimento. E minha cunhada, Haunanna, pela amizade, alegria e por sempre estar disposta a ajudar.

A minha melhor amiga, companheira e esposa, Bruna, por sempre me incentivar e me apoiar em todos os momentos. Esse título eu devo a você. Te amo.

Ao meu melhor amigo/irmão Leandro, por toda amizade companheirismo e por nunca negar ajuda nos momentos que mais precisei.

Aos meus amigos Adilson, Diana, Leo, Mayara, Bruno, Fábio, Willian, Dhiego, Caroline, Carolina, Priscila

Aos amigos de laboratório, Hata, Matheus, Alex, Eduardo, Adriano, Ju, que fizeram os dias serem mais divertidos.

Ao técnico do laboratório, Davi, por toda ajuda e amizade durante esses anos de laboratório.

A Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia. A todos os professores do programa, em especial aos da Entomologia, Prof. Mauricio, Prof. Amarildo e Prof. Ayres, por todo conhecimento passado durante as disciplinas e até mesmo fora delas.

A minha coorientadora/madrinha, Vivi. Obrigado por tudo. Por sempre me atender, me ENSINAR e me apoiar. Pela amizade além de tudo. Quando eu achava que não daria mais, você sempre dava um jeito. Obrigado pelas hospedagens. Obrigado pelos conselhos e por fazer parte da NOSSA vida.

Ao meu orientador, Prof. Pedro, pela confiança, pelos ensinamentos, pela dedicação, amizade, paciência, pelo exemplo de pessoa e profissional. Nunca vou esquecer o quanto me ajudou professor. Obrigado.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Epígrafe

“A felicidade só é verdadeira quando compartilhada.”

Christopher McCandles

FERNANDES, Thiago Augusto Paes. **Identificação e caracterização do isolado de nematoide entomopatogênico UENP n-04 e de sua bactéria simbiote no Norte do Paraná, Brasil.** 2020. 61 f. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Nematoídes entomopatogênicos (NEPs) das famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae são parasitas obrigatórios de insetos e podem ser utilizados no controle de insetos-praga que vivem no solo, ou que passem alguma fase de seu desenvolvimento no solo. Os NEPs possuem uma associação simbiótica com bactérias, de modo que são estas bactérias que vão causar a morte do inseto hospedeiro em até 72h. No Brasil, ainda são poucas as espécies de NEPs conhecidas, algo que é reflexo da escassez de estudos relacionados a caracterização e identificação destes entomopatogênicos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi identificar um isolado de nematoide e seu simbiote, coletado a partir de uma amostra de solo pelo método de “inseto-isca”, utilizando lagartas de *Galleria mellonella*, em área de cultivo orgânico localizada no município de Ribeirão Claro, Paraná, Brasil. Para a identificação do nematoide foram realizados estudos de morfometria e identificação molecular a partir do sequenciamento de trechos do gene de DNA ribossomal (DNAr), incluindo as regiões ITS e D2/D3 e no caso do simbiote, a identificação molecular foi conduzida a partir do sequenciamento parcial do gene do DNA ribossomal 16S. Posteriormente, realizou-se testes de patogenicidade sobre três diferentes insetos: lagartas de *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), adultos de *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) e larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Também foi avaliado a produção *in vivo* em lagartas de *G. mellonella*. As análises morfológicas apontaram diferenças em termos de morfometria em comparação com as espécies do grupo monofilético formado. Observou-se que a sequência obtida a partir da região ITS apresenta 98,10% de similaridade com *Heterorhabditis mexicana* (EF043444) enquanto que a sequência obtida para a região D2/D3 apresentou 100% de similaridade com *H. mexicana* (EU100414.1), o que leva a concluir que o isolado pertence a esta espécie. Observou-se que o isolado UENP n-04 apresentou patogenicidade aos três hospedeiros avaliados: *G. mellonella*, *T. molitor* e *D. melacanthus*, 98, 96 e 58% respectivamente. Ainda, foi possível verificar que a sua produção *in vivo* ocorreu ao longo de sete dias, e que a produção final foi de $8,9 \times 10^6$ Juvenis Infectates. Com relação a identificação molecular da bactéria simbiote concluiu-se que a mesma se encontra no grupo monofilético de *Photorhabdus asymbiotica* e pode pertencer a esta espécie.

Palavras-chave: *Heterorhabditis*; *Photorhabdus*; Produção *in vivo*; Patogenicidade.

FERNANDES, Thiago Augusto Paes. **Identification and characterization of the entomopathogenic nematode isolate UENP n-04 and its symbiont bacteria in Northern Paraná, Brazil.** 2020. 61 p. (Masters dissertation) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPNs) of the Heterorhabditidae and Steinernematidae families are mandatory insect parasites and can be used in the control of insect pests that live in the soil, or that pass some phase of their development in the soil. EPNs have a symbiotic association with bacteria, so it is these bacteria that will cause the death of the host insect within 72 hours. In Brazil, there are still few known species of EPNs, something that reflects the scarcity of studies related to the characterization and identification of these entomopathogens. In this sense, the objective of this study was to identify a nematode isolate and its symbiont, collected from a soil sample using the "insect bait" method, using from *Galleria mellonella* larvae, in an organic farming area located in the municipality of Ribeirão Claro, Paraná, Brazil. For the identification of nematode, morphometry and molecular identification studies were conducted from the sequencing of sections of the ribosomal DNA gene (DNAr), including the ITS and D2/D3 regions, and in the case of the symbiont, molecular identification was conducted from the partial sequencing of the 16S ribosomal DNA gene. Later, pathogenicity tests were performed on three different insects: *G. mellonella* larvae (Lepidoptera: Pyralidae), *Dichelops melacanthus* adults (Hemiptera: Pentatomidae) and *Tenebrio molitor* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae). In vivo production of *G. mellonella* larvae was also evaluated. Morphological analyses showed differences in terms of morphometry compared to the species of the monophyletic group formed. It was observed that the sequence obtained from the ITS region presents 98.10% similarity with *Heterorhabditis mexicana* (EF043444) while the sequence obtained for the D2/D3 region presented 100% similarity with *H. mexicana* (EU100414.1), which leads to the conclusion that the isolated belongs to this species. It was also observed that UENP n-04 isolate showed pathogenicity to the three evaluated hosts: *G. mellonella*, *T. molitor* and *D. melacanthus*, 98, 96 and 58% respectively. Also, it was possible to verify that its in vivo production occurred over seven days, and that the final production was 8.9×10^6 infective juveniles. Regarding the molecular identification of the symbiotic bacterium it was concluded that it is found in the monophyletic group of *Photorhabdus asymbiotica* and may belong to this species.

Key words: *Heterorhabditis*; *Photorhabdus*; In vivo production; Pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** – Relações filogenéticas dentro do gênero *Heterorhabditis* como inferido a partir de análises Bayesianas de sequências do gene ITS rRNA usando o GTR + Modelo I + G de evolução do DNA. Os valores de probabilidade posterior superior a 70% são dados em clados apropriados..... 17
- Figura 02** – Microscopia eletrônica de varredura (MEV): Região anterior do corpo de um juvenil infectante do gênero *Heterorhabditis* mostrando o dente córneo 18
- Figura 03** – Ciclo de vida detalhado de *Heterorhabditis* sp 19
- Figura 04** – Confirmação da amostra de DNA em gel de agarose 1% 32
- Figura 05** – Relações filogenéticas de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. (UENP n-04) baseadas na análise de regiões ITS do rDNA inferidas pela análise de Máxima Parcimônia (MP). *Oscheius chongmingensis*, *Pellioditis typica* e *Caenorhabditis elegans* foram usados como grupo externo 42
- Figura 06** – Relações filogenéticas de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. (UENP 04) baseadas na análise de regiões 28S-rDNA- D2/D3 LSU do rDNA inferidas pela análise de Neighbor Joining. *Oscheius chongmingensis* e *Caenorhabditis elegans* foram usados como grupo externo 45
- Figura 07** – Espécimes de *Heterorhabditis* sp. UENP-n 04 em microscopia eletrônica de varredura (MEV) 46
- Figura 08** – Produção diária de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. UENP-n 04 em 50 lagartas de *G. mellonella* sob condições controladas (24±1°C e sem fotoperíodo) 49
- Figura 09** – Relações filogenéticas de bactérias simbiotes de *Heterorhabditis mexicana* UENP n-04 baseadas na análise de regiões 16S do rDNA inferidas pela análise de Máxima Parcimônia (MP) Neighbor joining. *Xenorhabdus bovienii* foi usado como grupo externo..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Espécies de nematoides entomopatogênicos do gênero <i>Heterorhabditis</i>	16
Tabela 02 – Morfometria de <i>Heterorhabditis</i> sp. (UENP- n 04). As medidas são em μm na forma: média \pm dp (variação)	39
Tabela 03 – Comparação morfométrica em m de machos de <i>Heterorhabditis</i> sp. UENP- n 04 com outras espécies do gênero <i>Heterorhabditis</i>	40
Tabela 04 – Comparação morfométrica em μm de Juvenil Infectante de <i>Heterorhabditis</i> sp. UENP- n 04 com outras espécies do gênero <i>Heterorhabditis</i>	41
Tabela 05 – Distâncias em pares das regiões ITS do rDNA entre espécies de <i>Heterorhabditis</i>	44
Tabela 06 – Virulência de <i>Heterorhabditis</i> sp. UENP-n 04 aplicados na concentração de 100 JIs/cm ² sob três diferentes insetos	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS.....	14
2.2	GÊNERO <i>HETERORHABDITIS</i>	15
2.2.1	Histórico.....	15
2.2.2	Ciclo de Vida	17
2.2.3	Comportamento de Busca ao Hospedeiro.....	20
2.2.4	Simbiose Nematóide - Bactéria.....	21
2.3	BACTERIAS SIMBIONTES	21
2.3.1	O gênero <i>Photorhabdus</i>	22
2.4	IDENTIFICAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E SEUS SIMBIONTES.	23
2.4.1	Identificação de NEPs	23
3	ARTIGO A: Identificação Molecular e Morfométrica do Nematóide Entomopatogênico <i>Heterorhabditis</i> sp. UENP – n 04 e de seu simbiote, <i>Photorhabdus</i> spp. proveniente de Ribeirão Claro, PR	26
3.1	RESUMO.....	26
3.2	ABSTRACT	27
3.3	INTRODUÇÃO	28
3.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.4.1	Ensaio com o Isolado de Nematóide Entomopatogênico UENP - n04	29
3.4.1.1	Amostragem e processamento das amostras de solo	29
3.4.1.2	Manutenção do isolado de nematóide entomopatogênico	29
3.4.1.3	Estudos de morfologia e morfometria sob microscopia de luz.....	30
3.4.1.4	Microscopia eletrônica de varredura.....	30
3.4.1.5	Identificação molecular.....	31
3.4.1.6	Avaliação de aspectos biológicos do isolado UENP- n04	33
3.4.2	Isolamento e Identificação da Bactéria Simbiote do Isolado UENP – n04	34
3.4.2.1	Isolamento e estocagem	34
3.4.2.2	Caracterização molecular das bactérias	35

3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.5.1	Caracterização Morfométrica.....	37
3.5.2	Caracterização Molecular e Análise Filogenética.....	42
3.5.2.1	Região ITS	42
3.5.2.2	Região 28S – rDNA – D2D3 LSU.....	45
3.5.3	Microscopia Eletronica e Varredura	46
3.5.4	Teste de Patogenicidade e Virulência	47
3.5.5	Produção <i>in vivo</i> do Isolado UENP – n04 em Lagartas de <i>G. mellonella</i>	48
3.5.6	Identificação da Bactéria Simbionte	50
3.6	CONCLUSÃO.....	50

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) exibem uma combinação de atributos que possibilita que eles sejam utilizados como alternativa ao controle químico de insetos (ANDALÓ et al, 2009). Tais atributos tornam os NEPs uma ferramenta promissora em programas de manejo integrado de pragas (MIP), representando uma parte importante dos agentes de controle biológico (GUIDE et al, 2019). De modo geral, a obtenção desses nematoides é feita basicamente por meio de isolamentos a partir de amostras de solo ou insetos infectados, de modo que várias espécies e isolados já foram coletados nos mais diferentes ecossistemas (HOMINICK, 2002; DOLINSKI et al., 2017).

Os principais gêneros destes entomopatógenos são *Heterorhabditis* Poinar e *Steinernema* Travassos. As espécies de ambos os gêneros se associam simbioticamente com as bactérias da família Enterobacteriaceae do gênero *Xenorhabdus*, para *Steinernema*, e *Photorhabdus*, para *Heterorhabditis*, e são estas bactérias as principais responsáveis por ocasionar a morte do inseto (BOEMARE, 2002). Os juvenis infectantes (JIs) dos NEPs carregam as células das bactérias em seu lúmen intestinal (BIRD; AKHURST, 1983; CICHE; ENSIGN, 2003). No ambiente, estes JIs procuram ou esperam insetos hospedeiros suscetíveis e ao encontrar, penetram através de aberturas naturais como boca, ânus e espiráculos. No caso de *Heterorhabditis*, os JIs também podem entrar através do tegumento (WANG; GAUGLER, 1998). Quando alcançam a hemocele, os JIs liberam as bactérias simbiotes, *Xenorhabdus* a partir da defecação (WOUTS, 1991), e *Photorhabdus* a partir da regurgitação (CICHE; ENSIGN, 2003). Assim, as bactérias simbiotes se multiplicam e colonizam o hospedeiro rapidamente, causando septicemia e morte do inseto em 24 e 72 h (VOSS, 2009).

Reconhecidamente, a descoberta de novas espécies ou populações de NEPs e suas bactérias simbiotes pode expandir ou melhorar o uso desses organismos em programas de controle biológico. Além disso, a variabilidade encontrada em espécies nativas de nematoides permite melhor adaptação às condições climáticas e controle mais eficaz da população local de insetos (ANDALÓ et al. 2009; KAMITANI, 2010; GUIDE et al, 2019).

Assim, o objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar, quanto a morfologia e biologia o isolado de NEP UENP n - 04 e sua bactéria simbiote, isolado a partir de amostra de solo coletada no município de Ribeirão Claro, Paraná, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) da ordem Rhabditida são utilizados no controle biológico de diversas espécies de insetos pragas (ANDALÓ et al., 2009; GUIDE et al., 2019), e são comumente descritos como vermes cilíndricos não segmentados (MOLINA; MOINO JR; CAVALCANTI, 2004; VOSS, 2009; FUGA; FERNANDES; LOPES 2012), os quais habitam o solo de diferentes biomas, incluindo áreas agrícolas, gramados, florestas, praias e desertos (GREWAL, 2000).

No que se refere a NEPs, as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae são as mais estudadas atualmente (ALMENARA et al., 2012) incluindo os gêneros *Steinernema* Travassos, 1927 e *Heterorhabditis* Poinar, 1976, respectivamente (FERRAZ et al., 2008). De fato, as espécies destes dois gêneros são utilizadas na América do Norte, Europa, Ásia e Austrália principalmente no controle de pragas de solo ou que passam pelo menos uma fase do seu desenvolvimento nesse ambiente (LEITE et al., 2006; NEGRISOLI et al., 2010).

Um dos fatores determinantes que tornam os NEPs agentes promissores no manejo integrado de pragas (MIP) é a sua associação simbiótica com bactérias específicas para cada gênero. De fato, bactérias do gênero *Xenorhabdus* Thomas & Poinar, 1979 são simbiotes de *Steinernema*, enquanto as do gênero *Photorhabdus* Louis & Kuhl, 1983 se associam com espécies de *Heterorhabditis*. Essas bactérias são as principais responsáveis pela morte do inseto hospedeiro (VOSS, 2009). Quando os NEPs penetram o corpo do inseto, a partir de aberturas naturais, tais como boca, ânus e espiráculos (*Steinernema*) ou boca, ânus, espiráculos e cutícula (*Heterorhabditis*, devido a uma estrutura em forma de dente quitinoso que rasga a cutícula), eles liberam as bactérias na hemocele do inseto (*Steinernema* - defeca, *Heterorhabditis* - regurgita) de modo que estas se multiplicam rapidamente, inibem o crescimento de outros microorganismos com a produção de antibióticos e excretam toxinas que matam o inseto por septicemia entre 24 e 72 horas (FERRAZ, 1998). Burman (1982) ressalta que, apesar das bactérias serem a causa principal da morte dos insetos, os nematoides também produzem toxinas que são letais, porém sem a mesma intensidade de infecção.

A simbiose entre nematoide e bactéria é mutuamente favorável, pois a bactéria proporciona um ambiente ideal para o nematoide se alimentar do inseto e se

reproduzir, e o nematoide por sua vez, garante abrigo, transporte e dispersão da bactéria de um hospedeiro para outro (CLARKE, 2008).

2.2 GÊNERO *HETERORHABDITIS*

2.2.1 Histórico

De acordo com Poinar (1983), os NEPs possivelmente originaram-se no período pré-Paleozóico (cerca de 375 milhões de anos), sendo que os os os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*) possuem histórias evolutivas independentes, as quais convergiram para este nicho ecológico nos tempos atuais. De acordo com a classificação em clados propostos por Blaxter et al. (1998), o gênero *Heterorhabditis* pertence ao clado V (Rhabditida), que inclui também o nematoide-modelo *Caenorhabditis elegans*, além de espécies parasitas de vertebrados, tais como aquelas dos gêneros *Ancylostoma* e *Haemonchus*.

A espécie *Rhabditis hambletoni* Pereira, 1937 (PEREIRA, 1937) pode ter sido a primeira espécie de *Heterorhabditis* a ser descrita, embora seja considerada uma espécie *inquirenda*. No entanto, a primeira descrição definitiva ocorreu quando Poinar (1976) propôs a descrição de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976. A família Heterorhabditidae Poinar, 1976 foi proposta por Poinar (1976) ao mesmo tempo em que descreveu o gênero tipo, *Heterorhabditis*. De fato, acredita-se que o gênero *Heterorhabditis* tenha evoluído a partir de um ancestral que habitava sedimentos marinhos, enquanto o gênero *Steinernema* possuiria um ancestral terrestre (POINAR, 1993) fato este, que reflete em diferenças biológicas entre os dois gêneros (ALMENARA et al., 2012). Em termos de distribuição geográfica, ambos os gêneros são cosmopolitase há registros de NEPs em solos de seis diferentes biomas mundiais (Neoártico, Neotropical, Paleoártico, Etíope, Oriental e Australiano) (LAWRENCE et al., 2006). Ao mesmo tempo, estudos demonstram uma maior abundância de heterorhabditídeos em solos tropicais e subtropicais (POPIEL; HOMINICK, 1992; LAWRENCE et al., 2006).

Até o momento, 16 espécies de *Heterorhabditis* foram descritas (Tabela 01), um número bastante pequeno quando comparado às 95 espécies de *Steinernema* (HUNT; SUBBOTIN, 2016). No Brasil, 27 isolados de *Heterorhabditis* foram encontrados, pertencentes às espécies *H. amazonensis* Andaló et al., 2006, *H. indica* Poinar et al., 1992, *H. baujardi* Phan et al., 2003 e *H. bacteriophora* Poinar, 1976 (DOLINSKI et al., 2017).

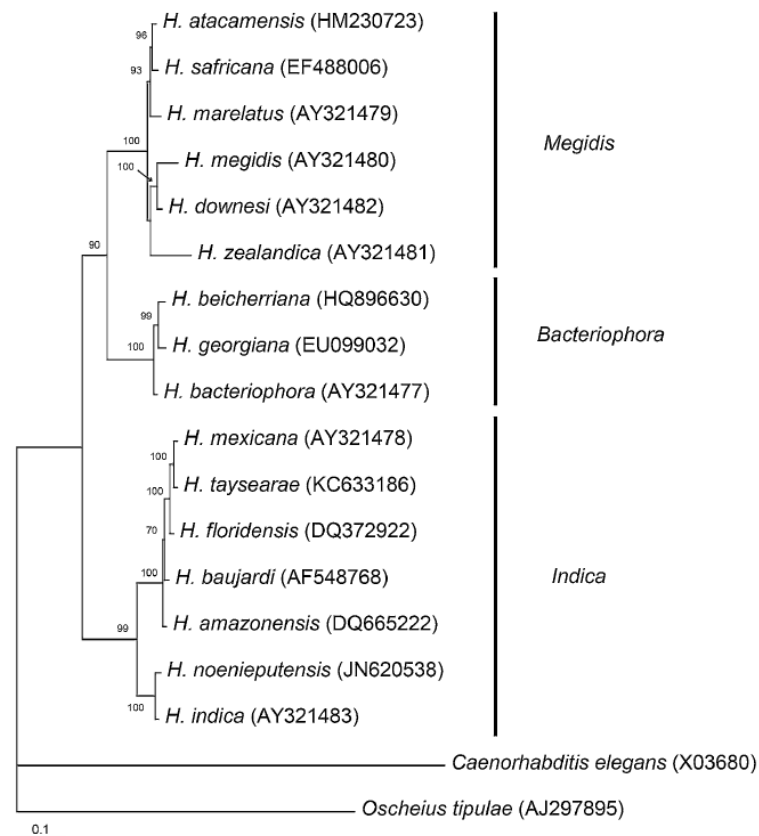
Tabela 01. Espécies de nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis*.

Espécie	Referência
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Poinar, 1976.
<i>H. amazonenses</i>	Andaló, Nguyen & Moino, 2007.
<i>H. atacamensis</i>	Edgington, Buddie, Moore, France, Merino & Hunt, 2011.
<i>H. baujardi</i>	Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, 2003.
<i>H. beicherriana</i>	Li, Liu, Nermut', Puža & Mráček, 2012.
<i>H. downesi</i>	Stock, Griffin & Burnell, 2002.
<i>H. floridensis</i>	Nguyen, Gozel, Koppenhöfer & Adams, 2006.
<i>H. georgiana</i>	Nguyen, Shapiro-Ilan & Mbata, 2008.
<i>H. indica</i>	Poinar, Karunakar & David, 1992.
<i>H. marelatus</i>	Liu & Berry, 1996.
<i>H. megidis</i>	Poinar, Jackson & Klein, 1987.
<i>H. mexicana</i>	Nguyen, Shapiro-Ilan, Stuart, McCoy, James & Adams, 2004.
<i>H. noenieputensis</i>	Malan, Knoetze & Tiedt, 2014.
<i>H. safricana</i>	Malan, Nguyen, De Waal & Tiedt, 2008.
<i>H. taysearae</i>	Shamseldean, Abou El-Sooud, Abd-Elgawad & Saleh, 1996.
<i>H. zealandica</i>	Poinar, 1990.

Fonte: (HUNT; SUBBOTIN, 2016. p. 38-39).

Os heterorhabditídeos são comumente divididos em três clados filogenéticos: i) o clado bacteriophora, que inclui *H. bacteriophora*, *H. georgiana* e *H. beicherriana*; ii) o clado megidis, que inclui *H. atacamensis*, *H. downesi*, *H. megidis*, *H. marelatus*, *H. safricana* e *H. zealandica*; e iii) o clado indica, que inclui *H. amazonensis*, *H. baujardi*, *H. floridensis*, *H. indica*, *H. mexicana*, *H. noenieputensis* e *H. taysearae* (NGUYEN et al., 2008; SPIRIDONOV; SUBBOTIN, 2016) (Figura 01).

Figura 01. Relações filogenéticas dentro do gênero *Heterorhabditis* como inferido a partir de análises Bayesianas de sequências de trechos ITS do gene de rRNA usando o GTR + Modelo I + G de evolução do DNA. Os valores de probabilidade posterior superiores a 70% são dados em clados apropriados.



Fonte: SPIRIDONOV e SUBBOTIN (2016).

As espécies que compõem o grupo *indica* formam um clado bem estruturado, subdividido em i) 'Indica' com *H. indica* (= *H. brevicaudis*, *H. gerrardi*, *H. hawaiiensis*) e *H. noenieputensis*; e ii) 'Baujardi' com *H. amazonensis*, *H. baujardi* (= *H. somsookae*), *H. floridensis*, *H. taysarae* (= *H. sonorensis*) e *H. mexicana*. Em geral, espécies do grupo *indica* são encontradas nos trópicos e regiões subtropicais ou em regiões de zona temperatura quente (SPIRIDONOV e SUBBOTIN, 2016).

2.2.2 Ciclo de Vida

Os NEPs possuem três estágios de desenvolvimento (ovo, juvenil e adulto) e a fase juvenil possui quatro estágios (J1, J2, J3, J4) (LEWIS et al., 2006). Quando estão no solo, os NEPs são encontrados na fase de juvenis infectantes (JIs) ou J3, forma responsável pela busca e infecção do inseto. Nesta fase o nematoide não se alimenta e resiste as intempéries climáticas por possuir duas cutículas (GLAZER, 2002).

O ciclo de *Heterorhabditis* inicia-se após a penetração no inseto, o que ocorre principalmente através das aberturas naturais como boca, ânus e espiráculos. Ainda para os heterorhabditídeos, a penetração pode ocorrer via cutícula, uma vez que estes apresentam um dente córneo (Figura 01) na região da cabeça que permite aos JIs perfurarem a cutícula do inseto, especialmente nas regiões mais finas e flexíveis, como entre os segmentos apendiculares (FORST; CLARKE, 2002).

Assim que penetram no inseto (Figura 02), os JIs assumem o último estágio juvenil (J4) e põem fim, adultos de primeira geração. No caso de *Heterorhabditis*, os adultos de primeira geração são hermafroditas com morfologia de fêmeas (POINAR, 1990). Dessa forma, a infecção (morte) de um inseto por *Heterorhabditis* pode ter sucesso mesmo quando há penetração de um único JI, visto que não há necessidade de cópula entre adultos de primeira geração para a produção de ovos fertilizados (ALMENARA et al., 2012) (Figura 03).

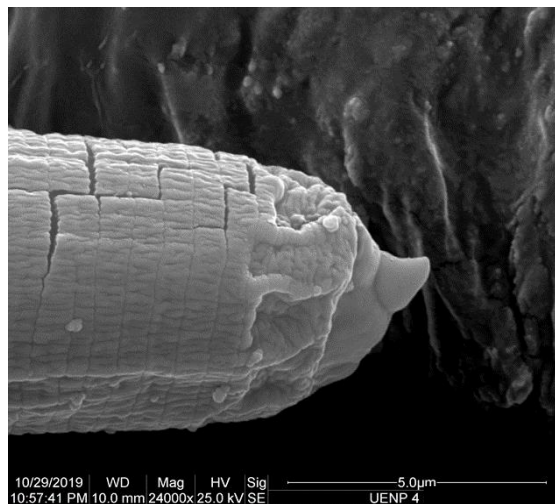


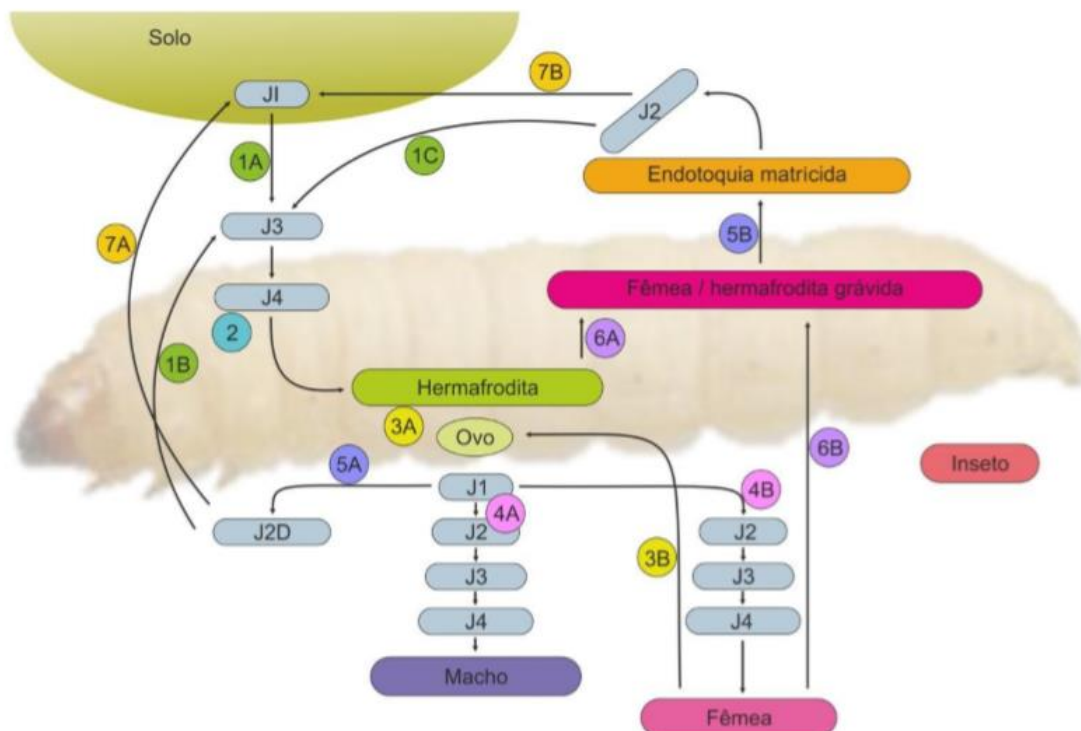
Figura 02. Microscopia eletrônica de varredura (MEV): Região anterior do corpo de um juvenil infectante do gênero *Heterorhabditis* mostrando o dente córneo.

Fonte: próprio autor.

No ciclo de *Heterorhabditis* há também predominância do fenômeno de Endotoquia Matricida, a qual compreende a eclosão dos ovos do nematoide ainda dentro da mãe. Os juvenis recém-emergidos se alimentam dos tecidos da mãe, ocasionando sua morte, de modo que entram em contato com as células da bactéria enquanto se alimentam. As bactérias atravessam as células intestinais do corpo da fêmea e ficam disponíveis para os juvenis recém-eclodidos. Desse modo, pode-se dizer que o fenômeno da endotoquia matricida é responsável por garantir que somente as bactérias simbiotes sejam transferidas para a prole

(CICHE et al., 2008). Nas gerações seguintes, a proliferação exclusiva da bactéria simbiote é controlada pela secreção de toxinas e metabólitos secundários (ALMENARA, 2010; BOEMARE; AKHURST, 2006).

Figura 03. Ciclo de vida detalhado de *Heterorhabditis* sp. Os números abaixo correspondem a passos-chave do ciclo indicados na Figura. 1: Recuperação do Juvenil Infectante (JI) a partir do estágio de



vida livre (1A); estágio de pré-dauer (J2d) que se originam de ovos postos (1B) ou da endotoquia matricida (1C); 2: Desenvolvimento da hermafrodita; 3: Postura de ovos pela hermafrodita autofecundada (3A) ou da fêmea fecundada por macho (3B); 4: Desenvolvimento do macho (4A) e da fêmea (4B). 5: Formação do JI a partir de ovos (5A) ou da endotoquia matricida (5B); 6: Endotoquia matricida da hermafrodita (6A) ou da fêmea (6B); 7: Migração do JI originário de ovos (7A) ou de endotoquia matricida (7B).

Fonte: (Almenara et al., 2012, p. 11 adaptado de Ehlers, 2001).

Podem ocorrer de duas a três gerações no interior do inseto e, quando se esgotam as reservas de alimento, os nematoides passam para o estágio de JIs, deixam o corpo do inseto e retornam para o ambiente em busca de novos hospedeiros (GREWAL et al., 2001).

Antes de deixarem o corpo do inseto, no estágio J2, os nematoides do gênero *Heterorhabditis*, armazenam as bactérias na região anterior do intestino, deixando-as

livres no lumên (ADAMS; NGUYEN, 2002). A maioria das espécies de *Heterorhabditis*, apresentam um ciclo de vida que varia de 7 a 10 e 12 a 15 dias respectivamente, da infecção à emergência dos JIs em temperatura ambiente (EHLERS, 2001).

2.2.3 Comportamento de Busca ao Hospedeiro

Outro fator que diferencia os NEPs de outros agentes de controle microbiano é a capacidade de ir em busca do hospedeiro. Existem dois tipos de comportamento de busca, os quais variam de espécie para espécie e são classificados como “ambusher” (emboscada) ou “cruiser” (busca) (LEWIS; GAUGLER; HARRISON, 1992).

As espécies “ambusher” apresentam o comportamento de nictação, no qual fixam a cauda em um substrato que sustenta o corpo ereto e aguardam a aproximação do inseto e, ao perceber a presença, salta em sua direção (LEWIS et al., 2006). A espécie *Steinernema carpocapsae* é um exemplo de indivíduo ambusher (LEWIS; GAUGLER; HARRISON, 1992).

NEPs com o comportamento “cruiser” são atraídos pela liberação de substâncias voláteis através das atividades metabólicas do inseto como a respiração, que libera diferentes teores de CO₂ e em resposta aos fatores químico-atraentes, o nematoide desloca-se em busca do inseto. *Heterorhabditis bacteriophora* é um exemplo de espécie com comportamento cruiser (KAYA; GAUGLER, 1993).

Algumas espécies podem intercalar a nictação com a busca ativa pelo hospedeiro, dependendo da proximidade em que se encontra, este comportamento é classificado como intermediário. *Steinernema feltiae* utiliza deste método (GREWAL; SELVAN; GAUGLER, 1994).

Conhecer a estratégia de busca das espécies de NEPs é de suma importância para sua utilização como agente de controle, visto que o sucesso no controle vai depender principalmente do encontro do nematoide pelo inseto. Desta forma, NEPs com hábito “cruiser” apresentam maior probabilidade de sucesso no controle de insetos praga com comportamento sésil ou críptico, ou seja, que se locomovem pouco e lentamente abaixo da superfície do solo, como cochonilhas-das-raízes e insetos que empupam no solo. Já os que possuem a estratégia “ambusher” são mais recomendados no controle de insetos ativos, com alta mobilidade principalmente na parte superficial do solo (LEWIS et al., 2006).

2.2.4 Simbiose Nematóide-Bactéria

Existem muitos exemplos de relações mutualistas entre bactérias e organismos eucariotos na natureza. Estudos sobre essas ocorrências naturais de simbiose demonstram uma grande complexidade, envolvendo diferentes sinais e vias moleculares bastante reguladas e especializadas.

Os NEPs, como já mencionado anteriormente, apresentam um tipo de simbiose bastante específica: os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* se associam, exclusivamente, com bactérias dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, respectivamente. Esta é uma associação não-obrigatória, visto que, tanto *Photorhabdus* quanto *Xenorhabdus* podem ser cultivadas livres do nematóide, em condições laboratoriais adaptadas dos meios tradicionais de cultivo de enterobactérias (ALMENARA et al., 2012).

O complexo *Heterorhabditis-Photorhabdus* é bastante restritivo, pois, uma espécie de nematóide terá como simbiote sempre e somente uma única linhagem daquela espécie de bactéria, diferente de *Steinernema-Xenorhabdus*, na qual a especificidade é menor e diferentes espécies de nematóide podem apresentar a mesma espécie de bactéria simbiote (FORST; CLARKE, 2002).

O complexo nematóide-bactéria é muito virulento para insetos, fazendo destes organismos uma alternativa não química no controle de insetos-praga a nível mundial (OROZCO et al., 2013). Dessa forma, conhecer as especificidades apresentadas pelas espécies tanto de nematoides como das suas bactérias simbiotes são de grande importância na determinação destes como agentes para o controle de pragas.

Esta simbiose possui vantagens para ambos, pois assim que são liberadas no inseto, as bactérias colonizam seus tecidos, mas mantêm o tubo digestivo dos mesmos intacto, de modo a evitar a contaminação por outras bactérias ali presentes. Esses nematoides alimentam-se dos nutrientes liberados na digestão dos tecidos do inseto e também das próprias bactérias que proliferam no cadáver do inseto (ALMENARA et al, 2010).

2.3 BACTÉRIAS SIMBIOTES

As bactérias simbiotes são pleomórficas, o que significa que apresentam formas diferentes da colônia e variação entre fases, de FI (forma primária ou ativa) para FII

(forma secundária ou inativa). Estas duas fases podem ser diferenciadas em vários aspectos, incluindo a virulência sobre insetos e até mesmo a associação com os NEPs (GIVAUDAN; LANOIS, 2000; OROZCO, 2014).

Na fase FI as bactérias apresentam flagelos peritricos que lhes proporcionam mobilidade, produzem uma ampla variedade de toxinas importantes no processo de infecção e morte do inseto; enzimas hidrolíticas como lipases, fosfolipases e proteases, que são secretadas na hemolinfa e estão envolvidas na colonização e decomposição dos tecidos dos insetos, para assim serem utilizados como alimento pelos nematoides (ADAM et al., 2006) e antibióticos que irão inibir o crescimento de microorganismos oportunistas (FORST et al., 1997; OROZCO et al., 2013). A bactéria em fase II não possui flagelos, pode ser cultivada *in vitro* por longo tempo e, embora apresente ação inseticida, é menos efetiva. Por outro lado, produz antibióticos assim como em FI (BOEMARE; AKHURST, 1988).

A capacidade das bactérias (*Photorhabdus* e *Xenorhabdus*) em causar a morte dos insetos está relacionada principalmente à inibição das reações de defesa do sistema imunológico dos mesmos (DOWDS; PETERS, 2002). Sabe-se que as reações de defesa são promovidas por hemócitos (GOMES, 2002) que encapsulam os NEPs, isolando-os do resto das células do organismo. Logo em seguida, os granulócitos promovem a fagocitose, que é favorecida pelo composto Fenol-Oxidase (PO). Este faz parte do sistema imune do inseto, e é essencial aos nematoides pois indicam o momento adequado para seu desenvolvimento no interior do inseto (JOYCE et al., 2008).

Quando os JIs penetram no corpo do inseto e liberam as bactérias, elas reconhecem o L-Proline (aminoácido não essencial) presente na hemolinfa do inseto que pode induzir ou regular a mudança metabólica das bactérias, e, a partir daí estas passam a produzir toxinas e antibióticos (CRAWFORD et al., 2010).

2.3.1 O gênero *Photorhabdus*

Segundo Almenara et al. (2012b) estudos relacionados aos diferentes sistemas de interação bactéria-hospedeiro, levaram à descrição de diversos mecanismos e vias responsáveis pela manutenção dessa relação e à descoberta de várias moléculas envolvidas na patogenicidade, virulência e controle da resposta imune do inseto. E o gênero de bactéria, *Photorhabdus*, se destaca como modelo para estudos de relações bactéria-hospedeiro (CLARKE, 2008).

A maioria das espécies do gênero *Photorhabdus* são bioluminescentes e, embora esta característica não seja obrigatória, essa propriedade se dá, devido à presença de todos os genes do *operon lux*, codificadores de uma luciferase, semelhante ao que ocorre nos microorganismos marinhos bioluminescentes (PARACER; AHMADJIAN, 2000).

As bactérias são anaeróbicas facultativas, se locomovem por flagelos do tipo peritríquios como já citado e não produzem esporos (BRENNER, 1999; ADAM et al, 2006). Existem quatro espécies pertencentes a este gênero: *Photorhabdus luminescens*, *P. temperata*, *P. asymbiotica* e *P. heterorhabditis*, todas especificamente simbioses de nematoides, exceto *P. asymbiotica* que já foi isolada de feridas em pele humana nos EUA e Austrália (GERRARD et al, 2004; KUSHWAH et al, 2016).

Espécies de *Photorhabdus* podem ser mantidas em laboratório, dissociadas do nematoide entomopatogênicos (ALMENARA, 2010). Estas bactérias ao entrarem na fase estacionária de sua curva de crescimento, secretam ativamente diversos produtos para o meio de cultura, incluindo lipases, fosfolipases, proteases e antibióticos (FORST et al, 1997).

Heterorhabditis bacteriophora e sua bactéria simbiote *Photorhabdus luminescens* são as espécies entomopatogênicas mais estudadas. No Brasil, algumas linhagens de nematoides entomopatogênicos de outras espécies, *Heterorhabditis baujardi*, *Heterorhabditis indica*, *H. amazonensis* (DOLINSKI et al, 2008, 2017; ANDALÓ, 2006), já foram isoladas e são mantidas em laboratório, juntamente com as linhagens de bactérias simbioses correspondentes.

2.4 IDENTIFICAÇÃO DE NEPS E SEUS SIMBIOTES

2.4.1 Identificação de NEPs

A demanda por alternativas biológicas para o controle de insetos praga propiciaram o aumento na identificação de novas espécies de nematoides entomopatogênicos com potencial de uso para o controle biológico (ANDALÓ, 2010; MALAN et al., 2008). A identificação de NEPs pode ser realizada utilizando-se critérios morfológicos e morfométricos, por meio de microscopia óptica ou microscopia eletrônica de varredura, os quais também podem ser combinadas com o uso de técnicas moleculares. Estudos morfológicos e/ou morfométricos baseiam-se na identificação a partir da medição de

estruturas do nematoide, que podem ser comparadas com chaves taxonômicas, identificando-se gêneros e espécies (ADAMS; NGUYEN, 2002).

Para observação de NEPs em microscópio óptico de luz é necessária a fixação destes. Neste processo, os NEPs são colocados em solução de Ringer a 60 °C por dois minutos, em seguida, são transferidos para o fixador TAF, para fazer as lâminas semi-permanentes. Com estas lâminas é possível observar caracteres morfológicos dos JIs, dos machos e também das fêmeas (ANDALÓ, 2010; KAYA; STOCK, 1997).

Na microscopia eletrônica de varredura, adultos (machos e fêmeas) e JIs são fixados em solução de glutaraldeído 3% com 0,1 M de cacodilato de sódio, pH 7,2 por 24 horas a 8 °C. Posteriormente, os nematoides são pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% por 12 horas à temperatura de 25 °C, desidratados em etanol, obtendo-se o ponto crítico com CO₂ líquido. Finalmente, são montados em suportes e cobertos com ouro (ANDALÓ, 2010; NGUYEN; SMART, 1995). As imagens obtidas quando se utiliza o microscópio eletrônico de varredura possibilitam uma visualização mais detalhada das estruturas externas do corpo do nematoide, o que auxilia na comparação e diferenciação entre esses organismos (ANDALÓ, 2010).

Atualmente, com o advento do uso de técnicas moleculares, têm sido possível identificar isolados ou mesmo novas espécies com maior precisão. Entre estas abordagens moleculares, as principais incluem a amplificação de trechos específicos do DNA via PCR (*Polymerase chain reaction*), como determinadas regiões do DNA ribossomal, que consiste em uma única cópia do DNA com sequencias repetidas, o que leva a ter informações essenciais para investigação molecular (GRENIER et al., 1997; LIU et al., 2000). No caso de NEPs, os principais trechos de DNA utilizado para a identificação molecular incluem regiões do DNAr que são mais conservadas (18S e 5.8S) e um pouco menos conservadas (26S) com regiões espaçadoras entre elas, chamados de ITS (*Internal Transcribed Spacer*) 1 e 2, que são mais variáveis e utilizadas para analisar e comparar espécies mais distantes (NASMITH et al., 1996).

Alguns estudos argumentam que a análise de partes da região 18S do gene de DNAr é ineficiente no estudo filogenético de NEPs, uma vez que este segmento parece ser demasiadamente conservado dentro dos grupos. Ao mesmo tempo, análises de outras regiões do gene de DNAr, especialmente as regiões ITS e o trecho D2-D3 no segmento 28S, mostram-se mais eficientes para a resolução de análises entre espécies (SPIRIDONOV; SUBBOTIN, 2016).

Holtermann (2006) afirma que o sinal filogenético nas sequências de DNAr permite que a filogenia dos nematoides seja reconstruída, permitindo a identificação até nível de espécie. A região ITS1 dos genes ribossômicos do gênero *Heterorhabditis* foi sugerida por Adams et al. (1998) como uma fonte confiável de caracteres ortólogos (genes iguais em diferentes organismos, possuem uma origem homóloga e funções similares), para estabelecimento de relações de parentesco entre *taxa* próximos, mas assegura que esta região torna-se fonte menos confiável à medida que as linhagens são mais divergentes.

O primeiro passo para a identificação molecular é a extração de DNA. O DNA pode ser extraído a partir de uma fêmea hermafrodita ou dos JIs, de acordo com a metodologia descrita por Nguyen et al. (2001). Em geral, para estudos visando a identificação de espécies, deve-se utilizar a extração a partir de JIs, enquanto que para estudos visando estudos de populações de uma mesma espécie, utiliza-se a extração a partir de fêmea hermafrodita. Em seguida é feita a amplificação de PCR utilizando-se “primers” específicos. Após a amplificação, é feito o sequenciamento e por último são realizadas as análises filogenéticas (ANDALÓ, 2010; NGUYEN et al., 2004).

Para a identificação molecular das bactérias simbiotes, também se utiliza o gene de DNA ribossômico como região válida (KAMITANI, 2010). Szállas et al. (1997) analisaram sequências de RNAr 16S de aproximadamente 40 linhagens de *Photorhabdus luminescens* e mostraram que existem inúmeras genoespécies dentro da espécie, porém não ficou definido as afinidades fisiológicas entre elas. O genoma de *Photorhabdus luminescens* possui sete genes RNAr 16S, evoluindo em conjunto, tornando-se um excelente alvo para análises de linhagem (ADAMS et al. 2006; LIU; BERRY; BLOUIN, 2001).

3 ARTIGO A: Identificação molecular e morfométrica do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis* sp. UENP n-04 e de seu simbiote, *Photorhabdus* spp., proveniente de Ribeiro Claro, PR.

3.1 RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae são parasitas obrigatórios de insetos, podendo ser utilizados no controle de insetos-praga. No Brasil, ainda são poucas as espécies conhecidas, o que é reflexo da escassez de estudos relacionados a caracterização e identificação destes entomopatógenos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi identificar um isolado de nematoide e seu simbiote, coletado a partir de uma amostra de solo pelo método de “inseto-isca”, utilizando lagartas de *Galleria mellonella*, em área de cultivo orgânico localizada no município de Ribeirão Claro, Paraná, Brasil. Para a identificação do nematoide foram realizados estudos de morfometria e análises moleculares a partir do sequenciamento de das regiões ITS e D2/D3 do gene de RNA ribossomal. No caso da bactéria simbiote, a identificação molecular foi conduzida a partir do sequenciamento de parte do gene de RNA ribossomal 16S. As análises morfológicas apontaram diferenças em termos de morfometria em comparação com as espécies do grupo monofilético formado. A sequência obtida a partir da região ITS apresentou 98,10% de similaridade com *H. mexicana* (EF043444), sugerindo que o isolado UENPn-04 possa pertencer a esta espécie. Ao mesmo tempo, a sequência de parte da região D2/D3 mostrou 100% de similaridade à sequência de referência de *H. mexicana* (EU100414.1). Foi possível observar também, que *Heterorhabditis* sp. UENP n-04 apresentou patogenicidade aos três hospedeiros avaliados: *G. mellonella*, *Tenebrio molitor* e *Dichelops melacanthus*. Ainda, foi possível verificar que a sua produção *in vivo* ocorreu ao longo de sete dias, e que a produção final foi de $8,9 \times 10^6$ JIs (8.902.160 JIs). Com relação a identificação molecular da bactéria simbiote, concluiu-se que a mesma pode pertencer a espécie *Photorhabdus asymbiotica*.

Palavras-chave: Taxonomia, associação simbiótica, Controle biológico, Controle microbiano

3.2 ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (NEPs) from the families Heterorhabditidae and Steinernematidae are mandatory insect parasites that can be used to control pest insects. In Brazil, there are still few known species, due to the lack of studies related to the characterization and identification of these entomopathogens. In this sense, the objective of this work was to identify a nematode isolate and its symbiont, collected from a soil sample using the “insect-bait” method, using caterpillars of *Galleria mellonella*, in an organic cultivation area located in the municipality of Ribeirão Of course, Paraná, Brazil. For the identification of the nematode, studies of morphometry and molecular identification were carried out from the amplification of the ITS and D2/D3 regions. For the molecular identification of the symbiont, partial sequencing of the 16S rDNA was used. The morphological analyzes showed differences in terms of morphometry compared to the species of the monophyletic group formed. It was observed that the sequence obtained from the ITS region shows 98.10% similarity with *H. mexicana* (EF043444), which did not allow the safe identification of the UENP-n 04 isolate as belonging to this species. On the other hand, the molecular data obtained from the D2 / D3 region demonstrated that the sequence obtained for the UENP n-04 isolate shows 100% similarity to the reference sequence of *H. mexicana* (EU100414.1). It was also possible to observe that *Heterorhabditis* sp. UENP n-04 showed pathogenicity to the three hosts evaluated: *G. mellonella*, *Tenebrio molitor* and *Dichelops melacanthus*. It was also possible to verify that its *in vivo* production occurred over seven days, and that the final production was 8.9×10^6 JIs (8.902.160 JIs). Regarding the molecular identification of the symbiont bacteria, it was concluded that it may belong to the species *Photorhabdus asymbiotica*.

Keywords: Taxonomy, symbiotic association, Biological control, Microbial control.

3.3 INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são agentes promissores no controle biológico de insetos praga que vivem no solo ou que possuam hábito críptico (LEWIS, 2006; ALVES et al., 2009; GUIDE et al., 2016). As espécies de NEPs do gênero *Steinernema* se associam a bactérias do gênero *Xenorhabdus*, enquanto que as espécies de NEPs do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) se associam com bactérias do gênero *Photorhabdus*, de modo que ambos os microorganismos são mantidos no lúmen intestinal do terceiro estágio juvenil dos nematoides, conhecido também como juvenil infectante (JI) (OROZCO et al., 2013). No que se refere ao gênero *Photorhabdus*, este é composto por quatro espécies, incluindo *P. asymbiotica*, *P. luminescens*, *P. heterorhabditis* e *P. temperata*, todas simbiotes de nematoides (KUSHWAH et al., 2016). Essas bactérias se caracterizam por serem Gram-negativas, apresentando respiração anaeróbica facultativa, locomoção por flagelo do tipo peritríquios e ausência de esporos (BRENNER, 1999; ADAM et al., 2006). Os NEPs podem ser obtidos por meio de isolamentos realizados a partir de amostras de solo ou de insetos infectados (HOMINICK, 2002). Após o isolamento, diferentes abordagens, incluindo medidas morfológicas e técnicas moleculares, podem então ser aplicadas, possibilitando a identificação de novas espécies ou isolados ainda não conhecidos (ALBERTS, 1994).

No Brasil, 27 isolados *Heterorhabditis* foram encontrados, pertencentes às espécies *H. amazonensis* Andaló et al., 2006, *H. indica* Poinar et al., 1992, *H. baujardi* Dolinski et al., 2008 e *H. bacteriophora* Poinar, 1975 (DOLINSKI et al., 2017). Recentemente, em um trabalho realizado por Macedo (2020), um isolado mostrou-se muito próximo de *Heterorhabditis mexicana*, mas os resultados não foram conclusivos e novas análises precisam ser realizadas para confirmação da espécie.

O primeiro isolamento de *H. mexicana* foi conduzido a partir do método inseto-armadilha ou inseto-isca (BEDDING; AKHURST, 1975) em amostras de solo, as quais foram coletadas em um campo de sorgo na região norte do estado de Tamaulipas, México. Posteriormente, Nguyen et al. (2004) realizaram a descrição desta espécie a partir de análises morfológicas e moleculares. De fato, a descoberta de novas espécies ou populações de NEPs pode expandir ou melhorar o uso desses organismos em programas de controle biológico. Além disso, a variabilidade encontrada em espécies nativas de nematoides permite melhor adaptação às condições climáticas e controle mais eficaz da população local de insetos

(DOLINSKI; MOINO JUNIOR, 2006; ANDALÓ et al. 2009c; GUIDE et al. 2019).

Assim, o objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar o isolado UENP-n04 (obtido a partir de amostra de solo no município de Ribeirão Claro, Paraná, Brasil) utilizando técnicas moleculares e morfológicas, bem como identificar sua bactéria simbiote.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Ensaio com o isolado de Nematóide Entomopatogênico UENP n-04

3.4.1.1 Amostragem e Processamento da Amostra de Solo

O isolado UENPn-04 foi obtido a partir de amostras de solo em um sistema de cultivo orgânico na cidade de Ribeirão Claro, no estado do Paraná, Brasil. Para tanto, extraiu-se uma amostra de solo a uma profundidade entre 15-20 cm com auxílio de uma pá ou trado, coletando aproximadamente 500g de solo, que em seguida foi armazenado em saco plástico identificado com as seguintes informações: data e local de coleta, textura do solo e cultura/vegetação associada (ANDALÓ et al., 2009; MOLINA et al., 2005). A amostra recolhida foi mantida em caixa térmica (10 a 15 °C) durante o transporte do local de coleta até o laboratório.

Para isolamento do nematóide, lagartas de último instar de *G. mellonella* foram usadas como “inseto-isca” seguindo a metodologia de Bedding e Akhurst (1975), e após 72 horas, as lagartas mortas e com sintomas de infecção foram lavadas com hipoclorito a 2% e depois em água destilada, transferidas para câmara seca (placa de Petri de 9 cm Ø com um papel de filtro) e mantidas por mais cinco dias em câmara climatizada a 25±1°C e sem fotoperíodo e, após esse período, foram colocadas em armadilha de White (WHITE, 1927) para emergência e coleta dos JIs.

3.4.1.2 Manutenção do isolado de nematóide entomopatogênico

O isolado, previamente identificado como pertencente ao gênero *Heterorhabditis* sp., isolado UENP-n04, foi mantido em suspensão aquosa. Quando necessário, este foi multiplicado *in vivo* usando lagartas de último instar de *G. mellonella* de acordo com Molina e Lopes (2001). Desta forma, o isolado foi aplicado sobre dez lagartas na

concentração de 100JI/cm² em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, com dois papéis filtro. As placas foram mantidas em câmara climatizada a 23±1°C e sem fotoperíodo por dez dias. Posteriormente, as lagartas mortas foram colocadas em armadilhas de White (WHITE, 1927) para emergência dos JIs. Os JIs foram coletados suspensos em água destilada e armazenados em frascos para cultura de células de 50 mL a 18° C durante três dias, até serem utilizados nos bioensaios.

3.4.1.3 Estudos de Morfologia e Morfometria sob Microscopia de Luz

Para os estudos morfológicos, o nematoide foi multiplicado *in vivo* em lagartas de *G. mellonella*, para obtenção das diferentes fases de vida do nematoide (fêmeas hermafroditas, machos e fêmeas de segunda geração, juvenis infectantes).

As fêmeas de primeira geração (hermafroditas) foram obtidas por meio da dissecação das lagartas infectadas, 5-6 dias após a morte das lagartas. Machos e fêmeas de segunda geração (anfimíticas) foram obtidos após 8-9 dias. Os juvenis de terceiro estágio (J3) ou JIs foram coletados após a emergência destes dos cadáveres das lagartas.

Para os estudos de morfologia foi utilizado o método de medição sob microscópio óptico com câmara clara aclopada. Para tanto, 25 espécimes dos diferentes estágios (hermafroditas, fêmeas, machos, JIs) foram observados. Com exceção dos JIs, os demais estágios foram mortos e fixados em TAF (COURTENY et al., 1955) ou lactofenol (FRANKLIN; GOODEY, 1949) no caso das fêmeas, a fim de que estruturas morfológicas como esôfago, anel nervoso e poro excretor fossem melhor observadas. Os espécimes fixados foram montados em suportes para lamínula para evitar o achatamento dos nematoides (ANDALÓ et al., 2006a). As lâminas e os nematoides foram observados utilizando o microscópio de luz (Olympus CH30, objetivas de 4x, 10x e 40x).

3.4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório de Microscopia da Universidade Estadual de Londrina. Para esse processo, adultos e JIs foram fixados em glutaraldeído a 3%, tamponado com 0,1 M de cacodilato de sódio, pH 7,2 durante 24 horas a 8°C. Em seguida, os nematoides foram pós-fixados com solução de tetróxido de ósmio a 2% por 12 horas a 25°C, desidratados em séries de etanol, obtendo-se o ponto crítico

com CO₂ líquido. Posteriormente, os NEPs foram montados em suportes para microscopia e revestidos com ouro (ANDALÓ et al., 2006a; NGUYEN et al., 2010).

3.4.1.5 Identificação molecular

Para a análise molecular do isolado UENPn-04, o DNA foi extraído de juvenis infectantes utilizando o Kit comercial “Pure Link” da Invitrogen®, seguindo o protocolo do fabricante. A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria utilizando equipamento fluorômetro Qubit e posteriormente a amostra foi diluída para 5ng/μL.

Amplificação das regiões ITS1e LSU

Para esta análise, parte do gene de RNA ribossomal (RNAr), incluindo as regiões ITS (Internal Transcribed Spacer Region), foi amplificada via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do par de *primers* (iniciadores): Forward 5'-GGGCAAAGTCGTAACAAGG-3' e Reverse 5'-GCGGGTAGTCACGACTGAG-3', o qual foi identificado e construído pelo próprio grupo de pesquisa para os isolados UENP. Adicionalmente, outro trecho do gene de RNAr, a região 28S-rDNA- D2/D3 LSU (Large Subunit) relatada por Nguyen et al. (2007), também foi amplificado e analisado a partir dos *primers*: 502'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGC-3' e 503-5'-CCTTGGTCCGTGTTTCAAGACG-3'.

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 15μL, incluindo 7,5μL de *Go Taq Master Mix* (DNA Polimerase+dNTP+Tampão para pH), 0,5μL de *Primer F*, 0,5μL de *Primer R*, 3,5μL de água e 3μL do DNA extraído. As condições de amplificação no termociclador (modelo MJ96+/MJ96G Peltier Thermal Cycler da marca Biorcycler Termocicladores), incluíram: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por um minuto, e por fim, uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos.

Confirmação da Amplificação em Gel de Agarose 1%

Ao fim do processo de PCR, uma alíquota da amostra foi retirada e

submetida a eletroforese em gel de agarose para confirmar a amplificação do DNA alvo.

O gel foi preparado de acordo com a indicação do fabricante (250mL de TEB 0,5x e 2,5g de agarose) e após solidificação, o gel foi conduzido para uma cuba de eletroforese. A amostra (5 μ L do produto de PCR) foi então posicionada em um poço, enquanto, em outro poço adicionou-se uma amostra de marcador de peso molecular 100pb. Em seguida, a cuba foi fechada e submetida a uma corrente elétrica de 100V por 40 minutos, para que os fragmentos de DNA adentrassem o gel de agarose.

A posição dos fragmentos de DNA no gel foi visualizada a partir da coloração com Brometo de Etídio, e posteriormente, conduzido a um transluminador UV, para observar o DNA concentrado (Figura 04).



Figura 04. Confirmação da amostra de DNA em gel de agarose 1%.

Sequenciamento

Após a purificação dos produtos da PCR com 0,5 μ l da enzima Illustra Exo-Star 1-Step PCR Clean Up Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), os fragmentos de DNA foram sequenciados bidirecionalmente a partir do Kit BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), seguindo as especificações do fabricante. A sequência de bases foi obtida em um sequenciador automático ABI-PRISM 3500 XL (Applied Biosystems) da Universidade Estadual de Londrina.

As sequências obtidas para o isolado UENP-n04 foram editadas e alinhadas com outras sequências do mesmo trecho, disponíveis para outros *Heterorhabditis* no GenBank (números de acesso na árvore filogenética), usando o software BioEdit Sequence

Alignment Editor (HALL, 1999). Em seguida, o software MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011) foi utilizado para calcular as distâncias em pares (Pairwise Distances) e conduzir as seguintes análises: *i* – Sinal filogenético dos dados, o qual foi testado a partir de método de máxima parcimônia (MP), usando os seguintes parâmetros: Árvore de MP inferida a partir de 1000 repetições, usando o algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR) com o nível de pesquisa 1, no qual as árvores iniciais foram obtidas pela adição aleatória de sequências (10 réplicas); *ii* – Relações filogenéticas a partir do método de *maximum likelihood* (ML). Todas as análises foram conduzidas com 1000 repetições de *bootstrap*.

3.4.1.6 Avaliação de aspectos biológicos do isolado UENP-n04

Teste de patogenicidade e virulência

A patogenicidade e virulência de *Heteorhabditis sp.* UENP-n04 foi avaliada em lagartas de último instar de *G. mellonella*, em larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) e sobre adultos do percevejo barriga-verde, *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae).

As lagartas de *G. mellonella* e larvas de *T. molitor* foram obtidas de criação estabelecida do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano da UEL e os percevejos foram obtidos da criação do Laboratório de Entomologia do IAPAR – Londrina.

Os experimentos foram realizados com cinco repetições e cada repetição constituiu de uma placa de Petri de vidro (9 cm Ø) contendo dois papéis filtro na parte inferior e 10 lagartas, larvas (último instar) ou percevejos. Em seguida, foram aplicados com auxílio de micropipeta, os isolados na concentração de 100 JIs/cm². No tratamento testemunha aplicou-se 2 mL de água destilada. As placas com *G. mellonella* foram mantidas em câmara climatizada a 25±1°C e sem fotoperíodo. Já as placas com *D. melacanthus* foram armazenadas em câmara climatizada a 26±1°C e fotoperíodo de 14h de luz: 10h de escuro.

Para os três tratamentos, a avaliação foi realizada após cinco dias. Para tanto, os insetos mortos foram dissecados para a confirmação da morte pelo nematoide. O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Hartley) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

Produção in vivo do isolado UENP-n 04 em lagartas de G. mellonella

Para o teste de produção *in vivo* utilizou-se a metodologia de Guide et al. (2016). O experimento teve cinco repetições e cada uma foi composta de uma placa de Petri de plástico com 9 cm de diâmetro, contendo dois papéis de filtro e dez lagartas de *G. mellonella*. As lagartas foram previamente pesadas e selecionadas por tamanho. Com auxílio de micropipeta, o nematoide foi aplicado na concentração de 50 JIs/cm². As placas foram tampadas, vedadas com plástico filme e mantidas por cinco dias em câmara climática a 24±1°C e sem fotoperíodo. Posteriormente, transferiu-se as lagartas mortas para novas placas de Petri contendo um papel de filtro limpo e seco (câmara seca) e estas foram mantidas por sete dias sob as mesmas condições e, após este período, foram colocadas em armadilhas de White (WHITE, 1927), uma repetição por armadilha.

Ao iniciar a emergência dos JIs nos cadáveres das lagartas, estes foram coletados diariamente em suspensão de água destilada e a suspensão (água destilada + JIs) foi quantificada a fim de estimar a quantidade de JIs/mL, para avaliar a produção diária. O processo de coleta e de quantificação foi repetido até a exaustão da produção de JIs nas lagartas.

As variáveis avaliadas foram: 1) produção diária (número total de JIs emergidos em um dia); 2) produção acumulada (número total de JIs que emergiram até o esgotamento das lagartas (MOLINA; MOINO JUNIOR; CAVALCANTI, 2004); 3) média da produção total por lagarta e 4) média da produção por g/lagarta.

O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados de produção diária foram submetidos a análise de regressão pelo programa Excel para obter a curva da produção ao longo do tempo.

3.4.2 Isolamento e identificação da Bactéria Simbionte do Isolado UENPn-04

3.4.2.1 Isolamento e estocagem

A bactéria simbionte do isolado de nematoide entomopagotoênico UENPn-04 foi isolada pelo método de macerado de JIs, seguindo a metodologia de Akhurst (1980) com modificações. Para tanto, 1mL da suspensão do isolado foi colocado em um microtubo (Eppendorf ®) de 1,5mL e em seguida centrifugou-se por 1 minuto a 11.000 rpm. Com

auxílio de micropipeta, o sobrenadante foi retirado deixando apenas o precipitado. Foi adicionado então no microtubo 50µL de hipoclorito de sódio a 2%, o qual agiu por cinco minutos para assepsia externa dos JIs. Em seguida, retirou-se o sobrenadante (aproximadamente 50µL) e foram adicionados 100µL de água destilada. O microtubo foi levado para câmara de fluxo laminar e verteu-se a suspensão em um cadinho estéril para maceração dos JIs. Após a maceração, as células bacterianas foram inoculadas por estriamento com alça de platina em meio NBTA (15g de ágar nutriente; 0,025g de azul de Bromotimol; 0,04g de Cloreto de Trifenil-Tetrazólio; 1000 mL de água destilada).

3.4.2.2 Caracterização molecular das bactérias

Extração do DNA bacteriano

A bactéria isolada foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) (Tryptona, 10 g; Extrato de levedura, 5 g; NaCl, 5 g em 1 L de água) mantido a 28° em câmara climatizada sem fotofase por 18 horas. Posteriormente o DNA foi extraído utilizando o Kit comercial “Pure Link” da Invitrogen®, seguindo o protocolo do fabricante para bactérias Gram-negativas.

Sequenciamento do 16S rRNA

O produto purificado foi utilizado no sequenciamento para ambas as fitas de DNA. As reações desta etapa foram realizadas empregando o Kit Big Dye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, a leitura das sequências foi conduzida no sequenciador automático ABI-PRISM 3500 XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) do Laboratório de Virologia do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina.

Análise dos dados

Após a obtenção das sequências, procedeu-se o alinhamento e a edição do conjunto de dados com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999). Em seguida, utilizou-se o programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011) para a análise

das sequências parciais do gene 16S rRNA das bactérias, disponíveis no banco de dados internacionais GenBank utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) e conduzir a análise: *i* – Sinal filogenético dos dados, o qual foi testado a partir de método de *Neighbor Joining* (NJ), usando os seguintes parâmetros *Kimura two parameter* com o nível de pesquisa 1, no qual as árvores iniciais foram obtidas pela adição aleatória de sequências (10 réplicas); Todas as análises foram conduzidas com 1000 repetições de *bootstrap*.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lagartas de *G. mellonella* mortas pelo isolado apresentaram coloração amarelada, com manchas escuras após 48 horas. Aos 10-12 dias depois da morte, observou-se colocação marrom escura. Insetos parasitados por heterorhabditídeos apresentam coloração avermelhada no início, e depois marrom escuro devido à presença da bactéria simbiote *Photorhabdus* sp. (POINAR, 1990). Por isso, na primeira observação, houve dúvida quanto ao gênero do isolado obtido, pois a sintomatologia inicial sugeria se tratar de um isolado do gênero *Steinernema*. No entanto, após a dissecação de lagartas para obtenção de espécimes para a caracterização morfológica, foi possível observar a presença de adultos com morfologia de fêmeas hermafroditas, fato que confirma que o nematoide pertence ao gênero *Heterorhabditis*. Desta forma, o isolado foi nomeado neste trabalho como *Heterorhabditis* sp. UENP-n04. Além disso, após a realização das análises moleculares, houve confirmação de que isolado pertencia ao gênero *Heterorhabditis*, mais especificamente ao “grupo indica”.

3.5.1 Caracterização Morfométrica

O isolado *Heterorhabditis* sp. UENP-n04 foi caracterizado por uma combinação de caracteres morfológicos e morfométricos de 25 espécimes de machos, fêmeas, e juvenis infectantes (Tabela 02).

Ao analisar as características morfológicas do isolado UENP-n04 e compará-las morfológicamente com a população original de *H. mexicana* e outras espécies do grupo monofilético obtido na árvore filogenética gerada pela análise molecular, é possível observar semelhanças entre os espécimes machos, como o tamanho da espícula e do gubernáculo (Tabela 03) que são as principais características para identificação morfológica de heterorhabditídeos.

Por outro lado, algumas medidas diferem da população original (machos e juvenis infectantes e das espécies semelhantes, como o tamanho total do corpo (L), maior largura do corpo (W), comprimento do esofago (ES), comprimento da cauda sem a cutícula (T) e o diâmetro da região anal do corpo (ABW), evidenciando que o isolado UENP-n04 é maior que *H. mexicana*, *H. amazonensis* e *H. taysearae* (Tabela 03).

As características do juvenil infectante, apontam que o isolado UENP-n04 possui maior comprimento da cauda com e sem cutícula (T) e maior diâmetro da região anal

do corpo (ABW) com médias mais discrepantes, em relação as outras espécies comparadas. Porém, tal isolado, apresenta medidas inferiores no restante das características (Tabela 04).

Nguyen et al. (2004) observaram que *H. mexicana* possui o poro excretor dos machos localizado abaixo do bulbo basal, não sendo comum para espécies de *Heterorhabditis*. Esta característica também foi encontrada no isolado UENP-n 04.

De acordo com Stock et al. (2000) as diferenças intraespecíficas encontradas podem ser atribuídas à origem geográfica do nematoide em estudo, às diferentes condições ambientais e também às interações com o hospedeiro. Trabalhos recentes relatam diferenças entre populações venezuelanas e brasileiras de *H. amazonensis* (ANDALÓ et al. 2009; MORALES et al. 2016; GUIDE et al. 2019). Poinar (1992) e Stock et al. (1996) também relataram diferenças intraespecíficas com espécies do genero *Steinernema*.

Tabela 02. Morfometria de *Heterorhabditis* sp. (UENP- n 04). As medidas são em μm na forma: média \pm dp (variação).

Character	Macho	Hermafrodita (1 ^a geração)	Fêmea (2 ^a geração)	Juvenis Infectantes
N	25	25	25	25
L	81 \pm 42.9 (738-869)	4417 \pm 277.3 (3902-4926)	1264 \pm 111.1 (1102-1439)	566 \pm 26.1 (504-607)
A				17 \pm 2.6 (14-21)
B				4.1 \pm 0.3 (3.6-4.5)
C				4.5 \pm 0,6 (3.7-5.5)
V		1872 \pm 146.9 (1487-2073)	633 \pm 67.5 (504-738)	
Max. body diam. (W)	69 \pm 5.9 (56-74)	245 \pm 15.7 (219-292)	93 \pm 7.3 (84-112)	33 \pm 4.5 (28-37)
Stoma length		14.6 \pm 2.6 (10-21)	13.5 \pm 2.9 (10-21)	
Stoma diam.		13.5 \pm 2.3 (7-18)	10.5 \pm 1.6 (8-15)	
EP	108 \pm 7.4 (98-129)	168 \pm 25.9 (124-222)	128 \pm 16.0 (98-158)	118 \pm 14.0 (92-143)
NR	74 \pm 8.0 (60-84)	106 \pm 17.8 (76-143)	78 \pm 17.3 (58-140)	89 \pm 12.4 (71-116)
ES	131 \pm 5.7 (140-111)	219 \pm 22.7 (174-251)	158 \pm 17.6 (105-188)	139 \pm 11.6 (111 \pm 161)
Testis reflexion (R)	66 \pm 10.9 (52-98)			
Tail length with sheath (T)	88 \pm 16.7 (66-156)	176 \pm 17.5 (143-214)	124 \pm 16.2 (72-116)	129 \pm 18.1 (84-150)
Tail length without sheath				98 \pm 19.4 (55-124)
Anal body diam. (ABD)	53 \pm 6.3 (42-66)	70 \pm 7.4 (60-87)	33 \pm 5.5 (13-39)	21 \pm 2.9 (15-29)
Spicule length (SP)	47 \pm 7.3 (21-63)			
Gubernaculum length (GU)	22 \pm 4.0 (18-29)			
D% = EP/ES \times 100	82 \pm 5.7 (76-98)			84 \pm 6.2 (72-93)
E% = EP/T \times 100				93 \pm 14.3 (64-113)
SW% = SP/ABD \times 100	114 \pm 27.2 (84-224)			
GS% = GU/SP \times 100	47 \pm 11.3 (36-74)			
Hyaline/tail \times 100				75 \pm 5.9 (64-83)
V% = L/V \times 100		42 \pm 3.0 (36-53)		

L= comprimento total do corpo; NR= distância da extremidade anterior ao anel nervoso; EP= distância da extremidade anterior ao poro excretor; ES= comprimento do esôfago; V= distância da vulva à extremidade anterior; A= L/W; B= L/ES; C= L/T.

Tabela 03. Comparação morfométrica em μm de machos de *Heterorhabditis sp.* UENP- n 04 com outras espécies do gênero *Heterorhabditis*.

Character	UENP04	<i>H. mexicana</i>	<i>H. amazonensis</i>	<i>H. taysearae</i>	<i>H. floridensis</i>	<i>H. baujardi</i>
L	812 \pm 42.9 (738-869)	686 \pm 38 (614-801)	752 \pm 43 (692-826)	703 \pm 23 (648-736)	862 \pm 44 (785-924)	889 \pm 45 (818-970)
Greatest body diam. (W)	69 \pm 5.9 (56-74)	42 \pm 3 (38-47)	41 \pm 2.3 (36-43)	43 \pm 2.3 (38-48)	47.6 \pm 2.2 (43-50)	49 \pm 2 (43-53)
EP	108 \pm 7.4 (98-129)	124 \pm 10 (108-145)	109 \pm 6 (96-116)	95 \pm 12 (78-120)	117 \pm 6 (104-128)	81 \pm 7 (71-93)
NR	74 \pm 8.0 (60-84)	71 \pm 6 (61-83)	79 \pm 5 (71-88)	65 \pm 11 (54-88)	80 \pm 5 (73-90)	65 \pm 7 (54-77)
ES	131 \pm 5.7 (140-111)	96 \pm 5 (89-108)	105 \pm 5 (97-114)	112 \pm 12 (85-123)	105 \pm 4 (97-111)	116 \pm 10 (105-132)
Tail length without sheath (T)	88 \pm 16.7 (66-156)	27 \pm 4 (21-36)	33 \pm 2.7 (29-41)	25 \pm 5 (20-29)	34 \pm 5.8 (29-40)	33 \pm 3 (28-38)
Anal body diam. (ABW)	53 \pm 6.3 (42-66)	24 \pm 1,3 (23-27)	27 \pm 2.6 (23-33)	25 \pm 2.9 (21-30)	26.3 \pm 3 (20-31)	22 \pm 1 (20-24)
Spicule length (SP)	47 \pm 7.3 (21-63)	41 \pm 3,8 (30-47)	41 \pm 2.9 (35-45)	39 \pm 4.8 (30-42)	42 \pm 3.5 (36-46)	40 \pm 3 (33-45)
Gubernaculum length (G)	22 \pm 4.0 (18-29)	23 \pm 3 (18-32)	21 \pm 1.5 (19-23)	18 \pm 3.2 (14-21)	23 \pm 3.7 (17-30)	20 \pm 1.5 (18-22)
D% = EP/ES x 100	82 \pm 5.7 (76-98)	129 \pm 9 (114-149)	103 \pm 3.7 (95-109)	88 -	112 \pm 4 (105-119)	70 -
SW% = SP/ABD x 100	114 \pm 27.2 (84-224)	167 \pm 20 (130-196)	152 \pm 20 (120-187)	156 -	157 \pm 25 (133-209)	182 \pm 18 (138-208)
GS% = G/SP x 100	47 \pm 11.3 (36-74)	56 \pm 7 (43-70)	51 \pm 32 (44-56)	46 -	53.8 (47-65)	50 \pm 5 (44-61)

L = body length, W= body width, NR = distance from anterior end to nerve ring, EP = distance from anterior end to excretory pore, ES = distance from anterior end to end of pharynx, T = tail length, ABD = anal body width, D (%) = (EP/ES), SW (%) = (SP/ABD) , GS (%) = GU/SP.

Tabela 04. Comparação morfométrica em μm de Juvenil Infectante de *Heterorhabditis sp.* UENP- n 04 com outras espécies do gênero *Heterorhabditis*.

Character	UENP04	<i>H. mexicana</i>	<i>H. amazonensis</i>	<i>H. taysearae</i>	<i>H. floridensis</i>	<i>H. baujardi</i>
L	566 \pm 26.1 (504-607)	578 \pm 23 (530-620)	589 \pm 12 (567-612)	418 \pm 38 (332-499)	562 \pm 24 (554-609)	551 \pm 27 (497-595)
A	17 \pm 2.6 (14-21)	25,8 (23,6-28,4)	26 \pm 1.3 (24-29)	21 \pm 2.2 (18-27)	27.6 \pm 5.2 (25-32)	28 \pm 1 (26-30)
B	4.1 \pm 0.3 (3.6-4.5)	4,6 (4,2-5,1)	4.9 \pm 0.3 (4.4-5.5)	3.8 \pm 0.2 (3.4-4.2)	4.3 \pm 2.1 (3.9-4.9)	4.8 \pm 0.2 (4.5-5.1)
C	4.5 \pm 0.6 (3.7-5.5)	5,9 (5,5-6,3)	5.5 \pm 0.2 (5.1-6.1)	7.7 \pm 0.7 (6.5-8.7)	5.6 \pm 2.4 (5.3-6.6)	6 \pm 0.3 (6-6.7)
Greatest body diam. (W)	33 \pm 4.5 (28-37)	23 \pm 0,8 (20-24)	23 \pm 1.2 (20-24)	20 \pm 1.9 (17-23)	21.2 \pm 4.6 (19-23)	20 \pm 2 (18-22)
EP	118 \pm 14.0 (92-143)	102 \pm 5,2 (83-109)	107 \pm 6.1 (89-115)	90 \pm 9.1 (74-113)	109 \pm 10.4 (101-122)	97 \pm 3 (91-103)
NR	89 \pm 12.4 (71-116)	81 \pm 4,2 (74-88)	85 \pm 4.9 (76-93)	64 \pm 6.8 (58-87)	86 \pm 9.2 (68-107)	81 \pm 3 (75-86)
ES	139 \pm 11.6 (111 \pm 161)	122 \pm 27 (104-142)	121 \pm 6.6 (107-132)	110 \pm 8.4 (96-130)	135 \pm 11.6 (123-142)	115 \pm 3 (107-120)
Tail length with sheath(T)	129 \pm 18.1 (84-150)	99 \pm 4,2 (91-106)	107 \pm 4.7 (98-115)	55 \pm 6.6 (44-70)	103 \pm 10.1 (91-113)	90 \pm 4 (83-97)
Tail length without sheath (T)	98 \pm 19.4 (55-124)	66 \pm 3 (59-73)	69 \pm 4.4 (59-74)	- -	63 \pm 7.9 (48-68)	- -
Anal body diam. (ABW)	21 \pm 2.9 (15-29)	15 \pm 1,2 (12-17)	14 \pm 1.4 (13-17)	- -	14 \pm 3.7 (12-16)	13 \pm 0.7 (11-14)
D% = EP/ES x 100	84 \pm 6.2 (72-93)	81 \pm 3 (72-86)	88 \pm 2.7 (83-92)	83 \pm 6 (71-96)	81 \pm 8.9 (71-90)	84 \pm 3 (78-88)
E% = EP/T x 100	93 \pm 14.3 (64-113)	104 \pm 5,2 (87-111)	100 \pm 6.0 (89-109)	180 \pm 27 (110-230)	105 \pm 10.2 (95-134)	108 \pm 4 (98-114)

L = body length, a = (L/W), b = (L/ES), c = (L/T), W = body width, NR = distance from anterior end to nerve ring, EP = distance from anterior end to excretory pore, ES = distance from anterior end to end of pharynx, T = tail length, ABD = anal body width, D (%) = (EP/ES), E (%) = (EP/T).

3.5.2 Caracterização Molecular e Análise Filogenética

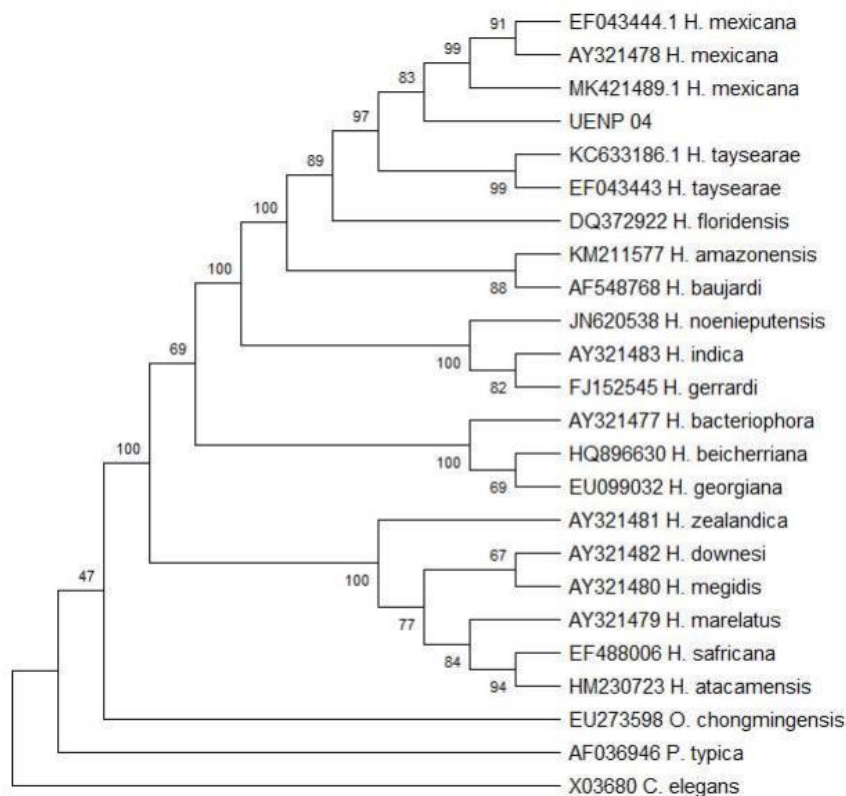
3.5.2.1 Região ITS

Um trecho de 840 pares de base (pb) do gene do DNA ribossomal foi amplificado e sequenciado, incluindo parte do 28S, ITS1, 5,8S, 1ITS2 e parte do 18S.

A sequência obtida do isolado UENP-n04 não foi idêntica a nenhuma das sequências obtidas para nematoides entomopatogênicos depositadas no GenBank, ficando mais próximo das espécies *Heterorhabditis mexicana* e *Heterorhabditis taysearae*. No entanto, mostrou-se praticamente idêntica à sequência do isolado UENPn-01 analisada por Macedo (2020) de ocorrência em local próximo ao local de isolamento do UENPn-04.

Na análise da árvore filogenética, a topologia representada em Máxima Parcimônia, mostrou um grupo monofilético, bem suportado (100%) pela análise de *bootstrap*, formado pelos isolados das espécies *H. mexicana*, *H. taysearae*, *H. floridensis*, *H. baujardi*, *Heterorhabditis* sp. (UENPn-01) e *H. amazonensis* (Figura 05).

Figura 05. Relações filogenéticas de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. (UENPn-04) baseadas na análise de regiões ITS do rDNA inferidas pela análise de Máxima Parcimônia (MP). *Oscheius chongmingensis*, *Pellioditis typica* e *Caenorhabditis elegans* foram usados como grupo externo.



As estimativas de similaridade a partir dos dados da região ITS mostraram que há uma proximidade de 98,10% entre UENP-n04 e a espécie de nematoide entomopatogênico *H. mexicana* (EF043444) e de 98,10% com *H. taysearae* (EF043443) (Tabela 05).

Tabela 05. Distâncias em pares das regiões ITS do rDNA entre espécies de *Heterorhabditis*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1 UENP04_ <i>Heterorhabditis</i>		98,10	98,10	98,10	97,71	98,10	96,93	76,88	78,03	75,89	74,54	73,29	63,98	78,22	78,22	78,22	88,17	88,60	88,14	97,71	96,53	23,00	11,23	4,24	
2 EF043444.1_ <i>H. mexicana</i>	5		100,00	100,00	98,48	98,48	97,32	75,26	77,43	75,26	73,92	72,63	64,56	78,71	78,71	78,71	89,50	89,92	89,47	98,09	96,92	20,29	11,68	4,60	
3 MK421489.1_ <i>H. mexicana</i>	5	0		100,00	98,48	98,48	97,32	75,26	77,43	75,26	73,92	72,63	64,56	78,71	78,71	78,71	89,50	89,92	89,47	98,09	96,92	20,29	11,68	4,60	
4 AY321478_ <i>H. mexicana</i>	5	0	0		98,48	98,48	97,32	75,26	77,43	75,26	73,92	72,63	64,56	78,71	78,71	78,71	89,50	89,92	89,47	98,09	96,92	20,29	11,68	4,60	
5 KC633186.1_ <i>H. taysearae</i>	6	4	4	4		99,62	96,93	75,89	78,03	75,89	74,54	73,29	64,65	79,27	79,27	79,27	88,62	89,05	88,60	97,71	96,53	23,00	15,40	1,65	
6 EF043443_ <i>H. taysearae</i>	5	4	4	4	1		97,32	76,39	78,52	76,39	75,05	73,80	65,23	79,75	79,75	79,75	88,60	89,03	88,57	98,09	96,92	23,99	15,94	1,26	
7 KM211577_ <i>H. amazonensis</i>	8	7	7	7	8	7		76,32	78,46	76,32	75,00	73,73	65,14	81,30	81,30	81,30	90,82	91,24	90,81	99,25	99,62	25,36	11,23	2,57	
8 EF488006_ <i>H. safricana</i>	52	55	55	55	54	53	53		98,48	96,13	91,64	88,02	76,87	85,43	84,53	84,05	78,14	78,62	79,15	75,26	75,76	16,08	2,65	2,02	
9 HM230723_ <i>H. atacamensis</i>	50	51	51	51	50	49	49	4		96,92	92,90	88,91	77,89	85,88	84,98	84,50	80,19	80,67	81,18	77,43	77,92	17,17	1,24	1,02	
10 AY321479_ <i>H. marelatus</i>	54	55	55	55	54	53	53	10	8		90,78	87,08	78,42	84,47	84,05	83,07	77,05	77,55	78,09	75,26	75,76	12,07	3,03	1,05	
11 AY321482_ <i>H. downesi</i>	57	58	58	58	57	56	56	21	18	23		92,47	75,89	82,71	81,77	81,27	75,70	76,20	76,74	73,92	74,43	14,34	7,65	5,82	
12 AY321480_ <i>H. megidis</i>	59	60	60	60	59	58	58	29	27	31	19		74,16	79,58	78,62	78,09	72,18	72,70	73,29	72,63	73,15	16,55	15,22	11,14	
13 AY321481_ <i>H. zealandica</i>	75	74	74	74	74	73	73	53	51	50	55	58		69,28	68,16	68,68	65,88	66,45	67,09	63,89	64,47	6,80	18,77	17,06	
14 AY321477_ <i>H. bacteriophora</i>	50	49	49	49	48	47	44	35	34	37	41	47	67		98,48	98,48	83,24	83,70	83,22	81,27	81,80	14,96	26,10	6,68	
15 HQ896630_ <i>H. beicherriana</i>	50	49	49	49	48	47	44	37	36	38	43	49	69	4		98,10	84,15	84,61	84,13	81,27	81,80	14,39	26,10	6,68	
16 EU099032_ <i>H. georgiana</i>	50	49	49	49	48	47	44	38	37	40	44	50	68	4	5		83,68	84,13	83,65	81,27	81,80	16,31	26,10	4,83	
17 AY321483_ <i>H. indica</i>	29	26	26	26	28	28	23	50	46	52	55	61	72	40	38	39		99,62	99,25	90,81	90,39	15,50	7,76	3,25	
18 FJ152545_ <i>H. gerrardi</i>	28	25	25	25	27	27	22	49	45	51	54	60	71	39	37	38	1		99,62	91,23	90,81	16,58	8,17	2,81	
19 JN620538_ <i>H. noenieputensis</i>	29	26	26	26	28	28	23	48	44	50	53	59	70	40	38	39	2	1		90,80	90,38	15,20	6,28	4,66	
20 DQ372922_ <i>H. floridensis</i>	6	5	5	5	6	5	2	55	51	55	58	60	75	44	44	44	23	22	23		98,87	23,99	13,76	1,26	
21 AF548768_ <i>H. baujardi</i>	9	8	8	8	9	8	1	54	50	54	57	59	74	43	43	43	24	23	24	3		24,19	13,27	0,85	
22 EU273598_ <i>O. chongmingensis</i>	127	129	129	129	127	126	125	134	133	137	135	133	139	134	134	133	133	133	132	133	126	126		45,17	10,06
23 AF036946_ <i>P. typica</i>	153	153	153	153	155	155	153	149	148	149	152	156	157	160	160	160	151	151	150	154	154	168			30,32
24 X03680_ <i>C. elegans</i>	142	142	142	142	144	144	143	144	146	145	142	138	156	150	150	149	147	147	148	144	144	153	165		

Diagonal abaixo: diferenças totais de caracteres. Diagonal acima: porcentagem de similaridade.

3.5.2.2 Região 28S-rDNA- D2D3 LSU

Para este segmento do gene de rDNA foi obtido uma sequência de 198 pares de base (pb), englobando o trecho D2D3 dentro da região 28S. Na análise da árvore filogenética, a topologia representada em *Neighbor Joining*, mostrou um grupo monofilético formado pelos isolados da espécie *H. mexicana* EU100414, MK421470 e com o isolado UENP04 (Figura 6). A análise de similaridade da região D2D3, mostrou que há uma proximidade de 100% com a espécie de nematoide entomopatogênico *H. mexicana* (EU100414.1).

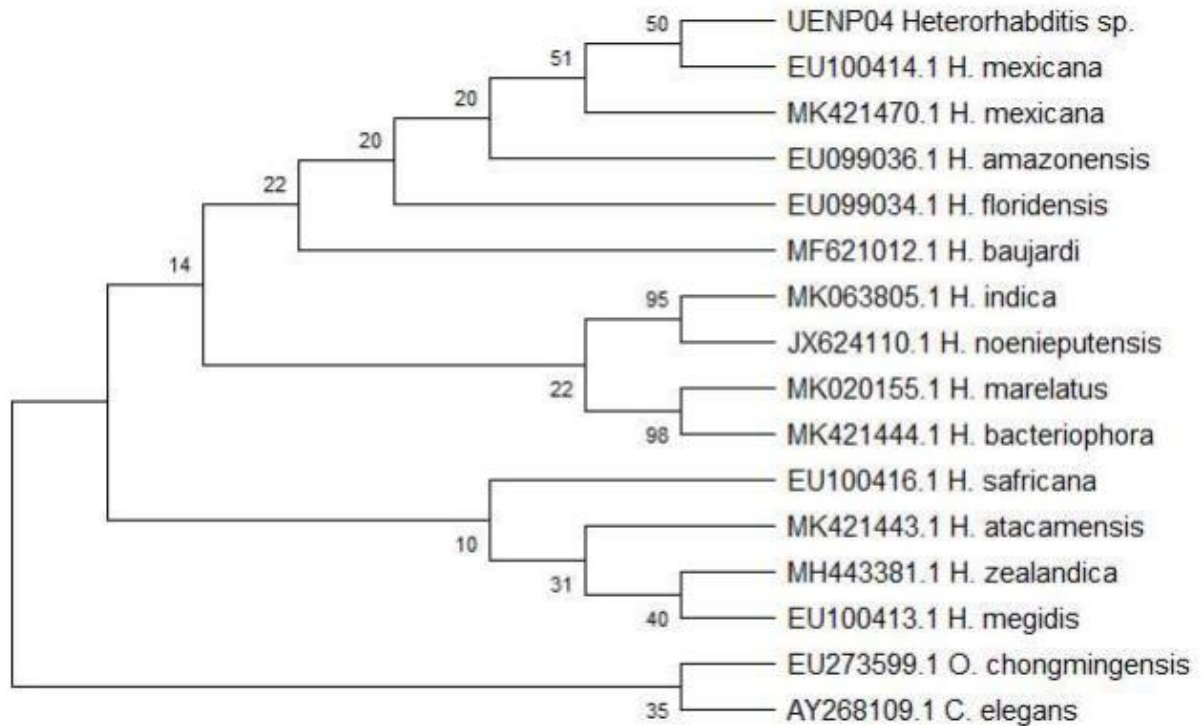


Figura 06. Relações filogenéticas de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. (UENPn-04) baseadas na análise de regiões 28S-rDNA- D2/D3 LSU do rDNA inferidas pela análise de *Neighbor Joining*. *Oscheius chongmingensis* e *Caenorhabditis elegans* foram usados como grupo externo.

Com o resultado obtido com esta região, foi possível afirmar que o isolado UENP-n04 pertence a espécie *Heterorhabditis mexicana*.

Andaló et al. (2009), também utilizaram a região D2D3 para identificar os isolados *Heterorhabditis* sp. (GL) e *Heterorhabditis* sp. (SG) encontrados no município de Lavras, Minas Gerais, Brasil, que possuíam a mesma composição de nucleotídeos de *H.*

amazonensis (ANDALÓ et al., 2006).

3.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

De acordo com o trabalho de Nguyen et al. (2004), no qual foi feita a descrição da espécie *H. mexicana*, as fêmeas hermafroditas apresentam características semelhantes as observadas neste trabalho, como região anterior com seis papilas labiais proeminentes, sendo que cada lábio apresenta uma papila labial terminal (Figura 07 - A).

Além disso, a vulva tem forma protuberante localizada na região mediana anterior, e com abertura em forma transversal. (Figura 07 - B). Também foi possível observar a região caudal onde está localizado o ânus (Figura 07 - C). Foi possível observar a espícula do macho (Figura 07 - D).

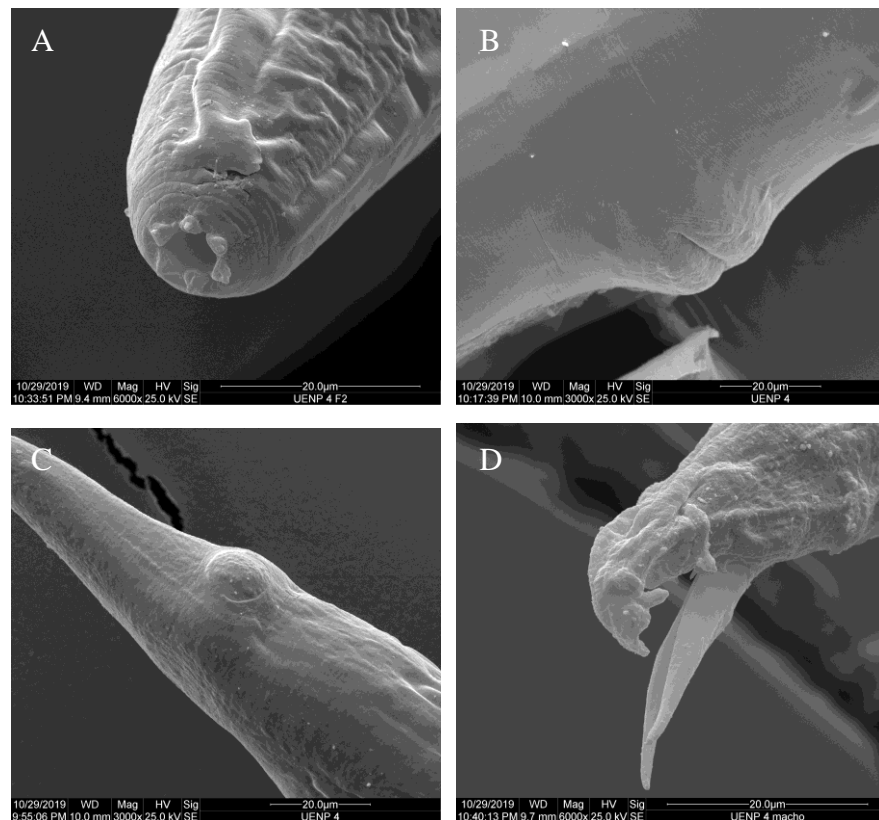


Figura 07. Espécimes de *Heterorhabditis* sp. UENP-n 04 em microscopia eletrônica de varredura (MEV). **A:** região anterior com seis papilas labiais proeminentes. **B:** vulva protuberante localizada na região mediana anterior e com abertura em forma transversal. **C:** região caudal e ânus. **D:** Espícula do macho.

3.5.4 Teste de Patogenicidade e Virulência

Os juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. UENP-n 04 apresentaram patogenicidade à *G. mellonella*, *T. molitor*, *D. melacanthus* e verificou-se diferença na virulência do nematoide para os diferentes insetos, com porcentagens de mortalidade de 98, 96 e 58% respectivamente (Tabela 06).

Tabela 06. Virulência de *Heterorhabditis* sp. UENP-n 04 aplicados na concentração de 100 JIs/cm² sob três diferentes insetos.

Inseto Hospedeiro	<i>Heterorhabditis</i> sp. UENP-n 04	Controle
	Mortalidade (%) ± SD	
<i>Galleria mellonella</i>	98,0 ± 4,4 a	0,0 ± 0,0
<i>Tenebrio molitor</i>	96,0 ± 8,9 b	0,0 ± 0,0
<i>Dichelops melacanthus</i>	58,0 ± 16,4 b	0,0 ± 0,0
CV (%) = 13,2		

*Média seguida de mesma letra maúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de média de Tukey (p= 0,05).

O gênero *Heterorhabditis* é virulento à lagartas de *G. mellonella* como demonstrado por Molina et al. (2005) que obtiveram 100 e 89% de mortalidade e Andaló et al. (2009) encontraram 73 e 80% de mortalidade causada pelos nematoides *Heterorhabditis* sp. (GL) e *Heterorhabditis* sp. (SG) respectivamente. Guide et al (2019) utilizando o isolado *H. amazonensis* (UEL8) observaram 100% de mortalidade contra *G. mellonella*. Assim, com os dados obtidos com *Heterorhabditis* sp. UENP-n 04 podemos afirmar que este inseto é suscetível.

As larvas de *Tenebrio molitor* também foram susceptíveis à *Heterorhabditis* sp. UENP-n04 (Tabela 06). Trabalhos realizados em condições semelhantes, porém utilizando *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) pertencente a mesma família de *T. molitor*, também evidenciaram a suscetibilidade deste inseto aos NEPs dos gêneros *Heterorhabdits* e *Steinernema* (PEZOWICZ, 2003; ALVES; ROHDE; ALVES, 2005; ALVES et al., 2012). Guide et al (2019) com o isolado *H. amazonensis* (UEL8) obteve 85%

de mortalidade contra larvas de *A. diaperinus*, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho.

Por outro lado, adultos do percevejo *D. melacanthus* foram menos susceptíveis, corroborando Guide et al (2019) que obtiveram 46% de mortalidade com *H. amazonensis* (UEL8). Por outro lado, Guide et al. (2015) avaliaram diferentes isolados *Heterorhabditis* sobre adultos do mesmo percevejo e encontraram porcentagens de mortalidade de até 76%.

A diferença de virulência entre isolados até mesmo de uma mesma espécie, pode ser justificada por vários fatores. Um deles está relacionado ao fato de que isolados diferentes podem estar adaptados a diferentes condições climáticas ou mesmo ter desenvolvido especificidade a hospedeiros locais (ALVES et al., 2009a). Ainda, de acordo com Almenara et al. (2012) e De Doucet et al. (1999) a variação de susceptibilidade é esperada, pois, diferentes isolados coevoluíram com diferentes espécies de hospedeiro e, portanto, possuem especificidades que os tornam mais ou menos virulentos sobre determinado inseto, o que pode explicar a diferença encontrada no presente trabalho.

3.5.5 Produção *in vivo* do isolado UENP-n04 em lagartas de *G. mellonella*

A produção de JIs de *Heterorhabditis* sp. UENP-n04 em lagartas de *G. mellonella* ocorreu ao longo de sete dias e observou-se os picos de produção no 2º ($2,0 \times 10^6$) e 3º ($3,1 \times 10^6$) dia (Figura 05), representando 23 e 35% respectivamente da produção total acumulada que foi de $8,9 \times 10^6$ JIs. A média de produção por lagarta foi $1,78 \times 10^5$ JIs/lagarta e a produção por g/lagarta foi $2,5 \times 10^4$ JIs.

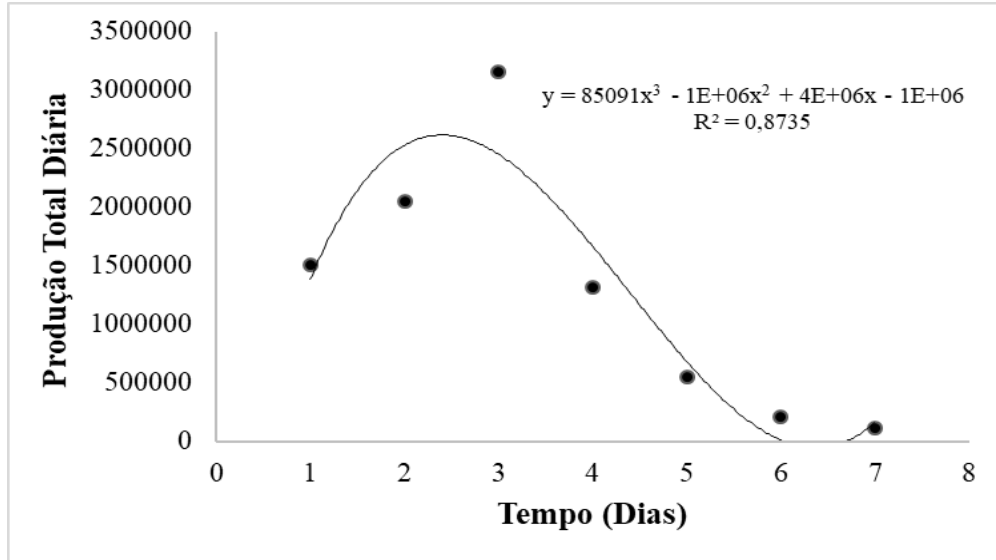


Figura 08. Produção diária de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. UENP-n 04 em 50 lagartas de *G. mellonella* sob condições controladas ($24\pm 1^\circ\text{C}$ e sem fotoperíodo).

Os valores aqui obtidos foram maiores do que os reportados por outros autores usando o mesmo método de produção. Guide et al. (2016a) encontraram 7×10^4 e $7,2 \times 10^4$ JIs/g de lagarta para *Heterorhabditis* sp. (NEPET 11) e *H. amazonensis* (RSC 05). Bortolluzi et al. (2013) observaram uma média de produção de $2,2 \times 10^6$ JIs/g para dois isolados *Heterorhabditis* (IBCBn-24 e ICBn-40) e Costa et al. (2007) obtiveram uma média de $1,6 \times 10^5$ JIs/g para *H. riobraves*.

Vários fatores podem afetar a produção *in vivo* de NEPs, e esses fatores interagem de formas imprevisíveis (ZERVOS et al., 1991; SHAPIRO-ILAN et al., 2004). Diferenças de infectividade e produção de espécies de nematoides podem ser maiores ou menores, mesmo em um hospedeiro considerado susceptível como no caso de *G. mellonella* (OZER et al., 2003). Além disso, a disponibilidade de alimento pode influenciar a permanência dos JIs no interior do inseto e também na formação de novas gerações (EHLERS, 2001). Ainda, segundo Boff et al. (2000) a taxa de metabolismo no processamento do tecido do hospedeiro pelas bactérias simbiotes difere entre espécies de nematoides e podem também influenciar na sobrevivência e reprodução dos mesmos, afetando assim a produção.

Os fatores dependentes da concentração de JIs também desempenham um papel importante na produção dos nematoides entomopatogênicos e podem agir diretamente afetando o número de JIs produzidos por cadáveres infectados, ou indiretamente, influenciando a longevidade dos juvenis (ZERVOS et al., 1991; SELVAN et al., 1993).

De acordo com Poinar (1979) a média de produção em lagartas de *G. mellonella* é entre 30.000 a 50.000 JIs/lagarta, mas pode chegar a 2×10^5 (DUTKY et al., 1964; GAUGLER; HAN, 2002). Estes valores são semelhantes aos observados para média de produção de *Heterorhabditis* sp. UENP-n 04 em *G. mellonella*, indicando um ponto positivo, principalmente quando se pensa na utilização deste isolado em programas de controle de pragas.

3.5.6 Identificação molecular da bactéria simbiote

As análises moleculares identificaram a bactéria associada ao isolado *Heterorhabditis mexicana* (UENP n-04) como sendo do gênero *Photorhabdus* sp. e localizada no grupo monofilético de *Photorhabdus asymbiotica* (Figura 06), porém a homologia foi baixa, tornando inconclusiva a afirmação de espécie.

P. asymbiotica foi originalmente descrita em 1989 após ser isolado de um paciente com úlcera de perna nos EUA, sendo inicialmente uma bactéria de importância clínica (FARMER et al. 1989; HAPESHI; WATERFIELD, 2016). Eventualmente, verificou-se que estava associado simbioticamente a NEPs do gênero *Heterorhabditis* (GERRARD et al, 2006).

Tradicionalmente a identificação molecular do gênero *Photorhabdus* é usualmente baseado no RNA ribossômico 16S como marcador filogenético (LIU et al., 1997; JANG et al., 2012; SALAZAR-GUTIÉRREZ et al, 2017). No entanto, ficou evidenciado que esse gene pode estar sujeito a transferência horizontal, reduzindo sua resolução como marcador para identificação taxonômica e levando a possíveis erros de atribuição filogenética (TAILLIEZ et al., 2010).

Salazar-Gutiérrez et al (2017), realizaram uma análise filogenética multigênica, utilizando marcadores que apresentam baixa transferência horizontal de genes, como as proteínas *gltX*, *dnaN*, *infB* e *glnA*, e concluíram que *P. luminescens* SL0708 pertencia a subespécie *akhurstii*.

Com o uso de outros marcadores, pode ser possível identificar a bactéria simbiote de *H. mexicana* UENP- n04 a nível de espécie.

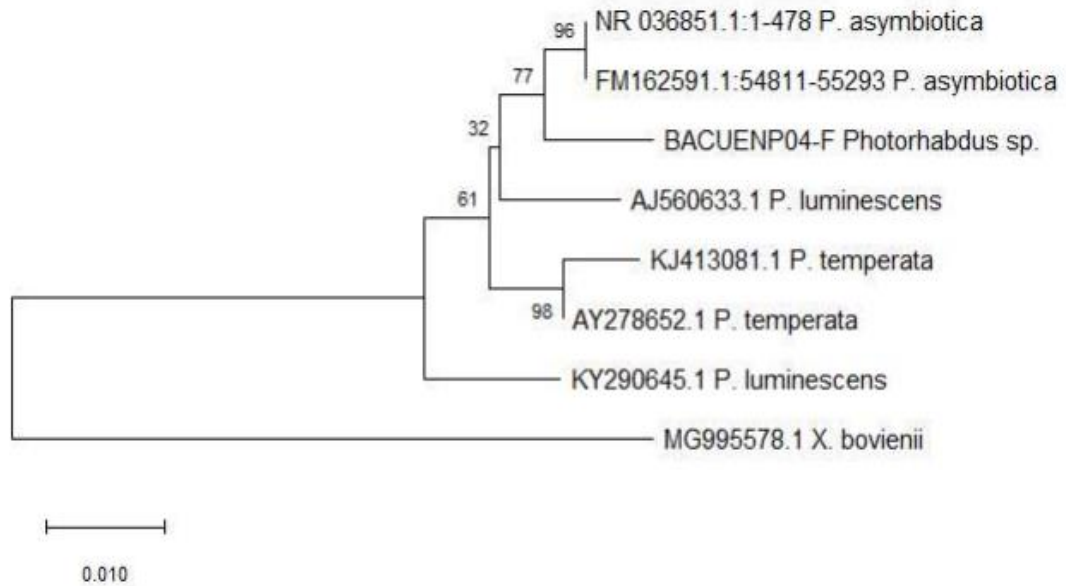


Figura 09. Relações filogenéticas de bactérias simbiotes de *Heterorhabditis mexicana* UENP n-04 baseadas na análise de regiões 16S do rDNA inferidas pela análise de Máxima Parcimônia (MP) Neighbor joining. *Xenorhabdus bovienii* foi usado como grupo externo.

3.6 CONCLUSÕES

Apesar de haver divergencia com relação aos dados morfológicos, a posição do poro excretor e os dados moleculares, indicam que o isolado UENPn-04 pertence a espécie *H. mexicana*.

Os juvenis infectantes do isolado UENP-n04 são patogênicos à *G. mellonella*, *T. molitor* e *D. melacanthus*, sendo este último o hospedeiro menos susceptível.

A produção de JIs do isolado UENP-n04 em *G. mellonella* ocorre durante sete dias e os picos de produções são observados no 2º e 3º dia com 23% e 35% respectivamente, da produção total.

A bactéria associada ao isolado UENP-n04 pertence ao gênero *Photorhabdus*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. J.; BURNELL, A. M.; POWERS, T. O. A Phylogenetic Analysis of Heterorhabditis (Nemata: Rhabditidae) Based on Internal Transcribed Spacer 1 DNA Sequence Data. **Journal Of Nematology**, v. 1, n. 30, p.22-39, 1998.
- ADAMS, B. J.; FODOR, A.; KLEIN, M. G. H. L.; STACKEBRANDT, E.; STOCK, S. P. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. **Biological Control**, 38: 4-21, 2006.
- ADAMS, B.J.; NGUYEN, K.B. Taxonomy and Systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.), **Entomopathogenic Nematology**. Cambridge, CABI Publishing, p.1-33, 2002.
- AKHURST, R. J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabditis* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. **Journal of General Microbiology**. v. 121, p. 303–309, 1980.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland, 1294p, 1994.
- ALMENARA, D.P.; ROSSI, C.; NEVES, C.M.R.; WINTER, C.E. Nematoides Entomopatogênicos. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. INCT-EM, p.1-40, 2012.
- ALVES, V.S.; ALVES, L.F.A.; QUADROS, J. C.; LEITE, L.G. Suscetibilidade da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) ao nematoide *Steinernema carpocapsae* (Nematoda, Steinernematidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 479-482, 2009b.
- ALVES, V. S., MOINO, J. A., SANTA-CECILIA, L. V. C., ANDALÓ, V., SOUZA, G. C. Patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 67-73, 2009a.
- ALVES, V.S.; NEVES, P.M.J.O.; ALVES, L.F.A.; MOINO JUNIOR, A.; HOLZ. Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) screening for lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) control. **Revista Colombiana de Entomologia**, v.38, p. 76-80, 2012.
- ALVES, L.F.A.; ROHDE, C.; ALVES, V.S. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.1, p.139-141, 2005.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, 403-410, 1990.
- ANDALÓ, V. III Identificação de nematoides. In: VOSS, M. (Ed). **Manual de Técnicas Laboratoriais para Obtenção, Manutenção e Caracterização de Nematoides Entomopatogênicos**. ed. Embrapa Trigo. Documentos 97, p. 9-17, 2009.

- ANDALÓ, V.; CAVALCANTI, R. S.; MOLINA, J. P.; MOINO JUNIOR, A. Substrates for storing entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 3, p. 342-347, 2010.
- ANDALÓ, V.; MOREIRA, F. G.; CAVALCANTI, R. S.; MOINO JUNIOR, A. Observations on the Life Cycle and Pathogenicity of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 2, 194-197, 2009b.
- ANDALÓ, V.; MOREIRA, F. G.; MOINO JUNIOR, A. Studies of two new populations of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematropica**, v. 39, n. 2, p. 199-211, 2009c.
- ANDALÓ, V.; NGUYEN, K. B.; MOINO JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology**, v. 8, n. 6, p. 853-867, 2006a.
- BEDDING, R. A.; AKHURST, R. J. A. Simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. **Nematologica**, v. 21, p. 109-110, 1975.
- BIRD, A. F.; AKHURST, R. J. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. **International Journal of Parasitology**, v. 13, n. 6, p. 599-606, 1983.
- BOEMARE, N. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**. New York: Cabi Publishg, Cap.2 p.35-51, 2002.
- BOFF, M.; WIEGERS, G.L.; GERRITSEN, L.J.M.; SMITS, P.H. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87.3 in *Galleria mellonella*. **Nematology**, v.2, p.303-308, 2000.
- BORTOLUZZI, L.; ALVES, L. F. A.; ALVES, V. S.; HOLZ, N. Entomopathogenic nematodes and their interaction with chemical insecticide aiming at the control of banana weevil borer, *Cosmopolites Sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, p. 183-192, 2013.
- BLAXTER, M. L.; DE LEY, P.; GAREY, J. R.; LIU, L. X.; SCHELDEMAN, P.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, J. R.; MACKAY, L. Y.; DORRIS, M.; FRISSE, L.; M.; VIDA, J. T. THOMAS, W. K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature** 392: 71-75, 1998.
- BRENNER, D.J. Additional Genera of Enterobacteriaceae. In: DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K.-H., STACKEBRANDT, E. (Eds.). **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, 3ed. Springer, NY. release 3.4, 1999.
- BURMAN, M. *Neoaplectana carpocapse*: toxin production by axenic insect parasitic nematodes. **Nematológica**, v. 78, p.62-70, 1982.

CICHE, T.A.; KIM, K.S.; KAUFMANN-DASZCZUK, B.; NGUYEN, K.C.Q.; HALL, D.H. Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. **Applied Environmental Microbiology**. 74, 2275-2287, 2008.

CICHE, T.A.; & ENSIGN, J.C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? **Appl. Environ. Microbiol.** 69, 1890–1897, 2003.

COSTA, J.C.R.; DIAS, R.J.P.; MORENZ, M.J.F. Determining the adaptation potential of entomopathogenic nematode multiplication of *Heterorhabditis riobravus* and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) in larvae of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Parasitology Research**, v.102, p.139-144, 2007.

CLARKE, D.J. *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. **Cellular Microbiology**, 10: 2159-2167, 2008.

COURTNEY, W. D.; POLLEY, D.; MILLER, V. L. TAF, an improved fixative in nematode techniques. **Plant Disease Reporter**, De Doucet, v. 39, p. 570–571, 1955.

CRAWFORD, J. M.; KONTRNIK, R.; CLARDY, J. Regulating alternative lifestyles in entomopathogenic bacteria. **Current Biology**, v. 20, p. 69–74, 2010.

DE DOUCET, M.M.A.; BERTOLOTTI, A.L.; GIAYETTO, A.L.; MIRANDA, M.B. Host range, specificity, and virulence of *Steinernema feltiae*, *Steinernema rarum*, and *Heterorhabditis bacteriophora* (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Argentina. **Journal Invertebrate Pathology**, v.73, n.3, p.237-242, 1999.

DOLINSKI, C.; KAMITANI, F. L.; MACHADO, I. R.; WINTER, C. E. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n.2, p. 150-159, 2008.

DOLINSKI, C.; MONTEIRO, C.; ANDALÓ, V.; LEITE, L.G. Studies on entomopathogenic nematodes in Brazil: past and future. **Nematoda**, v.4, p.1-14, 2017.

DOLINSKI, C.; MOINO JUNIOR, A. Utilização de nematóides entomopatogênicos Nativos ou Exóticos: O Perigo das Introduções. **Nematologia Brasileira**, v. 30, p. 139-149, 2006.

DOWDS, B.C.A.; PETERS, A. Virulence mechanisms. In: GAUGLER, R. ed. **Entomopathogenic nematology**. New York, NY: CABI, p.79-98, 2002.

DUTKY, S. R. THOMPSON, J. V.; CANTWE, G. E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **Journal Insect Pathology**, v. 6, n. 4, p. 417-422, 1964.

EHLERS, R. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 623-633, 2001.

FARMER, J. J.; JORGENSEN, J. H.; GRIMONT, P. A. *Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical specimens. **J Clin Microbiol** 27:1594–1600, 1989.

FERRAZ, L. C. C. B. et al. Utilização de nematoides para o controle de pragas agrícolas e urbanas. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e desafios**. Piracicaba: Fealq. Cap. 6. p. 171-196, 2008.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematóides Entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: Fealq. Cap. 16. p. 541-569, , 1998.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FORST, S., DOWDS, B.; BOEMARE, N.; STACKEBRANDT, E. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: Bugs That Kill Bugs. **Annual Review Of Microbiology**, v. 51, n. 1, p.47-72, 1997.

FORST, S.; CLARKE, D. Bacteria-nematode symbiosis. In: GAUGLER, R., editor. **Entomopathogenic Nematology**, CABI Publishing, New York, NY, p. 57-77, 2002.

FRANKLIN, M.; GOODEY, J.B. (1949). A cotton blue lactophenol technique for mounting plant-parasitic nematodes. **Journal of Helminthology**, v. 23, n. 3-4, p.175-178, 1949.

FUGA, C.A.G.; FERNANDES, R.H; LOPES, E. A. Nematoides entomopatogênicos. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n. 3, p. 56-75, 2012.

GAUGLER, R.; HAN, R. Production technology. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New Jersey: Rutgers University, p.289-310, 2002.

GERRARD J, WATERFIELD N, VOHRA R, FFRENCH-CONSTANT RH (2004) Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. *Microbes Infect* 6:229–237. doi:10.1016/j. micinf.2003.10.018

GIVAUDAN, A.; LANOIS, A. flhDC, the flagellar master operon of *Xenorhabdus nematophilus*: requirement for motility, lipolysis, extracellular hemolysis, and full virulence in insects. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 107–115, 2000

GLAZER, I. E. E. Lewis. Bioassays for entomopathogenic nematodes. Pp. 229-247 in A. Navon, and K. R. S. Ascher, Eds. Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. New York, **CABI Publishing**. Kaya, H. K., and S. P. Stock. 199, 2000.

GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). **International Journal of Parasitology**, v. 30, p. 995- 1000, 2000.

GREWAL, P. S.; NARDO, E. A. B. DE; AGUILLERA, M. Entomopathogenic nematodes: Potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 191-205, 2001.

GREWAL, P. S.; SELVAN, S.; GAUGLER, R. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment and reproduction. **Journal of Thermal Biology**, v. 19, n.4, 245-253, 1994.

GUIDE, B. A. **Identificação e aspectos biológicos do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis amazonensis* Isolado UEL 08**. 2019. 67 f. Tese (Doutorado) – Programa Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, 2019.

GUIDE, B. A.; FERNANDES, T. A. P.; CHIESA, A. C. M.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, V. S.; MENEGUIN, A. M. Nematodos entomopatogénos (Rhabditida: Heterorhabditidae y Steinernematidae) en el control de *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Entomología Mexicana**, v. 2, p. 180-185, 2015.

GUIDE, B. A.; SOARES, E. A.; ITIMURA, C. R. B.; ALVES, V. S. Entomopathogenic nematodes in the control of cassava root mealybug *Dysmicoccus* sp. (Hemiptera: Pseudococcidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 42, n. 1, p. 16-21, 2016a.

GUIDE, B.A.; ALVES, V.S.; FERNANDES, T. A. P.; FERREIRA, F. P.; NEVES, P. M. O. J. Glycerol as a cryoprotectant agent to the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3017-3026, 2016b.

HALL T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT . **Nucleic Acids Symp Ser** 41, 95-98, 1999.

HAPESHI, A.; WATERFIELD, N. R. *Photorhabdus asymbiotica* as an Insect and Human Pathogen. In: ffrench-Constant R. (eds) *The Molecular Biology of Photorhabdus Bacteria*. Current Topics in Microbiology and Immunology, v 402, p. 159-177, 2016.

HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed). **Entomopatogenic entomology**. Wallingford, UK: CAB International, p. 115-143, 2002.

HOLTERMAN, M. H. M. **Phylogenetic relationships within the phylum Nematoda as revealed by ribosomal DNA, and their biological implications**. 2007. 208 f. Tese (Doutorado) – Ecologia da produção e conservação de recursos, Universidade de Wageningen, Holanda, 2008.

HUNT, D. J.; SUBBOTIN, S. A. Taxonomy and systematics. In: Hunt DJ, Nguyen KB (eds) *Advances in Taxonomy and Phylogeny of Entomopathogenic Nematodes of the Steinernematidae and Heterorhabditidae*, vol 12. Koninklijke Brill NV, Leiden, pp 13–58, 2016.

JANG, E. K.; ULLAH, I.; LIM, J. H.; LEE, I. J.; KIM, J. G.; SHIN, J. H. Physiological and Molecular Characterization of a Newly Identified Entomopathogenic Bacteria, *Photorhabdus temperata* M1021. **J. Microbiol. Biotechnol.** 22(12): 1605~1612, 2012.

JOYCE SA, BRACHMANN AO, GLAZER I, LANGO L, SCHWÄR G, CLARKE DJ, BODE HB. Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. **Angew Chem Int Ed** 47:1942-1945, 2008.

KAMITANI, F. L. **Caracterização Molecular de isolados de nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis* spp. e seus simbiosites, *Photorhabdus* spp., provenientes de Monte Negro, RO.** 2010. 110 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, v. 38, n. 1, p. 181-206, 1993.

KAYA, H. K.; STOCK, S. P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. (Ed.). **Manual of Techniques in Insect Pathology**, Academic Press, p. 281-324, 1997.

KUSHWAH, J.; KUMAR, P.; GARG, V.; SOMVANSI, V.S. Discovery of a Highly Virulent Strain of *Photorhabdus luminescens* ssp. *akhurstii* from Meghalaya, India. **Indian Journal of Microbiology**, v.57, n.1, p.125-128, 2016.

LIU, J.; BERRY, R. E.; MOLDENKE, A. F. Phylogenetic Relationships of Entomopathogenic Nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) Inferred from Partial 18S rRNA Gene Sequences. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 69, n. 3, p.246-252, 1997.

LEWIS, E.D.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.38, n.1, p. 66-79, 2006.

LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; HARRISON, R. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) in host volatile cues. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 71, n.4, p. 765-769, 1992.

MACEDO, M. F. **Identificação e caracterização do isolado de nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis* sp.** UENP 01. 2020. Dissertação (Mestrado) Programa de Mestrado em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus Luiz Meneghel*, Bandeirantes, Paraná, 2020.

MALAN, A. P.; NGUYEN, K. B.; WAAL, J. Y.; TIEDT, L. *Heterorhabditis safricana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Nematology**, v. 10, p. 381-396, 2008.

MOLINA, J. P.; LOPEZ, N. J. C. Producción *in vivo* de três entomonematodos con dos sistemas de infección em dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 27, n. 1-2, p. 73-79, 2001.

MOLINA, J. P. A.; MOINO JR, A.; CAVALCANTI, R. S. Produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n.3, p. 347-354, 2004.

MOLINA, J. P. A.; MOINO JUNIOR, A.; CAVALCANTE, C. D.; CARVALHO, F. A. Patogenicidade, Multiplicação e Biologia de Isolados Nativos de Nematoides Entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae) Provenientes de Lavras, MG. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 25-30, 2005.

MORALES, N.; MORALES-MONTERO, P.; PUZA, V.; SAN-BLAS, E. First report of *Heterorhabditis amazonensis* from Venezuela and characterization of three populations. **Journal of Nematology**, v. 48, n. 3, p. 139-147, 2016.

NEGRISOLI JR, A. S.; BARBOSA, C. R.C; MOINO JUNIOR. A. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) utilizando o protocolo modificado da IOBC/WPRS. **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 111-116, 2008.

NGUYEN, K. B.; GINARTE, C. M. A.; LEITE, L. G.; DOS SANTOS, J. M.; HARAKAVA, R. *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 1, p. 8-20, 2010.

NGUYEN, K. B.; HUNT, D. J. **Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts**. In: Hunt DJ, Perry RN, editors. Leiden-Boston: Brill, 2007.

NGUYEN, K. B.; MARUNIAK, J.; ADAMS, B. J. Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. **Journal of Nematology**, v. 33, p. 73-82, 2001.

NGUYEN, K. B.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; STUART, R. J.; MCCOY, C. W.; JAMES, R. R.; ADAMS, B. J. *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. **Nematology**, v. 6, p. 231-244, 2004.

NGUYEN, K. B.; SMART JUNIOR, G. C. Morphometrics of Infective Juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). **Journal of Nematology: The Society of Nematologists**. p. 206-212. jun. 1995.

NGUYEN, K.B., SHAPIRO-ILAN, D.I. & MBATA, G.N. *Heterorhabditis georgiana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Georgia, USA. **Nematology** 10, 433-448, 2008.

OROZCO, R.A.; HILL, T.; STOCK, P.S. Characterization and Phylogenetic Relationships of *Photorhabdus luminescens* subsp. *sonorensis* (γ -Proteobacteria: Enterobacteriaceae), the Bacterial Symbiont of the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis sonorensis* (Nematoda: Heterorhabditidae). **Current Microbiology**, v.66, p.30-39, 2013.

OZER, N.; UNLU, I.O. Evaluation of the reproductive potential and competition between two entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* Filipjev, 1934 (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora*, Poinar 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Turkish Journal of Biology**, v. 27, p. 149-155, 2003.

PARRA, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos. in S. B. Alves, Ed. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, FEALQ. Pp. 1015-1037, 1998.

PEREIRA, C. *Rhabdtis hambletoni* n.sp., nema aparentemente semi-parasito da “bróca do algodoeiro” (*Gasterocercodes brasiliensis*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 8, p. 214-230, 1937.

PEZOWICZ, E. Effects of Steinernematidae and Heterorhabditidae on the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **IOBC WPRS BULLETIN**, v.26, n.1, p.193-196, 2003.

POINAR JR, G.O. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen., n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. fam.). **Nematologica**, v. 21, p. 463-470, 1976.

POINAR JR., G. O. Biology and Taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae, In: GLAUGLER. R.; KAYA, H.K. (eds). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton, CRC Press, v. 365, p. 23-61, 1990.

POINAR JR., G. O. Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. **Fundamental Applied Nematology**, v.16, p. 333 – 338, 1993.

POINAR, JR. G.O.; KARUNAKAR, G. K.; DAVID, H. *Heterorhabditis indicus* n. sp. (Rhabditida, Nematoda) from India: separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 15, p. 467-472, 1992.

POPIEL, I. D.; HOMINICK, W.M. Nematodes as biological control agents: part II. **Advances in Parasitology**, v.31, p. 381-431, 1992.

SALAZAR-GUTIÉRREZ, J. D.; CASTELBLANCO, A.; RODRÍGUEZ-BOCANEGRA, M. X.; TERAN, W.; SÁENZ-APONTE, A. *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* SL0708 pathogenicity in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**. 20, 1112–1121, 2017.

SELVAN, S.; CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. Density-dependant effects on entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis* and *Steinernematidis*) within an insect host. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, p. 278-284, 1993.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GAUGLER, R.; LEWIS, E. E. In vivo production of entomopathogenic nematodes. **International Journal of Nematology**, v.14, p. 13-18, 2004.

SPIRIDONOV, S.E.; SUBBOTIN, S.A. Phylogeny and phylogeography of *Heterorhabditis* and *Steinernema*. In: **Advances in entomopathogenic nematode taxonomy and phylogeny**. Hunt, D.J. e Nguyen, K.B. 438p. 413 – 427, 2016.

STOCK, P. S.; STRONG, D.; GARDNER, S. L. Identification of *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) from California with a new species isolated from the larvae of the ghost

moth *Hepialis californicus* (Lepidoptera: Hepialidae) from the Bodega Bay Natural Reserve. **Fundamental & Applied Nematology**, v. 19, n. 6, p. 585-592, 1996.

SZÁLLÁS, E.; KOCH, C.; FODOR, A.; BURGHARDT, J.; BUSS, O.; SZENTIRMAI, A.; NEALSON, K. H.; STACKEBRANDT, E. Phylogenetic evidence for the taxonomic heterogeneity of *Photorhabdus luminescens*. **Int J Syst Evol Microbiol** 47:402–407, 1997.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAILLIEZ, P. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. caribbeanensis subsp. nov., *P. luminescens* subsp. hainanensis subsp. nov., *P. temperata* subsp. khani subsp. nov., *P. temperata* subsp. tasmaniensis subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. thracensis as *P. temperata* subsp. thracensis comb. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, p. 1921-1937, 2010.

VOSS, M. Nematoides Entomopatogênicos (NEPs) como Agentes de Controle Biológico de Insetos. In:_____. **Manual de Técnicas Laboratoriais para Obtenção, Manutenção e Caracterização de Nematoides Entomopatogênicos**. ed. Embrapa Trigo. Documentos 97, p. 9-17, 2009.

WANG, Y. & GAUGLER, H. Host and penetration site location by entomopathogenic nematodes against Japanese beetle larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**. 72: 313-318, 1998.

WOUTS, W. M. Steinernema (Neoaplectana) and Heterorhabditis species. Em: Nickle, W. R. (ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, pp. 855-97, 1991.

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, v. 66, p. 302-303, 1927.

ZERVOS, S.; JOHNSON, S. C.; WEBSTER, J. M. Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema glasseri* (Nematoda: Rhabditoidea) in *Galleria mellonella*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, p.1261-1264, 1991.