FERNANDO LUIZ KAMITANI

Caracterização molecular de isolados de nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis* spp. e seus simbiosites, *Photorhabdus* spp., provenientes de Monte Negro, RO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

FERNANDO LUIZ KAMITANI

Caracterização molecular de isolados de nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis* spp. e seus simbioses, *Photorhabdus* spp., provenientes de Monte Negro, RO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Kamitani, Fernando Luiz.

Caracterização molecular de isolados de nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis* spp. e seus simbiontes, *Photorhabdus* spp., provenientes de Monte Negro, RO. / Fernando Luiz Kamitani. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Carlos Eduardo Winter.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia molecular de nematóides - Parasitologia.

Versão do título para o inglês: Molecular characterization of entomopathogenic nematodes isolates, *Heterorhabditis* spp. and its bacterial symbionts, *Photorhabdus* spp., from Monte Negro, RO, Brazil.

Descritores: 1. Parasitologia 2. Biologia (classificação) 3. Nematoides 4. *Rhabditida* 5. Bactérias entomopatogênicas 6. Controle biológico I. Winter, Carlos Eduardo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de pós-graduação em parasitologia. III. Título.

ICB/SBIB065/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):   Fernando Luiz Kamitani.

Título da Tese: Caracterização molecular de isolados de nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis* spp. e seus simbiosites, *Photorhabdus* spp., provenientes de Monte Negro, RO.

Orientador(a):   Carlos Eduardo Winter.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a)

( ) Reprovado(a)

Examinador(a):   Assinatura: .....
                                 Nome: .....
                                 Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
                                 Nome: .....
                                 Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
                                 Nome: .....
                                 Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
                                 Nome: .....
                                 Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
                                 Nome: .....
                                 Instituição: .....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **024** nas fls. **13** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter, Coordenador da Linha de Pesquisa "**Análise molecular de isolados de nematóides entomopatogênicos da família Rhabditida e suas bactérias simbiotes, provenientes de Monte Negro, RO**" do qual participou o(s) aluno(s): **Fernando Luiz Kamitani**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.03.2005**.

São Paulo, 23 de março de 2005.

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEEA.014.09

WTL/mcgn

São Paulo, 31 de março de 2009.

REF.: Protocolo nº024/05.

"Análise molecular de isolados de nematóides entomopatogênicos da família Rhabditida e suas bactérias simbiotes, provenientes de Monte Negro, RO"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 25.03.2011**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEEA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da Comissão de Ética em
Experimentação Animal - ICB /USP

Ilmo.Sr.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter

Departamento de Parasitologia

Instituto de Ciências Biomédicas -USP

À Minha Esposa
À Minha Mãe
À Mãe de Minha Mãe (*in memorian*)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter, o mais recente Livre Docente do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo. Pela confiança, tolerância, respeito e amor “disfarçados”. Pela onipresença, discussões produtivas e engrandecedoras do ponto de vista científico. Por me ensinar a fazer Ciência verdadeira e deixar de especular.

A TODOS, absolutamente todos, que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

À Minha Amada Esposa Fabiana Martinez Kamitani.

À minha família agradeço e na falta de palavras melhores para expressar meus sentimentos, cito-os nominalmente: Minha Mãe Erionilda Luiz Kamitani (Nilde); Meu Pai Luiz Ieshim Kamitani; Meus Grandes Irmãos Marco Antônio Kamitani e Ricardo Luiz Kamitani. Meu avô materno Aparecido Luiz. Minha avó/mãe materna Naidelina (Naide) Aleluia Luiz (*in memoriam*). Meus avós paternos Jiro e Massako Kamitani (*in memoriam*).

À minha família, em sua definição mais estrita até a sua definição mais ampla incluído a grande quantidade de componentes do “clã Kamitani” no Brasil e no Exterior, Especialmente a querida Tia Marta Kamitani Kurata, recentemente falecida.

À minha queridíssima Doutora Daniela Peres Almenara, que me introduziu ao laboratório e que estoicamente me aturou por todos esses anos em sua vida profissional e pessoal.

Ao Doutor Rubens Nobumoto Akamine pela minha iniciação científica, pelo treinamento, convivência exemplo e discussões sobre temas aleatórios e empolgantes, pelo menos para nós.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Nematoides : Dr Il-Young Ahn (Josué), Dra. Joselene de Moura Pereira, Dra Juliana Andreoni Nico, Ms. Thélia Rosana Janeiro-Cinquini, Maira Neves, Mario Alexandre, Carolina Rossi, Gabriel Antonini e o saudoso Adriano, pelas conversas, descontração e amizade. Fazendo deste laboratório um laboratório "feliz". Em especial à Carol, minha aliada desde o primeiro momento.

À Manoel Aparecido Peres, pelo insuperável e onipresente apoio técnico e pelos “felinos” a qualquer momento. Pelas conversas sobre tema cotidianos e sacros. Pelo amparo incondicional.

Aos professores do Departamento de Parasitologia do ICB-USP, Dr. Alejandro Katzin, Dra. Tania Katzin, Dra. Margareth Capurro-Guimarães, Dr. Arthur Gruber, Dr. Jeffrey Jon Shaw, Dr. Marcelo Barcinski, Dra Marta Teixeira, Dr. Erney F. P. de Camargo, Dra Beatriz Carboni, Dra Sirlei Daffre, Dra Alda M. B. Noronha, Dr. Ariel Sielber, Dr. Henrique Krieger e Dr. Gerhard Wunderlich, pelas contribuições acadêmicas, sugestões, discussões, convivência, tolerância e contribuições engrandecedoras e diretas à minha formação científica.

Aos professores do Departamento de Microbiologia do ICB-USP, Dr. Gabriel Padilla Maldonado e Dr. Luis Carlos Ferreira.

Ao professor do Departamento de Bioquímica do IQ-USP, Dr. Frederico Gueiros Filho.

A ABSOLUTAMENTE TODOS os colegas do Departamento de Parasitologia. Nego-me a citá-los nominalmente sob pena de incorrer em imperdoável esquecimento de alguém muito importante. Aliás, algo muito típico da minha pessoa. Não há palavras o suficiente para agradecer àqueles que me doaram o seu tempo, seu trabalho, sua companhia, seu tempo, suas idéias, suas confidências, suas experiências e finalmente um pedaço deles, hoje parte integrante de mim.

Aos amigos do Departamento de Microbiologia do ICB-USP: Juan Diego Rojas, Camila Mathias Santos, Rodrigo Tamura, Fernando Simabuco, Wilson Barros Luiz e Rafael Ciro M. Cavalcante, pelo intercâmbio de técnicas, materiais, idéias e pelas conversas.

A todos os meus amigos do IB-USP, minha primeira escala na USP.

À Dra. Claudia Dolinski pela papel de mentora e presença constante apesar da distância física entre Campos dos Goytacazes e São Paulo, e pelo exemplo de dedicação e entusiasmo. E seus alunos Ines Machado, Juan Pablo Molina, Eleodoro del Valle, entre outros.

A todos os meus amigos, dignos da definição *ipsis literis*. Recorro novamente à negativa de citá-los nominalmente.

A Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

“Epitáfio das *Galleria mellonella*, ‘voluntárias’, que doaram sua vida para o bom andamento deste trabalho”

“Ao verme que
primeiro roeu as frias
carnes do meu cadáver
dedico como saudosa
lembrança estas
Memórias Póstumas

A obra em si mesma é tudo: se te agradar, pago-me da tarefa;
se te não agradar, pago-te com um piparote, e adeus.”

“Memórias Póstumas de Brás Cubas”, Machado de Assis
 (“O Bruxo do Cosme Velho”)

RESUMO

KAMITANI, Fernando Luiz. **Caracterização molecular de isolados de nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis* spp. e seus simbioses, *Photorhabdus* spp., provenientes de Monte Negro, RO.** 2010. 110 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os isolados de nematoides entomopatogênicos provenientes do solo de Monte Negro (RO) receberam o prefixo LPP seguido de um número sequencial. As linhagens de bactérias simbioses receberam o prefixo MN como referência ao local de isolamento. As culturas dos isolados de nematoides entomopatogênicos LPP foram estabelecidas em nosso laboratório, sendo necessário cultivar também o lepidóptero *Galleria mellonella* para as infecções visando manter os nematoides em cultura. Os isolados, tanto de nematoides como das bactérias, foram identificados através do sequenciamento de genes ribossômicos (ITS 1 e 2 além do 5.8S para os nematoides e 16S para as bactérias). Análises integradas, abrangendo morfologia (em colaboração com a Dra. Claudia Dolinski e Inês Machado) e análises filogenéticas permitiram a identificação dos nematoides. Essas análises morfomoleculares mostram que as linhagens não podem ser descritas como novas espécies, baseadas apenas no local de isolamento, mas como pertencentes à espécies já descritas e bem caracterizadas. As linhagens de nematoides foram identificadas como pertencentes a duas espécies do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida): *Heterorhabditis baujardi* (LPP5, 7, 8, 10 e 11) *Heterorhabditis indica* (LPP1, 2, 3, 4, 9). A bactéria entomopatogênica simbiote isolada a partir do nematoide *Heterorhabditis baujardi* linhagem LPP7 foi identificada como pertencente à espécie *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* linhagem MN7. Análises filogenéticas mostram que há similaridade entre o isolado bacteriano e as outras linhagens já descritas de *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens*. Ao mesmo tempo em que eram isoladas as bactérias simbioses, ocorreu o isolamento de outra espécie de bactéria forética dos nematoides entomopatogênicos, identificada após sequenciamento parcial do 16S, como pertencentes ao gênero *Ochrobactrum*. As linhagens isoladas foram denominadas OMN2, OMN3, OMN4.

Palavras-chave: Parasitologia. Biologia (Classificação). Nematoides. Rhabditida. Bactérias entomopatogênicas. Controle biológico.

ABSTRACT

KAMITANI, Fernando Luiz. **Molecular characterization of entomopathogenic nematodes isolates, *Heterorhabditis* spp. and its bacterial symbionts, *Photorhabdus* spp., from Monte Negro, RO, Brazil.** 2010. 110 p. PhD Thesis (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The entomopathogenic nematodes isolates from Monte Negro (RO) soils received the prefix LPP followed by a sequential number. The strains of bacterial symbionts received the prefix MN as a reference to its isolation site. Cultures of LPP entomopathogenic nematodes were established in our laboratory and the need for suitable hosts were supplied by cultivating the lepidopteran *Galleria mellonella*. Nematode and bacterial isolates were identified through ribosomal genes (ITS 1 and 2, 5.8S for nematodes and 16S for bacteria) sequencing. Integrated analysis, including morphology (in collaboration with Dr. Claudia Dolinski and Inês Machado) and a phylogenetic approach allowed the identification of nematodes. These morpho-molecular analysis clearly showed that our strains can not be described as new species, solely based on the isolation site criteria. It should be described as belonging to previously described and well characterized species. The nematode strains were identified as belonging to two species of the genus *Heterorhabditis* (Rhabditida): *Heterorhabditis baujardi* (LPP5, 7, 8, 10 and 11) *Heterorhabditis indica* (LPP1, 2, 3, 4, 9). The entomopathogenic bacterial symbiont isolated from the nematode *Heterorhabditis baujardi* strain LPP7 was identified as belonging to the species *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* strain MN7. Phylogenetic analysis showed similarities between isolated bacterial strains and other previously described *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* strains. In parallel work, along with bacterial symbionts isolation, other entomopathogenic nematodes foretic bacteria were isolated and identified after partial sequencing of 16S, as belonging to the genus *Ochrobactrum*. The isolated strains were named OMN2, OMN3, OMN4.

Keywords: Parasitology. Biology (Classification). Nematodes. Rhabditida. Entomopathogenic Bacteria. Biological control.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação das diferentes polimerases de DNA utilizadas.....	48
Tabela 2- Oligonucleotídeos empregados para NEP.....	50
Tabela 3- Oligonucleotídeos empregados para as bactérias estudadas.....	51
Tabela 4- Matriz de distância.....	63
Tabela 5- Linhagens de NEP identificadas.....	65
Tabela 6- Linhagens de bactérias estudadas.....	72
Tabela 7- Linhagens de bactérias isoladas.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Histórico da classificação taxonômica do filo Nematoda.....	21
Figura 2- Relações taxonômicas do filo Nematoda.....	22
Figura 3- Vista do nematoide <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	24
Figura 4- Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos.....	26
Figura 5- Representação diagramática de uma região do cistron ribossômico.....	36
Figura 6- Localização de um dos conjuntos de rRNA no genoma.....	37
Figura 7- Armadilha modificada de White.....	42
Figura 8- Esquema do cistron ribossômico.....	49
Figura 9- Sequência da fita não transcrita de um dos genes do rRNA 16S de <i>P. luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> , linhagem TT01.....	51
Figura 10- PCR utilizando os iniciadores SSU-18PF e LSU-NC2	62
Figura 11- Alinhamento das sequências do ITS1 das linhagens LPP	63
Figura 12- Análise filogenética de oito espécies de <i>Heterorhabditis</i> e dos isolados LPPn.....	64
Figura 13- PCR e análise de restrição do fragmento de DNA do SSU rRNA amplificado a partir de DNA de MN07.....	68
Figura 14- Mapas de restrição do SSU rDNA de diferentes gêneros de γ -proteobactérias.....	69
Figura 15- Alinhamento das sequências correspondentes às helices e alças do SSU-rRNA de <i>P. luminescens</i>	70
Figura 16- Cladogramas das sequências de SSU-rRNA de <i>Photorhabdus</i>	71
Figura 17- Estrutura secundária teórica do rRNA 16S de <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>luminescens</i>	73

SIGLAS, ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

B.O.D.	“Biochemical Oxygen Demand”; Demanda Bioquímica de Oxigênio.
Da	Daltons
DNA	Ácido desoxirribunucleico (ADN)
dNTP	Desoxirribunucleosídeos trifosfatados
dsDNA	“double strand” DNA, DNA dupla-fita
dsRNA	“double strand” RNA, RNA dupla-fita
EDTA	Etilenodiaminotetracetato de sódio
g	Aceleração da gravidade (980,665 cm·s ⁻²)
GFP	Green Fluorescent Protein
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo
JI	Juvenil Infectante
Kb	Mil pares de bases nitrogenadas
KDa	Massa molecular de proteínas = 1000 daltons
L (1-4)	Larva (1-4)
LB	Meio de cultura bacteriano de Luria-Bertani (líquido ou sólido-agar)
LPP	Laboratório de Proteção de Plantas, antigo nome do Laboratório da Dra. Claudia Dolinski localizado na UENF (<i>Universidade Estadual do Norte Fluminense</i>)
LSU-rDNA	DNA da subunidade menor do ribossomo
LSU-rRNA	RNA da subunidade menor do ribossomo
MacConkey	Meio de cultura bacteriano de MacConkey (líquido ou sólido-agar)
MN7	Denominação do isolado de bactérias simbiotes pertencentes ao gênero <i>Photorhabdus</i>
m/v	Massa por volume
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NEP	Nematóide entomopatogênico
OMNx	Denominação dos isolados das bactérias gram positivas pertencentes ao Gênero <i>Ochrobactrum</i>
pb	Pares de bases nitrogenadas
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	“Polymerase Chain Reaction”; Reação em Cadeia da Polimerase
pH	- log a _H ⁺ (em soluções diluídas de ácido pH = -log[H ⁺])
RPM	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease A pancreática
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SSU-rDNA	DNA da subunidade menor do ribossomo
SSS-rRNA	RNA da subunidade menor do ribossomo
T	Concentração total de monômeros de acrilamida e bisacrilamida em % (m/v)
TAE	Tampão de Tris-Acetato-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampão de Tris-Boro-EDTA
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilenodiamina

T _m	Temperatura em que metade das moléculas de DNA encontra-se desnaturada .
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U. V.	Ultra violeta
v/v	Volume por volume
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 NEMATOIDES.....	20
1.2 NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (NEPs).....	24
1.3 BACTÉRIAS SIMBIONTES DE NEPs.....	30
1.4 GENES RIBOSSÔMICOS COMO MARCADORES TAXONÔMICOS.....	35
1.5 OBJETIVOS.....	37
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1 BACTÉRIAS.....	40
2.1.1 Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas.....	40
2.1.2 Preparação de células de <i>E. coli</i> quimio-competentes das linhagens DH5- α e DH10B.....	40
2.1.3 Transformação de células de <i>E. coli</i> quimio-competentes das linhagens DH5- α e DH10B.....	40
2.1.4 Isolamento da linhagem bacteriana MN7.....	41
2.1.5 Denominação e manutenção da linhagem MN7.....	41
2.1.6 Caracterização bioquímica e de perfil de resistência a antibióticos de MN7.....	42
2.2 NEMATOIDES	42
2.2.1 Cultura e manutenção de nematoides entomopatogênicos.....	42
2.3 INSETOS.....	42
2.3.1 Insetos utilizados.....	43
2.4 MANIPULAÇÃO E ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	43
2.4.1 Plasmídeos.....	43
2.4.2 Purificação de Plasmídeos por Lise Alcalina.....	44
2.4.3 Purificação de Plasmídeos em gradiente de Cloreto de Césio.....	44
2.4.4 Purificação de Plasmídeos – Kit SV Plus Wizard® Miniprep (Promega, E.U.A.).....	45
2.4.5 Purificação de Plasmídeos – Kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen, Alemanha).....	45
2.4.6 Extração de Ácidos Nucléicos das bactérias isoladas	45
2.4.6.1 Extração de DNA Genômico das bactérias do Gênero <i>Photorhabdus</i>	45
2.4.7 Extração de Ácidos nucleicos dos nematoides	46
2.4.7.1 Extração de DNA dos nematoides com tampão de lise.....	46
2.4.7.2 Extração de DNA dos nematoides - Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System Promega®	47
2.4.7.3 Extração de RNA dos nematoides.....	47
2.4.8 Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase).....	48
2.4.8.1 Clonagem dos produtos das PCR.....	52
2.4.9 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	53
2.4.10 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida.....	54
2.4.11 Sequenciamento.....	54
2.4.12 Bioinformática.....	55
2.6 SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	56
3 RESULTADOS.....	60
3.1 NEMATOIDES.....	61
3.1.1 Análise do ITS do rDNA de diferntes nematoides.....	61
3.1.2. Análise das sequências de ITS de nematoide.....	62
3.1.3. Linhagens de nematoides identificadas.....	65
3.2 BACTÉRIAS.....	65
3.2.1 Isolamento, manutenção e caracterização bioquímica MN7.....	65

3.2.2 Caracterização molecular da linhagem MN7.....	67
3.2.3 Determinação da estrutura secundária do rRNA 16S do simbionte.....	72
3.2.4 Isolamento de linhagens de <i>Ochrobactrum sp.</i>	74
3.2.5 Caracterização molecular das linhagens OMNn.....	74
4. DISCUSSÃO	76
4.1 NEPS E A BIODIVERSIDADE.....	77
4.2 ISOLAMENTO DE NEPS.....	78
4.3 BIOGEOGRAFIA DO GÊNERO <u>HETERORHABDITIS</u>	79
4.4 GENÔMICA DE <u>HETERORHABDITIS</u>	80
4.5 GENÔMICA DE <u>PHOTORHABDUS</u>	80
4.6 ESTABELECIMENTO DE ORGANISMOS MODELO.....	81
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	98
ANEXO A.....	99
ANEXO B.....	100

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 NEMATOIDES

Os nematoides são vermes cilíndricos, alongados, fusiformes, pseudoceloma-dos, com o corpo geralmente não ornamentado que pertencem ao filo *Nematoda* (WRIGHT, 1991). A distribuição geográfica dos nematoides é cosmopolita, abrangendo todos ecossistemas conhecidos e praticamente todos os nichos disponíveis na biosfera, desde o fundo dos oceanos, nas suas fontes termais até as geleiras da Antártida além de parasitarem outros Metazoários e plantas. Ocupam os ambientes marinho, dulcícola e terrestre (críptico) (RUPPERT; BARNES, 1993), podendo ser considerados, neste último caso, como troglóbios. Compõem parte considerável da biomassa e da diversidade de organismos. São os metazoários mais abundantes no planeta (HODDA, 2007).

Fósseis de nematoides são raros e os mais antigos datam de 120 a 135 milhões de anos atrás (MYa). Alguns mais recentes, preservados em âmbar datam de 20 a 30 MYa (POINAR JR, 1984, 2002). A escassez de registros pode ser explicada pela ausência de estruturas morfológicas propícias para a fossilização, sendo a maioria dos registros indiretos, como no caso dos fósseis em âmbar onde os nematoides estão associados a insetos. Este é um outro fator complicador, pois o registro está restrito apenas a esse grupo dos nematoides entomofílicos e portanto não pode ser considerado representativo da evolução do grupo como um todo.

Estudos assumindo relógios moleculares estimam que a divergência entre o filo *Nematoda* e os ancestrais que dariam origem aos vertebrados, ocorreu há 960 MYa. A divergência dos Rhabditida, um dos mais importantes clados deste filo, foi datada em 550 MYa. Resultados recentes mostraram que o filo *Nematoda* possui afinidades com os Nematomorpha, Gastrotrichia, Kinorhyncha e Rotifera (HODDA, 2007).

O Filo *Nematoda* (do grego νήματος = fio de metal) é reconhecido como segundo grupo de metazoários com a maior quantidade de espécies do planeta, a maior parte delas desconhecidas (99,74%). Estima-se que existam 10⁶ espécies de nematoides, dentre as quais 26.000 são conhecidas atualmente (BLAXTER, 2003).

O Filo *Nematoda* foi tradicionalmente subdividido em duas Classes distintas, a saber (**Figura 1**):

- Classe Secernentea que inclui os Rhabditida, Tylenchida, e Aphelenchida, são

primariamente terrestres e de água doce (NICHOLAS, 1984).

- Classe Adenophorea, são predominantemente marinhos e contêm relativamente poucos taxa parasitas de animais e plantas, com a exceção de um grande taxon, os Mermithoidea, todos parasitas de invertebrados (NICHOLAS, 1984).

Figura 1- Histórico da classificação taxonômica do filo Nematoda.
FONTE: Modificado de LITVAITIS et al., 2000.

Os Nematoda e os Arthropoda estão incluídos entre os Ecdysozoa, um grupo de animais que apresentam mudas periódicas de exoesqueleto e que é apoiado por evidências moleculares (AGUINALDO et al., 1997). Posteriormente outros estudos confirmaram o monofiletismo dos Ecdysozoa (MALLAT; GIRIBET, 2006).

As relações taxonômicas atualmente aceitas no Filo Nematoda (**Figura 2**) estão baseadas nos trabalhos de Blaxter et al. (1998) e Dorris et al. (1999), que utilizaram caracteres moleculares como as sequências do rRNA da subunidade menor do ribossomo (SSU-rRNA). Meldal et al. (2007) também utilizaram SSU-rRNA com análises Bayesianas e de distâncias para construir árvores que abrangiam um número maiores de OTUs. Analisando-se estas árvores é possível perceber a incongruência com a classificação clássica, puramente morfológica e fenética. Blaxter et al. (1998) propõem a divisão dos Nematoda em sete clados, ao invés das duas classes tradicionais. Já Dorris et al. (1999) reposicionam alguns taxa, mas

preservam a topologia básica da primeira e propõem que através dos dados de SSU-rRNA não é possível determinar o grau de relacionamento entre as três classes do Filo *Nematoda* (Dorylaimia, Enoplia e Chromadoria). O monofiletismo de Enoplia e Dorylaimia também é destacado.

Figura 2- Relações taxonômicas do filo Nematoda. Cladogramas representando as relações taxonômicas do filo Nematoda. O cladograma da esquerda representa os dados apresentados por Dorris et al. (1999), já o da direita representa os dados apresentados por Holterman et al. (2006), que ampliam a quantidade de OTUs estudadas.

Um grupo animal com tamanha diversidade, até mesmo com grande complexidade genética e distribuição cosmopolita tem indubitavelmente grande importância ecológica e econômica (HODDA, 2007).

O impacto negativo dos nematoides nas atividades econômicas humanas é relevante. Pode-se mencionar perdas estimadas em 10% das colheitas unicamente provocadas por nematoides parasitas de plantas (HODDA, 2007), ou para quantificar em termos monetários, num exemplo isolado relatam-se perdas de US\$ 251,6 milhões, apenas na cultura de soja nos EUA, entre os anos de 2003 e 2005 (WRATHER; KOENNING, 2006). Some-se isso às perdas provocadas por nematoides parasitas de seres humanos e seus rebanhos, cujas estimativas são igualmente elevadas, e pode-se perceber o tamanho dos danos. Mesmo nematoides de vida livre podem causar problema significativos, como por exemplo afetar a qualidade da água potável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Entretanto há o impacto positivo da existência dos nematoides, como os serviços ecológicos de ciclagem dos nutrientes e da matéria orgânica, disponibilizando-os para seu

posterior aproveitamento na cadeia trófica. Além disso, a diversidade de espécies presente num determinado ecótopo pode ser indicador confiável das condições ambientais (BONGERS, T.; BONGERS, M., 1998). Outro aspecto positivo é a utilização dos NEPs (nematoides entomopatogênicos) como alternativa para os pesticidas, ou seja, no controle biológico de insetos praga para a agricultura (SMART JR., 1995).

Apesar desta inegável importância a realidade do conhecimento científico sobre os nematoides não é equivalente a essa importância. Os conhecimentos sobre o filo ainda são relativamente escassos face ao restante do conhecimento biológico acumulado sobre os demais protostômios.

Devido ao interesse médico-veterinário, os nematoides mais estudados são os que parasitam o homem, seus animais domésticos, ou suas plantas cultivadas. Apesar disso, a partir da década de 1960, dentre os então pouco estudados nematoides de vida livre em geral, *Rhabditis* (*Caenorhabditis*) *elegans* (MAUPAS 1900) Osche 1952 (*Rhabditida*) atraiu a atenção de pesquisadores com interesses diversos (NICHOLAS, 1984) e com o seu estabelecimento como um organismo modelo (DAVIS et al., 2004) o conhecimento sobre nematoides cresceu vertiginosamente, culminando com o primeiro sequenciamento completo de um genoma de metazoário (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Posteriormente outros cinco nematoides, também de vida livre, tiveram seus genomas completamente sequenciados: *C. briggsae* (DOUGHERTY e NIGON 1949) Dougherty 1953 em 2003 (STEIN et al., 2003); *C. remanei* (SUDHAUS 1974) em 2007 <http://genome.wustl.edu/genomes/view/caenorhabditis_remanei/>; *C. japonica* (KIONTKE, HIRONAKA e SUDHAUS 2002) em 2008 <http://genome.wustl.edu/genomes/view/caenorhabditis_japonica/>; *C. brenneri* (KIONTKE; SUDHAUS, 2007) em 2008 <http://genome.wustl.edu/genomes/view/caenorhabditis_brenneri/> e *Pristionchus pacificus* (SOMMER et al. 1996) em 2008 (DIETERICH et al., 2008).

Existem muitos tipos de associações entre os nematoides e os artrópodes, desde a forese até o parasitismo e a patogênese (POINAR JR., 1990). Segundo Poinar JR. (1983) o parasitismo de invertebrados surgiu independentemente em quatro grupos principais de nematoides.

1. O primeiro grupo é composto pelos *Rhabditida*, que deram origem aos *Oxyurida* intestinais bem como aos *Steinernematidae* e *Heterorhabditidae*.
2. e 3. O segundo e terceiro grupos compreendem os *Tylenchida* e os *Aphelenchida*, originalmente parasitas de plantas. Estas formas são caracterizadas pela presença de

um estomatoestilete, usado para perfurar as células vegetais, mas que em muitos parasitas de invertebrados foi modificado para penetração no hospedeiro. Dentre estes nematoides se encontram os Allantonematidae, Sphaerulariidae e Entaphelenchidae como descendentes dos fitoparasitas originais.

4. O quarto grupo compreende os Mermithida, que evoluiu de membros predadores dos Dorylaimida. Eles mantiveram o estilete, que é usado para penetrar a parede do corpo do seu hospedeiro. A infecção é iniciada pelo J2 (juvenil de segundo estágio) depois que ele sai do ovo (a primeira muda ocorre antes da eclosão).

1.2 NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (NEPs)

Associações, espécie-específicas e simbióticas, com bactérias tornaram os nematoides capazes de invadir e matar um grande número de espécies de insetos, originando o hábito entomopatogênico (**Figura 3**). O termo designa a capacidade de gerar patogênese nos insetos, tanto por ação do nematoide, que libera toxinas (GAUGLER; KAYA, 1990; NGUYEN; HUNT, 2007), quanto pela ação das bactérias associadas, que se reproduzem apesar do sistema imune do inseto, incapaz de barrar-lhes o crescimento. A septicemia decorrente ocasiona a morte do inseto num período de 24 a 48 horas (FORST et al., 1997; GAUGLER, 2002; NGUYEN; HUNT, 2007).

Figura 3- Vista da parte anterior de um juvenil infectante do nematoide *Heterorhabditis bacteriophora*. Notar as bactérias do gênero *Photobacterium* expressando GFP e presentes no tubo digestivo.
FONTE: Extraído de CICHE, T., 2007. Sob licença Creative Commons Attribution License.

Uma condição básica para que um animal seja considerado um parasita é que o hospedeiro não seja levado à morte por ação direta do parasita. Em contraposição a isso temos a relação presa-predador, em que diversas presas podem ser mortas por um único predador. Aqui, o resultado final da predação é a morte da presa. No caso dos nematoides entomopatogênicos, um organismo ocasiona a morte obrigatória do inseto hospedeiro, o que poderia colocá-los numa classe separada das duas acima citadas, que é a dos parasitoides (BUSH et al., 2001). Entretanto, este tipo de hábito não pode ser considerado como

parasitóide (*Mermithidae*, p. ex.) segundo a definição de Bush et al., pois (1) o nematoide está associado mutualisticamente com um patógeno bacteriano (BOWEN et al., 1998) que é quem na verdade mata o inseto e (2) a patogenicidade da bactéria tem uma grande influência no resultado final da infecção (EHLER, 1990).

Assim sendo, o nematoide poderia ser considerado como o vetor de uma bactéria entomopatogênica. Outros autores afirmam ainda que a relação simbiótica entre o nematoide e a bactéria pode ser considerada uma ectosimbiose, a mesma que ocorre entre insetos e fungos filamentosos, como por exemplo formigas e seus cultivares de fungos. As características comuns ao ciclo dos NEPs e a uma ectosimbiose levantadas por Wilkinson e Hay (1997) são a fase estável, ou seja a infecção/alimentação e a fase móvel que é o transporte ativo.

Outro aspecto biológico de grande interesse seria a convergência adaptativa que pode ter ocorrido no surgimento do hábito entomopatogênico. Devido à considerável distância filogenética entre os dois gêneros de NEPs (*Heterorhabditis* e *Steinernema*) mais estudados, a hipótese mais provável é a do surgimento independente do hábito.

Quando o nematoide penetra a cutícula do inseto (**Figura 4**), regurgita as células bacterianas, liberando-as na hemolinfa. Assim que são liberadas, colonizam os tecidos, mantendo o tubo digestivo intacto de modo a evitar a contaminação por outras bactérias presentes na luz do tubo. Segundo Silva et al. (2002) a dinâmica da colonização do inseto por *Photorhabdus* começa pela reprodução na hemolinfa e no tubo digestivo médio, com a posterior colonização do corpo gorduroso. Os nematoides entomopatogênicos alimentam-se dos nutrientes liberados e das próprias bactérias, que por sua vez já digeriram os tecidos do inseto morto. Diversas ordens e famílias de insetos são suscetíveis à infecção pelos nematoides entomopatogênicos.

Figura 4- Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis*.

Os dois gêneros de nematoides entomopatogênicos associados a bactérias pertencem a duas famílias diferentes: Heterorhabditidae (que contém um único gênero: *Heterorhabditis*) e Steinernematidae (cujo gênero entomopatogênico é *Steinernema*). As famílias pertencem a ordens distintas: *Heterorhabditis* é colocada na ordem Rhabditida (família Heterorhabditidae) e *Steinernema* na ordem Panagrolaimida (família Steinernematidae), como descrito por Hodda (2007). De acordo com a classificação, baseada no LSU-rRNA (18S), proposta por Blaxter et al. (1998) e Dorris et al. (1999) a família Steinernematidae é colocada no clado IVa e a família Heterorhabditidae no clado V. No clado V encontramos também espécies de vida livre (como *Caenorhabditis elegans* e *Oscheius tipulae*), espécies parasitas do homem (como *Ancylostoma duodenale*) e espécies parasitas de animais (como *Haemonchus contortus*). De acordo com a classificação proposta por Meldal et al. (2007) baseada no SSU-rRNA a família Steinernematidae assim como a família Heterorhabditidae estão localizadas no Clado A composto pela ordem Rhabditida, juntamente com a ordem Plectida.

Há ainda, entre os nematoides entomopatogênicos, um terceiro gênero denominado *Neosteinerema*, composto por única espécie, *Neosteinerema longicurvicauda* (NGUYEN;

SMART JR., 1994) e cujas linhagens cultivadas em laboratório foram perdidas (NGUYEN, comunicação pessoal)¹.

A morfologia dos NEP é bastante similar aos rabdtídeos bacteriívoros de vida livre (GAUGLER; KAYA, 1990; NGUYEN; HUNT, 2007). Como outros nematoides, aqueles de hábitos entomopatogênicos passam por quatro estádios larvais, denominados J1-J4 (**Figura 4**). Todos eles acontecem dentro do cadáver do inseto onde ele se desenvolve numa cultura pura de sua bactéria simbiote.

Após um número determinado de gerações que varia entre *Heterorhabditis* e *Steinernema*, surge o estágio de juvenil infectante (JI), que é liberado para o meio externo, onde irá infectar o seu próximo hospedeiro. O estágio JI corresponde ao estágio de “dauer larva” dos nematoides rabdtídeos de vida livre e carrega na luz de seu tubo digestivo as bactérias simbiotes. Morfologicamente, os JI do Gênero *Heterorhabditis* caracterizam-se por manter a cutícula do estágio dois (J2) e por possuírem os orifícios bucal e anal fechados. Possuem também dois apêndices bucais alterados, designados como dentes ou ganchos sub ventrais, utilizados para facilitar a penetração nos tecidos do inseto hospedeiro (GAUGLER; KAYA, 1990; NGUYEN; HUNT, 2007).

Quanto ao ciclo biológico os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* diferem em pontos importantes. Em *Steinernema*, após a infecção os JI se desenvolvem em fêmeas anfigmíticas (dotadas apenas do aparelho genital feminino) ou machos, sendo o ciclo de vida dióico até o fim (POINAR JR., 1990). Stock et al. (2004) descreveram a ocorrência na Indonésia da primeira espécie que produz fêmeas hermafroditas na primeira geração pós infecção em *Steinernema*, denominada *Steinernema hermafroditum* Stock. No gênero *Heterorhabditis*, após a infecção cada JI se desenvolve numa fêmea hermafrodita protândrica, mas nunca em fêmea ou macho. No entanto, a segunda geração é composta de fêmeas e machos em ambos os gêneros (POINAR JR., 1990). Esses ciclos lembram os ciclos homogônicos e heterogônicos de espécies do gênero *Strongyloides*, que são relacionadas ao gênero *Steinernema* (DORRIS et al., 2002).

Uma vez que no gênero *Heterorhabditis* a primeira geração de vermes no cadáver do inseto é composta somente de fêmeas hermafroditas, não ocorre cruzamento e a vulva não é utilizada no acasalamento. Apenas alguns ovos são postos pelas fêmeas hermafroditas e

---

¹NGUYEN, K. B. Campinas, 2004 (comunicação pessoal em curso realizado no Centro Experimental Central do Instituto Biológico)

provavelmente não geram animais viáveis (CICHE et al., 2008), todos os outros eclodem dentro do útero (ovoviviparidade). O grande número de ovos que eclodem supera em muito a capacidade volumétrica do corpo da fêmea hermafrodita levando a ruptura do seu corpo (endotoquia matricida) (EHLERS; JOHNIGK, 1999a,b; SICARD et al., 2004). Todas as fêmeas de *Steinernema* depositam alguns ovos nos estágios iniciais (ovíparas) e se tornam ovovíparas mais tarde (POINAR JR., 1990).

A endotoquia matricida é um fenômeno comum em rhabditídeos, ocorrendo também em *C. elegans*, onde a postura dos ovos é controlada por uma série de sinais ambientais. Estímulos mecânicos, meio hipertônico e escassez de alimentos no meio de cultura são sabidamente inibidores da postura de ovos (SCHAFER, 2005). Existem muitos mutantes de *C. elegans*, de genes que controlam o desenvolvimento da vulva, que apresentam o fenômeno de endotoquia matricida, que neste caso leva o nome de “bag of worms” (PODBILEWICZ, 2007). Em *Heterorhabditis*, as fêmeas anfimícticas da segunda geração parecem ser unicamente vivíparas e após a fertilização a vulva não é funcional (EHLERS; JOHNIGK, 1999a, b; SICARD et al., 2004). Trabalhos recentes em *Heterorhabditis* indicam que transmissão das bactérias ocorre no intestino da fêmea hermafrodita, após as bactérias atravessarem as células distais do intestino da fêmea, o que torna a endotoquia matricida em *Heterorhabditis* uma forma de manter em um ambiente restrito e controlado a aquisição das bactérias simbiotes pelos juvenis infectantes (JIs) (CICHE et al., 2008).

Durante o ano de 2005 o NHGRI (National Human Genome Research Institute) dos EUA liberou financiamento para o início do sequenciamento 6X ou “high-quality draft” do genoma de *Heterorhabditis bacteriophora*. Atualmente, o pirosequenciamento utilizando o sequenciador 454 (Roche Applied Science, EUA) está terminado <http://genome.wustl.edu/genomes/view/heterorhabditis_bacteriophora/>. Os dados gerados por este projeto serão importantes para a compreensão da relação parasita-hospedeiro no gênero *Heterorhabditis*, bem como para estudos de evolução e distribuição geográfica do gênero (CICHE, 2007). O grupo de Paul Sternberg na University of California - Los Angeles (EUA) foi capaz de mostrar que o fenômeno de RNAi (interferência de RNA), caracterizado em *C. elegans* (AHRINGER et al., 2006), também está presente em *H. bacteriophora* (CICHE; STERNBERG, 2007).

Um outro aspecto importante do estudo de nematoides entomopatogênicos está relacionado com a identificação das espécies, linhagens de nematoides e suas bactérias associadas.

Tradicionalmente em parasitologia, isolado designa uma amostra, clonal ou não, de

exemplares de uma mesma espécie, que é mantida no laboratório, seja em meio de cultura, seja por passagem em hospedeiro. Já o termo linhagem ("strain" em inglês) designa um isolado que já sofreu um processo de triagem preliminar, embora ainda não configure uma nova espécie. O conceito de linhagem é bastante difundido e usado para se referir a um grupo dentro de uma espécie, cujos indivíduos possuem certas características em comum, tais como hospedeiros preferenciais, virulência, persistência, capacidade de encontrar o hospedeiro, e tolerância a condições ambientais. A idéia de que muitas, talvez a maioria, das espécies de parasitas, incluindo os nematoides entomopatogênicos, existem como um complexo de linhagens se tornou amplamente aceito desde a década de 1980 (HOMINICK; REID, 1990).

Um problema fundamental no estudo da coevolução parasita-hospedeiro é a reconstrução da história dessa associação. É importante saber até que ponto hospedeiro e parasita co-evoluíram (associação por descendência) e até que ponto parasitas mudaram de hospedeiros (associação por colonização). Estes processos, combinados com especiação e extinção independentes de ambos os membros da simbiose, deixarão seus traços nas filogenias dos hospedeiros e dos parasitas (PAGE; HOLMES, 1998). Se os steinernematídeos e heterorabditídeos evoluíram junto com alguns dos artrópodes não insetos tais como os Diplopoda e Arachnida, eles poderiam ter aparecido no Devoniano, cerca de 375 milhões de anos. Infecção experimental de alguns aracnídeos atuais por esses nematoides apóia essa possibilidade (THOMAS, POINAR JR., 1985).

Portanto são características que conferem aos nematoides entomopatogênicos potencial para uso no controle biológico de pragas:

1. Capacidade exclusiva de transportar bactérias simbiontes, pertencentes aos Gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, dentro do trato digestivo e introduzi-las na hemolinfa/hemoceloma dos insetos atacados;
2. Capacidade única dentre os entomopatógenos de infectar um amplo espectro de ordens e famílias de insetos;
3. Podem ser cultivados industrialmente, possibilitando produção em larga escala;

Tais características permitem que os nematoides entomopatogênicos sejam empregados com relativo sucesso no controle de insetos que são pragas agrícolas, principalmente as que apresentem estágios larvais crípticos (enterrados no solo).

Os isolados de nematoides entomopatogênicos estudados apresentam um interesse adicional, além do simples levantamento e catalogação da biodiversidade, pois apresentam potencialidades para um possível aproveitamento econômico para o controle biológico de insetos considerados pragas da agricultura. O reconhecimento e aplicação de espécies nativas

no controle biológico e manejo integrado de culturas é altamente recomendável, em oposição à introdução de organismos exóticos, dada a menor possibilidade de impactos ecológicos negativos, oriundos da introdução de espécies exóticas (GAUGLER, 2002; SHAPIRO-ILAN; GAUGLER, 2002).

Como podemos ver, diversas questões ainda precisam ser respondidas em relação aos nematoides entomopatogênicos. Todas são importantes para compreender melhor a biologia destas espécies (GAUGLER, 2002; NGUYEN; HUNT, 2007). No Brasil, poucos estudos foram realizados sobre nematoides entomopatogênicos nativos. A primeira descrição taxonômica de uma espécie entomopatogênica isolada no Brasil foi feita por Pereira em 1937 e era a única até recentemente, quando *Heterorhabditis amazonensis* foi descrito por Andaló et al. em 2006. O interesse por nematoides entomopatogênicos ressurgiu no Brasil como uma alternativa para o controle biológico de insetos-pragas e vetores (DOLINSKI et al, 2008).

Em outros países, a utilização de nematoides entomopatogênicos para controle biológico de pragas remonta ao fim do século XIX (EHLER, 1990). Atualmente há empresas especializadas na produção de formulações contendo NEPs, para aplicações no campo, ainda com utilização restrita a culturas de elevado valor agregado, dado o elevado custo financeiro da aplicação. Entretanto os resultados obtidos são bastante positivos, reduzindo grandemente a quantidade de defensivos químicos aplicados, e por conseguinte, os efeitos decorrentes da sua aplicação como a geração de resíduos que contaminam o solo e a consequente acumulação nas cadeias tróficas. Há toda uma literatura agrônoma enfocando estudo de casos onde ocorre aplicação a campo e o relato dos resultados obtidos (GAUGLER, 2002; GAUGLER; KAYA, 1990).

1.3 BACTÉRIAS SIMBIONTES DE NEPs

Foram descritos dois gêneros de bactérias, associadas a estes nematoides: *Xenorhabdus*, associado ao gênero *Steinernema*; e *Photorhabdus*, associado ao gênero *Heterorhabditis*, ambos os gêneros compostos por γ -proteobactérias gram-negativas (FORST et al., 1997). Inicialmente descrito como pertencente ao gênero *Xenorhabdus*, o gênero *Photorhabdus* foi posteriormente desmembrado, constituindo um gênero isolado (BOEMARE et al., 1993).

De acordo com French-Constant et al. (2003), o ciclo de simbiose-parasitismo entre *Photorhabdus*/nematóide/inseto pode ser dividido em três estágios (**Figura 4**):

- I. No primeiro estágio, o nematoide existe como um JI, resistente ao estresse ambiental, e que pode sobreviver livre no solo.
- II. No segundo estágio, as bactérias se multiplicam dentro do cadáver até uma alta densidade celular e entram na fase pós-exponencial de crescimento, equivalente a fase estacionária em cultura. Durante este estágio, a bactéria libera diversas exoenzimas e toxinas. Esses fatores levarão à "bioconversão" do inseto. Este passo é essencial na simbiose e para a capacidade reprodutiva dos nematoides.
- III. Finalmente, o terceiro estágio está associado com a formação do JI, do nematoide e a colonização deles pela sua bactéria associada. *In vivo*, o JI normalmente se desenvolve a partir da terceira geração de nematoides, sugerindo que a formação do JI é controlada talvez por mensagens originadas nas bactérias. Quando *Heterorhabditis* sem bactérias (nematoides axênicos) são expostos a bactérias isoladas de uma linhagem diferente de nematoide, os vermes podem, até certo ponto, crescer e se reproduzir. No entanto, estas bactérias raramente são retidas pelo JI e dados do grupo de French-Constant sugerem que a superfície externa da bactéria é importante para a interação com o nematoide

O gênero *Photorhabdus* possui a única espécie de bactéria terrestre que é bioluminescente. Um papel possível para a bioluminescência pode ser impedir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no cadáver do inseto, pois a luciferase possui uma alta afinidade por oxigênio molecular e pode competir com sucesso pelo O₂ disponível com enzimas envolvidas na respiração aeróbica (FRENCH-CONSTANT et al., 2003). No entanto ainda não existem evidências experimentais para apoiar a hipótese sobre o papel da luz emitida por *Photorhabdus*, até por que existem linhagens que não luminescentes.

Um dos fenótipos mais interessantes dos insetos infectados por *Photorhabdus*, juntamente com a emissão de luz pelo cadáver, é que sua hemolinfa não se melaniza quando exposta ao ar, por exemplo quando este inseto é machucado. No entanto, não se sabe quais os fatores bacterianos envolvidos e em que ponto da cascata de ativação da fenol-oxidase eles agem (FRENCH-CONSTANT et al., 2003).

Foi proposto que a associação monoxênica entre o nematoide e seu simbionte é devida a compostos antimicrobianos como o estilbeno (3,5-dihidróxi-4-isopropilestilbeno-ST) e o carbapenemo (ácido 1-carbapeno-2-em-3-carboxílico) produzidos pelo simbionte durante a reprodução do nematoide no inseto (BODE, 2009; DERZELLE et al., 2002; WILLIAMS, THOMAS; CLARKE, 2005). Acredita-se que esses compostos antimicrobianos impedem o crescimento de outras bactérias no cadáver do inseto, além de inibir o sistema imune do inseto (ELEFTherianos, et al. 2007).

A despeito do conceito de que apenas a bactéria simbiote está presente no tubo digestivo do nematóide, Jackson et al. (1995) mostraram que 10 das 12 linhagens de *Heterorhabditis* eram mantidas em associações dixênicas com *Photorhabdus* spp. e *Providencia rettgeri* durante o armazenamento no laboratório. Há, na literatura, outros relatos da presença de outras bactérias, além do simbiote exclusivo, no tubo digestivo do nematoide. Gouge e Synder (2006) estudam detalhadamente a dinâmica temporal da associação dos nematoides entomopatogênicos, suas bactérias simbiotes e as eventuais bactérias oportunistas, estranhas à simbiose. Concluem também que pode existir um controle da flora microbiana presente no cadáver do inseto através da produção de compostos antimicrobianos. Controle este que estaria ajustado às fases mais importantes do processo de colonização do cadáver. Pode ser então que o processo de colonização das células do tubo digestório da fêmea seja uma solução para garantir a transmissão exclusiva do simbiote para a prole de IJs (CICHE et al., 2008).

Estudos de gnotobiologia, ou seja, da biota associada aos animais mostram que a troca das bactérias simbiotes entre NEPs filogeneticamente próximos reduz a adequação (“fitness”) destas espécies para responder aos estímulos ambientais. A troca entre espécies muito distantes, ou de gêneros distintos, inviabiliza a sobrevivência dos animais. (BONIFASSI et al., 2000; SICARD et al., 2004).

Uma amostragem para nematoides entomopatogênicos realizada no Caribe, Babic et al. (2000) caracterizaram bactérias que ocorrem naturalmente em associação com *Photorhabdus luminescens* no gênero *Heterorhabditis*. Foram encontradas, associadas a estes nematoides além de *Photorhabdus* spp., bactérias relacionadas à espécie *Ochrobactrum anthropi* (BERG; EBERL; HARTMANN, 2005; HOLMES et al., 1988; LEBUHN et al., 2000; VELASCO et al., 1998).

O gênero bacteriano *Ochrobactrum* é composto por bactérias gram-positivas, que não formam de esporos, móveis, dotadas de um flagelo polar. Taxonomicamente é classificado como pertencente a subdivisão α -2 das proteobactérias. As bactérias deste gênero não possuem nenhum efeito entomopatogênico. Os autores concluem que, como as bactérias do gênero *Ochrobactrum* são consideradas patógenos oportunistas humanos, a produção em massa de nematoides entomopatogênicos para controle biológico necessita vigilância estrita (BABIC et al., 2000).

A identificação de bactérias associadas a nematoides entomopatogênicos é feita por meios microbiológicos (comportamento, tais como mobilidade), bioquímicos (testes de fermentação) e moleculares (sequência do rRNA 16S) (BOEMARE et al., 2002). Uma vez

que nenhum destes caracteres pode estar associado a patogenicidade no inseto ou associação aos nematoides, outros marcadores poderiam ser úteis para distinguir linhagens com associações espécie-específicas. Por exemplo a sequência do gene *ngr A* (homólogo ao gene *ent D* de *E. coli*) ou daqueles que codificam as fímbrias (FFRENCH-CONSTANT et al., 2003) seriam bastante interessantes como marcadores de linhagens. Outros marcadores propostos posteriormente seriam os genes *recA*, *gyrB*, *dnaN* e *gltX* (TAILLIEZ, et al. 2009).

O mutualismo de *Photorhabdus* e os nematoides do gênero *Heterorhabditis* é um interessante modelo, pois essas bactérias convivem bem com o nematoide, passando longos períodos alojadas em seu tubo digestivo, mas uma vez regurgitadas na hemolinfa do inseto são patogênicas para o inseto, freqüentemente levando-o à morte em no máximo 48 horas (FORST et al., 1997). A patogenia no inseto é causada principalmente pela bactéria simbiote, e muitos trabalhos têm tratado exclusivamente deste aspecto, detalhando genes e vias metabólicas envolvidas tanto na patogenia quanto na sua interação simbiótica com o nematoide (FORST et al., 1997; GOODRICH-BLAIR; CLARKE, 2007).

A patogenicidade das bactérias entomopatogênicas pode ser aferida a partir das respostas observadas no inseto. O sistema imune do lepidóptero *Galleria mellonella* (utilizado frequentemente para a manutenção de NEPs em laboratório) é capaz de eliminar um inóculo inicial de 10^6 células da enterobactéria *Escherichia coli*, mas incapaz de evitar a proliferação de apenas 5 unidades formadoras de colônias (cfu) de *Photorhabdus luminescens* (GOODRICH-BLAIR; CLARKE, 2007). A diferença pode ser explicada em parte pelos produtos metabólicos secretados pela bactéria de modo a suprimir a resposta imune do inseto. Dentre estes compostos se destaca o estilbeno, um antibiótico de largo espectro, que tem ação antimicrobiana e nematicida, além de inibir a fenol oxidase, composto presente no sistema imune dos insetos (BODE, 2009; WILLIAMS; THOMAS; CLARKE, 2005).

Em 2003 o genoma de *Photorhabdus luminescens* foi completamente sequenciado e parcialmente anotado (GAUDRIALT et al., 2006; HEERMANN; FUCHS, 2008). O genoma desta bactéria tem aproximadamente 5,6 Mbp (42,9 % GC) e contém 4389 genes para proteínas que codificam um número muito grande de toxinas proteicas, maior que o de outras enterobactérias descritas, como *E. coli*. Muitas destas toxinas são secretadas e provavelmente levam à morte do inseto parasitado (DUCHAUD et al., 2003) <<http://157.99.64.78/PhotoList/>>. Além desses fatores, *Photorhabdus* produz substâncias (antibióticos, antifúngicos, bacteriocinas, proteases, lipases e lipopolisacarídeos) que impedem a colonização do cadáver por outras espécies de bactérias existentes no ambiente e atuam na chamada bioconversão do inseto, tornando a sua biomassa disponível para a nutrição do

nematoide e das gerações seguintes de bactérias (BLACKBURN et al., 1998; BODE, 2009). Também existem genes anotados como possíveis responsáveis pela promoção da simbiose com o nematoide e a patogenicidade com o inseto e também os "interruptores" ou moduladores putativos, que seriam necessários para mudar a bactéria de um estado de simbiose para patogenicidade (BOWEN et al., 1998; CICHE; ENSIGN, 2003; EASOM; JOYCE; CLARKE, 2010; GAUDRIAULT et al., 2006).

Outro fato que reforça o interesse no gênero bacteriano *Photorhabdus* é a existência de duas variantes fenotípicas distintas, que ocorrem após longos períodos de cultura *in vitro*. As variantes I e II são igualmente patogênicas para os insetos, mas diferem radicalmente no estabelecimento da associação simbiótica com o nematoide. Enquanto a variante I é a forma mais frequentemente encontrada nos JI coletados e é capaz de sustentar o crescimento normal do nematoide e associar-se de modo bem sucedido, a variante II é incapaz de desempenhar esta função e ainda não é retida no tubo digestivo do JI quando este sai para o meio ambiente, o que compromete para a manutenção do ciclo de vida das duas espécies, visto que não ocorrerá infecção do próximo hospedeiro. A maioria dos variantes primários de *Photorhabdus* produz 50-100 vezes mais luz que os variantes secundários. (AKHURST, 1980; FORST et al., 1997).

Trabalhos recentes realizam uma análise proteômica desta variação fenotípica levando a uma caracterização dos perfis de expressão de cada variante. A variante I é marcada pela expressão e secreção em larga escala dos produtos metabólicos ligados à patogenia causada ao inseto, além do controle de outras populações bacterianas, potenciais concorrentes pelos nutrientes presentes no cadáver. A variante II é caracterizada pelos produtos primários de metabolismo, além dos fatores estruturais ligados à reprodução (TURLIN et al., 2006).

Análises de biblioteca genômica da linhagem W14 de *P. luminescens*, anteriores ao sequenciamento do genoma, relatadas por French-Constant em 2000 dão conta de uma série de ilhas de patogenicidade. Em patógenos, as ilhas de patogenicidade são regiões instáveis ausentes dos seus parentes não patogênicos. É interessante notar, que em *Photorhabdus luminescens* as ilhas de patogenicidade estão próximas de regiões potencialmente associadas à simbiose com o nematoide, especialmente os genes que codificam as fímbrias *phf* (WATERFIELD; DABORN; FRENCH-CONSTANT, 2002). Entretanto, ainda não existe evidência experimental para o papel destas fímbrias na interação bactéria-nematoide.

A comparação das sequências do operon que codifica as fímbrias de diferentes linhagens de *Photorhabdus luminescens* mostrou que alguns dos genes apresentam uma variação de nucleotídeos que é sequência específica, sugerindo que as fímbrias produzidas

possam realmente estar envolvidas na associação específica bactéria-nematoide (FFRENCH-CONSTANT, comunicação pessoal)².

Somente as pressões seletivas do ambiente seriam suficientes para justificar a associação ou seria um processo de “domesticação” de um proto-patógeno? Há na literatura hipóteses de que as bactérias entomopatogênicas podem ser patógenos de vertebrados e que ocuparam um novo nicho disponível ao se associarem aos nematoides. Evidência neste sentido e fator complicante no uso de bactérias do gênero *Photorhabdus* é a existência de casos clínicos relatados e um trabalho publicado pelo CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, E.U.A., onde *Photorhabdus asymbiotica* é apresentada como patógeno oportunista em lesões, principalmente da pele e de difícil cicatrização. O mecanismo da ação de *P. asymbiotica* em mamíferos pode envolver invasão de células e indução de apoptose em macrófagos (COSTA et al., 2009). Os casos são relatados na Austrália e nos EUA (GERRARD et al., 2004, 2006). Trabalho recente identificou o nematoide hospedeiro de *P. asymbiotica* como uma nova espécie da família Heterorhabditidae: *Heterorhabditis gerrardi* PLICHTA et al. 2009. O isolamento do nematoide ocorreu em 2006 numa localidade da Austrália onde havia relatos de infecção humana por *P. asymbiotica*. (GERRARD et al., 2006; PLICHTA et al., 2009).

Apesar do acima relatado, as outras espécies de bactérias entomopatogênicas, foram testadas para avaliar os fatores ligados à biossegurança (AKHURST; SMITH, 2002). Os resultados mostram que até o presente momento não há risco de infecção associado ao emprego dos NEPs, sendo que até injeções intradérmicas de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* em camundongos não causaram septicemia (BOEMARE; LAUMON; MAULEON, 1996).

1.4 GENES RIBOSSÔMICOS COMO MARCADORES TAXONÔMICOS

O RNA ribossômico corresponde a 80 ou 90% da massa total de RNA celular, sendo o produto predominante da transcrição, tanto em eucariotos como em procariotos. Na maioria dos eucariotos, os genes dos quais são transcritos os rRNAs estão contidos em um ou mais agrupamentos em tandem (KREBS, GOLDSTEIN; KILPATRICK, 2009). *C. elegans*, por exemplo, possui aproximadamente 55 cópias desses genes. As diferenças de sequência que porventura possam surgir entre as cópias são contrabalançadas pela conversão gênica e pela evolução concertada, assim permitindo o consenso de que muito provavelmente as cópias se

---

² FFRENCH-CONSTANT, R. H. São Paulo, 2005 (comunicação pessoal durante visita ao Departamento de Parasitologia do INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS da UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.)

mantêm praticamente idênticas (DORRIS; VINEY; BLAXTER, 2002). A natureza repetitiva da organização dos genes do rDNA, também os tornam alvos adequados para a amplificação do DNA por PCR de modo a permitir os estudos moleculares visando à identificação dos organismos. A proximidade entre regiões conservadas (18S, 5.8S e 28S em metazoários) áreas mais variáveis (ITS 1 e 2 e ETS), torna as regiões de rDNA excelentes marcadores para aferição da evolução tanto intraespecífica, com as regiões mais variáveis sendo analisadas, como para o estudo de taxa mais distantes, quando são mais adequados os segmentos altamente conservados (GRAUR; LI, 2001;

POWERS et al., 1997) (**Figura 5**).

Figura-5- Representação diagramática de uma região do citrion ribossômico de nematóides e considerando a variabilidade de cada segmento. Isto justifica a escolha dos ITSs como marcadores moleculares para distinguir nematoides próximos, dada a maior variabilidade das sequências de nucleotídeos não transcritas

O sinal filogenético nas sequências de rDNA permite a reconstrução da filogenia dos nematoides, permitindo a identificação até o nível de espécie (HOLTERMANN, 2006).

Adams et al. (1998) sugeriram a utilização da região do ITS1 dos genes ribossômicos do gênero *Heterorhabditis*, como uma fonte confiável de caracteres ortólogos para estabelecimento de relações de parentesco entre *taxa* próximos, mas assevera que esta região torna-se uma fonte menos confiável à medida que as linhagens são mais divergentes. Portanto, dentro deste contexto, o nosso trabalho consiste em tentar diferenciar isolados de nematoides entomopatogênicos, muito semelhantes entre si do ponto de vista morfológico e próximos taxonomicamente, empregando o sequenciamento das regiões variáveis dos ITS1 e 2 (EME-

LIANOFF et al., 2008).

O estudo das bactérias simbiontes também utiliza o rDNA como região válida para estabelecer as identidades dos organismos envolvidos. Análises da sequência do rRNA 16S de aproximadamente 40 linhagens de *Photorhabdus luminescens* mostraram que existem diversas genospecies dentro da espécie, mas não está claro qual as afinidades fisiológicas entre elas (SZÁLLAS et al., 1997), ou se elas estão relacionadas a diferentes espécies de *Heterorhabditis*. O genoma de *Photorhabdus luminescens* possui 7 genes de rRNA 16S, que aparentemente evoluem em conjunto, tornando-se um excelente alvo para análises de linhagens (ADAMS et al., 2006; LIU; BERRY; BLOUIN, 2001) (**Figura 6**).

Figura 6- Localização de um dos conjuntos (“clusters”) de rRNA no genoma de *Photorhabdus luminescens* TT01 [figura gerada em <http://157.99.64.78/PhotoList/>].

1.5 OBJETIVOS

- Caracterização molecular dos isolados de *Heterorhabditis* sp. coletados em amostras do solo de Monte Negro, RO, utilizando as sequências completas dos ITS e do rRNA 5.8S
- Caracterização molecular das bactérias simbiontes isoladas, utilizando as sequências completas do rRNA 16S.
- Após alinhamento das sequências obtidas, realizar análise filogenética analisar a congruência ou não das árvores resultantes para cada conjunto de dados obtidos.
- Uso de abordagem integrada incluindo caracteres morfológicos de modo a identificar os nematoides entomopatogênicos isolados até a espécie.
- Estudar a biologia de um dos isolados bacterianos, levando em consideração fatores

---

como a dinâmica de crescimento, resistência a antibióticos, metabolismo e possíveis produtos de secreção ou estruturas para a interação entre as bactérias e os nematoides.

- Avaliar as bactérias foréticas dos nematóides entomopatogênicos estudados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

---

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 BACTÉRIAS

2.1.1 Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas

DH5- α (*supE44 Dlac U169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* – DAVIS; YOUNG, 1983); **DH10B** (*F endA1 recA1 galE15 galK16 deoR nupG rpsL Δ lacX74 ϕ 80 lac Δ ZM15 araD139 Δ [ara, leu] 7697 mcrA D[mrr-hsdRMS-mcrBC] λ*); **NA22** (genótipo desconhecido; cedida pelo Dr. Thomas Blumenthal – University of Colorado, Boulder); **OP50** (genótipo desconhecido; derivada de linhagem de *E. coli* BB, auxotrófica para uracila e originalmente derivada da coleção de linhagens do Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Inglaterra – (DUSENBERY; SHERIDAN; RUSSELL, 1975).

2.1.2 Preparação de células de *E. coli* quimio-competentes das linhagens DH5- α e DH10B

Uma colônia individual de *E. Coli* das linhagens DH5- α ou DH10B crescidas em *Meio LB agar* foi inoculada em 3 ml de *Meio LB*. O tubo contendo o meio foi mantido em agitação e temperatura de 37 °C constantes por aproximadamente 18 horas. 500 μ l deste pré-inóculo foram adicionados a 100 ml de outra preparação do mesmo meio. A nova cultura também foi submetida a agitação e temperatura de 37 °C constantes por aproximadamente duas horas até atingir $A_{600nm}=0,5$, sendo então centrifugada a 4000 g por 10 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em $CaCl_2$ 50 mM e incubadas a 4 °C por 20 minutos. As suspensões foram novamente centrifugadas sob as mesmas condições e os precipitados de células ressuspensos em volume adequado de $CaCl_2$ 50 mM adicionado de glicerol 15% (v/v). As células bacterianas competentes foram então aliquotadas e congeladas em nitrogênio líquido, sendo armazenadas a – 70 °C ou em tanques de nitrogênio líquido até a sua utilização.

2.1.3 Transformação de células de *E. coli* quimio-competentes das linhagens DH5- α e DH10B

Aproximadamente 200 ng de DNA plasmidial eram adicionados a 90 μ l de suspensão de células bacterianas quimio-competentes e mantida a mistura a 4 °C por 30 a 40 minutos. A mistura então era submetida a choque térmico a 42 °C durante um minuto e rapidamente transferida para 4 °C, onde era mantida por dois minutos. Foram adicionados 900 μ l de *Meio SOC* e as misturas eram incubadas a 37 °C por uma hora sem agitação. Para seleção das

bactérias transformadas de modo a obter colônias foram empregados os métodos correspondentes para as marcas de seleção presentes nos plasmídeos empregados.

Para os plasmídeos comuns e Invitrogen PCR TOPO 2.1 (Carlsbad, CA, U.S.A.) com marca de antibiótico e o operon *lac*, 50 µl da mistura de células bacterianas e plasmídeo eram plaqueados em *Meio LB agar* adicionado do antibiótico apropriado, *X-Gal* 122 mM e *IPTG* 100 mM e incubadas por 18 horas a 37 °C para a identificação dos clones recombinantes.

Para os plasmídeos pJET 1.2® (Fermentas, Canadá), 50 µl da mistura de células bacterianas e plasmídeo eram plaqueados em *Meio LB agar* adicionado do antibiótico ampicilina ou carbenicilina. As colônias viáveis eram todas transformadas.

2.1.4 Isolamento da linhagem bacteriana MN7

A linhagem da bactéria simbiote dos nematoides entomopatogênicos estudados nesta tese foram extraídas do tubo digestivo dos juvenis infectantes (JI) nematoides pertencentes a espécie *Heterorhabditis baujardi* linhagem LPP7. Os JIs foram lavados com Merthiolate 0,1% (v/v) e estreptomicina 100 µg/µl ou Hipoclorito de sódio 1,5% (v/v) para esterilizar o seu exterior. Após o tratamento os JI foram lavados em água estéril e colocados sobre placas de Petri contendo *Meio LB agar* (BOEMARE et al., 1997; WINTZINGERODE; GÖBEL; STACKEBRANDT, 1997; WILKINSON; HAY, 1997).

Após um período de incubação de aproximadamente 72 horas, os JI morriam e regurgitavam o conteúdo de seu tubo digestório no meio, permitindo a proliferação das bactérias e a formação de colônias isoladas. Posteriormente essas colônias foram repicadas em *Meio MacConkey agar* (MACCONKEY, 1908) e *Meio NBTA agar* de modo a distinguir as enterobactérias. As colônias isoladas nesta segunda passagem foram novamente crescidas em LB e submetidas à extração de DNA para posterior identificação e estocagem.

2.1.5 Denominação e manutenção da linhagem MN7

A linhagem de *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* isolada a partir dos NEPs da espécie *Heterorhabditis baujardi* linhagem LPP7 foram denominadas respectivamente MN7 seguindo o critério de praxe na literatura, onde as linhagens bacterianas são denominadas em homenagem ao local de isolamento, no caso a localidade de Monte Negro – RO (DOLINSKI et al., 2008).

A partir da identificação por sequenciamento do SSU-rRNA dos isolados bacterianos, estes foram mantidos tanto em cultura líquida e placas dos *Meios LB* e ou *NA*. Aliquotas também foram congeladas em *meio LB* suplementado com Glicerol 15% (v/v) em nitrogênio

líquido e se encontram estocadas em nosso Departamento. Adicionalmente foram preparados stabs de *Meio LB agar* para estocagem a temperatura ambiente.

2.1.6 Caracterização bioquímica e de perfil de resistência a antibióticos de MN7

A caracterização bioquímica foi realizada empregando o kit EPM-MILi (Newprov, Brasil).

A determinação de resistências a antibióticos da linhagem MN7 permitiu observar suscetibilidade dessas bactérias, nas culturas em LB agar crescidas na presença do multidisco de antibióticos Laborclin®, Curitiba, Brasil.

2.2 NEMATOIDES

2.2.1 Cultura e manutenção do ciclo de nematoides entomopatogênicos

Os *J1* (juvenis infectantes) que emergiram das larvas de lepidóptero infectadas foram eluídos em água destilada, através do método modificado das armadilhas de White (WHITE, 1927) (**Figura 7**) e novamente apresentados à larvas saudias e assim subsequentemente. A suspensão de *J1* em água destilada era filtrada em pré-filtro Millipore (Billerica, MA, EUA) AP 20 de 47 mm, os vermes eram ressuspensos em água destilada e armazenados em garrafas plásticas de cultura de tecidos. Os juvenis eram mantidos por períodos de até três meses em *B.O.D.* à temperatura constante de 15 °C.

Figura 7- Armadilha
FONTE: modificada de White, 1927.

2.3 INSETOS

Durante o trabalho foram utilizados os lepidópteros *Galleria mellonella* Linnaeus 1785 (Família Pyralidae), que foram gentilmente cedidos pela Doutora Claudia Dolinski do

---

Laboratório de Entomologia e Fitopatologia do CCTA da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

2.3.1 Insetos utilizados

As larvas de *Galleria mellonella* foram mantidas em alimento *ad libitum*, com composição modificada a partir da descrição em Kaya e Woodring (1988). Utilizaram-se frascos distintos para o acondicionamento das larvas e dos adultos. As colônias foram mantidas em B.O.D. à temperatura constante de 28 °C. A adição de mais meio de cultura foi realizada conforme as necessidades. Os adultos foram colocados em caixas de cruzamento que continham folhas de papel de filtro dobradas, onde eram feitas as posturas. Os ovos foram coletados e transferidos para outro recipiente contendo alimento novo recentemente preparado, onde ocorria a eclosão e o desenvolvimento inicial das larvas.

2.4. MANIPULAÇÃO E ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

2.4.1 Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados foram:

pCR 2.1-TOPO®, Invitrogen^{MR} Life Technologies – plasmídeo de 3.098 pb, com marca de resistência para ampicilina. Utilizado para clonagem de produtos de PCR. Quando linearizado, exibe a sequência da topoisomerase do vírus vaccínia associada às suas extremidades.

pJET 1.2®, Fermentas^{MR} Life Sciences - plasmídeo com 2974 pb, com marca de resistência para ampicilina e gene seccionado para enzima de restrição *Eco47IR* em torno do sítio de clonagem. O gene fica íntegro caso ocorra ligação do plasmídeo sem a inserção de fragmento no sítio de clonagem, o que leva à produção da enzima de restrição e consequente lise da células que não redundariam em clones do fragmento de interesse. Evita a necessidade de monitoramento da coloração das colônias através da adição de *X-Gal* 122 mM e *IPTG* 100 mM. Utilizado para clonagem de produtos de PCR.

pTZ19U, Fermentas Life Sciences® – plasmídeo com 2862 pb, com marca de resistência para ampicilina. Utilizado para clonagem de fragmentos de DNA.

Litmus 29, New England Biolabs® - plasmídeo com 2820 pb, com marca de resistência para ampicilina. Utilizado para clonagem de fragmentos originados de digestão com enzimas de restrição.

2.4.2 Purificação de plasmídeos por lise alcalina

Os plasmídeos para utilização em reações de sequenciamento de rotina, transformações e digestões foram purificados seguindo-se os protocolos de Lise Alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), que consiste em submeter as células de *E. coli*, linhagens DH10B e DH5 α contendo os plasmídeos de interesse a um tratamento com soluções denominadas *CSH I, II, e III*. A solução *CSH I* gelada, foi adicionada às células, já concentradas por centrifugação a 2000 g, durante 1 minuto. Posteriormente estas foram incubadas durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Então as células foram lisadas com a solução *CSH II* e mantidas em gelo por 5 minutos. A partir daí utiliza-se a solução *CSH III* e após a precipitação das proteínas e DNA cromossômico o sobrenadante contendo o plasmídeo foi extraído com fenol, depois fenol-clorofórmio (1:1, v/v) e por último apenas clorofórmio, resultando numa fase aquosa onde o DNA será precipitado com etanol e ressuspensionado em *TE-RNase A* (20 μ g/ml).

2.4.3 Purificação de Plasmídeos em gradiente de cloreto de cério

Colônias individualizadas de bactérias contendo o plasmídeo de interesse foram inoculadas em 3 ml de *Meio LB* líquido e incubadas sob agitação constante por 18 horas e 37 °C. O DNA do plasmídeo foi extraído de todas as culturas por lise alcalina (item 3. 4. 2.) e ressuspensionado em *TE*. A solução de plasmídeo foi acrescida de 0,5 volumes de uma solução de CsCl 6,6 M e Brometo de Etídeo para uma concentração final de 5 μ g/ml. A mistura foi centrifugada em tubos de 1 ml (Beckman®, cat. nr. 343778) a 280.000 g por três horas a 20 °C em um rotor TLA 120.1. Após a centrifugação o tubo foi iluminado com uma lâmpada de U. V. longo. A banda corada com Brometo de Etídeo correspondente ao DNA do plasmídeo foi coletada pelo topo do tubo. Seguiram-se quatro extrações com Butanol/*TE* (3:1, v/v) para a remoção do Brometo de Etídeo complexado ao DNA do plasmídeo. O DNA foi precipitado por adição de 0,1 volume de Acetato de Sódio 3,0M pH 5,2 e 2,5 volumes de Etanol e incubação a – 20 °C por 18 horas e depois centrifugado a 20.000 g por 15 minutos a 4 °C. Ao precipitado foi adicionado 1 ml de etanol 70% (v/v). O DNA foi recentrifugado nas mesmas condições, o sobrenadante removido e o precipitado seco sob vácuo seco em *SpeedVac* (Heto) e ressuspensionado em *TE*.

2.4.4 Purificação de Plasmídeos – Kit SV Plus Wizard® Miniprep (Promega, E.U.A.)

Para a realização de reações de sequenciamento de alta qualidade, foram sempre empregados kits específicos de purificação de plasmídeos. 1,5 ml de suspensão de bactérias transformadas e incubadas durante 18 horas em *Meio LB* adicionado do antibiótico apropriado foram centrifugados por 30 segundos a 10.000 g e o meio de cultura foi removido por aspiração. As bactérias foram ressuspensas em *solução para ressuspensão de células*. A *solução de lise* foi adicionada à amostra, sendo então acrescida de protease alcalina (250 µg por amostra). Após cinco minutos à temperatura ambiente, adicionou-se a *solução de neutralização*. Centrifugou-se a 10.000 g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para uma coluna e centrifugado (10.000 g por um minuto). A coluna foi lavada duas vezes com *tampão de lavagem*. O DNA plasmidial foi eluído com água após centrifugação da coluna a 10.000 g por minuto à temperatura ambiente.

2.4.5 Purificação de Plasmídeos – Kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen® Alemanha)

Para a realização de reações de sequenciamento de alta qualidade, foram sempre empregados kits específicos de purificação de plasmídeos. De 1 a 5 ml de suspensão de bactérias transformadas e incubadas durante 18 horas em *Meio LB* adicionado do antibiótico apropriado foram centrifugados por 30 segundos a 10.000 g e o meio de cultura foi removido por aspiração. As bactérias foram ressuspensas em *tampão P1 (solução para ressuspensão de células)*. Depois foram adicionados o *tampão P2* e em seguida o *tampão N3 (solução de lise)* passando-se à centrifugação, a 10.000 g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para uma coluna e centrifugado (10.000 g por um minuto). A coluna foi lavada uma vez com *tampão de lavagem PB* e outras duas vezes com *tampão de lavagem PE*. O DNA plasmidial foi eluído com água após centrifugação da coluna a 10.000 g por minuto à temperatura ambiente.

2.4.6. Extração de Ácidos Nucléicos das bactérias isoladas

2.4.6.1 Extração de DNA Genômico das bactérias do Gênero *Photorhabdus*

50 ml de suspensão de bactérias do Gênero *Photorhabdus* foram incubadas durante 48 horas em *Meio LB* e centrifugados por 10 minutos a 4.000 g e à 4 °C de temperatura. O meio de cultura foi removido e as células foram ressuspensas em 10 ml de *TE* pH 8,0. Procedeu-se a novo passo de lavagem com centrifugação semelhante a anterior. Adicionou-se lisozima até atingir a concentração final de 1 mg/ml e a reação foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente (25 °C).

Após a incubação adicionou-se SDS 10% (v/v) aos poucos, procedendo-se a leve agitação, para atingir concentração final 1% (v/v), permitindo a lise das células bacterianas. Então ocorreu a extração com 1 volume (10ml) de fenol e agitação leve por 5 minutos e nova centrifugação por 10 minutos a 5000 g e à 4 °C. O sobrenadante foi extraído duas vezes com 1 volume de fenol-clorofórmio (1:1) pré centrifugado e uma terceira vez com 1 volume de clorofórmio.

À fase aquosa foi adicionado 1 ml de Acetato de Amonio 8M seguido de agitação lenta porém vigorosa,. Finalmente adicionou-se 25 ml volumes de Etanol Absoluto gelado para precipitar o DNA. O DNA precipitado foi recolhido usando-se um bastão de vidro, lavado por duas vezes utilizando-se Etanol 70% (v/v), aliquotado e estocado a -20 °C.

Quando necessário o DNA presente nessas alíquotas foi seco a vácuo em SpeedVac (Heto - atual Thermo Scientific, E.U.A.), ressuspensão em *TE RNase A* (20 mg/ml) incubado por uma hora à 37 °C e submetido a nova extração com fenol, fenol-clorofórmio e clorofórmio, aliquotado e estocado à - 4°C. A integridade do DNA purificado foi constatada por eletroforese em agarose 1% (m/v).

2.4.7 Extração de ácidos nucléicos dos nematoides

2.4.7.1 Extração de DNA dos nematoides com tampão de lise

Após lavagem com tampão M9 (KH₂PO₄, 17,2 mM; Na₂HPO₄ 42,2 mM; NaCl 85,5 mM; MgSO₄ 1mM) (WOOD et al., 1988), os vermes (larva ou adultos) foram lavados com água destilada para diluir o KCl do tampão M9, uma vez que o SDS a ser usado nos passos subsequentes poderia ser precipitado. Os vermes foram ressuspensos em um volume de *Tampão de Lise*, sendo que este variava de espécie para espécie (para *C. elegans* NaCl 100 mM; Tris pH 8,0 10 mM; EDTA 100 mM; SDS 1% (v/v); β-mercaptoetanol 2% (v/v); Proteinase K (20 mg/ml) 1% (v/v) e para *Heterorhabditis* sp. e outros Tris HCl pH 8,0 100mM, EDTA 50 mM, SDS 1% 100 µg/ml de Proteinase K) e incubados por 30 minutos a 65° C, com agitação ocasional. O lisado obtido foi extraído uma vez com um volume de fenol, uma vez com fenol-clorofórmio (1:1; v/v) e finalmente uma última extração com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1; v/v). A fase aquosa do passo anterior foi precipitada após a adição de 0,1 volume de CH₃COONH₄ 3M com 2,5 volumes de etanol absoluto. Após a precipitação, o DNA foi retirado com auxílio de um bastão e lavado em Etanol 70% (m/v) a 4° C. Então, o DNA precipitado foi recolhido usando-se um bastão de vidro, lavado por duas vezes utilizando-se Etanol 70% (v/v), aliquotado e estocado a -20° C.

Quando necessário o DNA presente nessas aliquotas foi seco a vácuo em SpeedVac (Heto - atual Thermo Scientific, E.U.A.), ressuspensão em TE RNase (20 mg/ml) incubado por uma hora à 37 °C e submetido a nova extração com fenol, fenol-clorofórmio e clorofórmio, aliquotado e estocado à - 4 °C. A integridade do DNA purificado foi constatada por eletroforese em agarose 1% (m/v).

2.4.7.2 Extração de DNA dos nematoides - Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System Promega®

Para a extração de DNA dos nematoides pertencentes às linhagens de *Heterorhabditis baujardi* e *indica* estudadas foi também utilizado o Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System Promega®. Os juvenis infectantes, que são a forma de vida mais abundante em nossa cultura, foram centrifugados por 1 minuto a 2000 g, de modo a se concentrarem no fundo do tubo e continuarem vivos. Então amostras acima de 20 mg foram ressuspensas em 275 µl de *Solução de Digestão* e incubadas a 55 °C por 18 horas. Adicionaram-se em seguida 250 µl de *Tampão de Lise* e as amostras foram agitadas.

O lisado foi acondicionado numa mini coluna adaptada a um micro tubo para centrifuga com capacidade para 1,5 ml e então centrifugado a 13.000 g por 3 minutos, à temperatura ambiente, com o filtrado sendo desprezado. Procedeu-se então à lavagem da coluna utilizando-se 650 µl de *Solução de lavagem* e centrifugação a 13.000 g por 1 minuto, com o desprezo do filtrado e repetindo-se o procedimento citado por mais três vezes.

Posteriormente o DNA foi eluído com a adição de 500 µl de água livre de DNase e centrifugação a 13.000 g por 4 minutos, sempre à temperatura ambiente. O DNA genômico resultante deste procedimento foi quantificado por espectrofotometria e armazenado a 4 °C.

2.4.7.3 Extração de RNA dos nematoides

Os vermes dos gêneros *Heterorhabditis* e ou *Caenorhabditis* foram lavados em *tampão S* e sedimentados a 1000 g durante um minuto à temperatura ambiente e purificados do meio de cultura e impurezas por um passo de flutuação em Sacarose 30 % (m/v). Os vermes obtidos foram centrifugados, misturados com Trizol® e em seguida agitado brevemente em vortex (Gibco-BRL – Invitrogen Life Sciences, E.U.A.) (4:1; v/v). A amostra foi então incubada durante cinco minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 12.000 g, por 15 minutos a 4 °C. A fase líquida foi coletada e misturada com um volume de Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24:1; v/v), para extração do RNA e centrifugada a 25.500 g, durante 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa contendo o RNA foi retirada, misturada com dois

volumes de isopropanol para precipitação, mantida à temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugada durante 10 minutos, nas mesmas condições descritas acima. O precipitado foi lavado com Etanol 70% (m/v) e após centrifugação foi seco em *SpeedVac* (Heto - atual Thermo Scientific, E.U.A.) e ressuspendido em água estéril e utilizado imediatamente. Para amostras a serem estocadas, alíquotas de RNA extraído como descrito acima foram precipitadas e mantidas em Isopropanol a -20°C . Alternativamente, para a extração de RNA a partir de juvenis infectantes (JIs) de *Heterorhabditis* spp. utilizou-se em conjunto com o Trizol® contas de vidro de 425 – 600 μm tratadas com banho ácido (Sigma Life Science, E.U.A.) de modo a romper a cutícula extra existente nesta estágio. Todos os procedimentos desse protocolo de extração foram realizados utilizando-se vidraria tratada a 300°C durante seis horas e plásticos livres de *Rnase*.

2.4.8 Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

Tabela 1- Relação das diferentes polimerase de DNA utilizadas em amplificações por PCR, seus fabricantes e condições de aplicação

Enzima	Fabricante	Utilização	Temp. de Desnat.	Temp. de Extensão
Biotools DNA Polymerase	Biotools ® (B&M Labs, Espanha)	PCR Regular	94 °C	72 °C
Platinum ® Taq DNA Polymerase	Invitrogen ® Life Technologies (BR)	PCR Regular	94 °C	72 °C
TopTaq ® DNA Polymerase	Quiagen ® , Alemanha	PCR Regular	94 °C	72 °C
Promega ® DNA Polymerase	Promega ® , E.U.A.	PCR Regular	94 °C	72 °C
GoTaq ® Hot Start Colorless Master Mix	Promega ® , E.U.A.	PCR Regular	94 °C	72 °C

As PCR (Reações em cadeia da polimerase) foram realizadas utilizando-se Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen Life Sciences, E.U.A.), o *Tampão 1X para PCR* e Cloreto de Magnésio 5mM. A solução de dNTPs 10 mM (2,5 μmol de dATP; 2,5 μmol de dCTP; 2,5 μmol de dGTP e 2,5 μmol de dTTP) também do fabricante Invitrogen. Alternativamente

utilizou-se a Taq DNA polimerase Biotools (Biotools, Espanha) ou GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix (Promega, E.U.A.). Foram amplificados dois fragmentos do DNA ribossômico dos nematoides entomopatogênicos: **1.** Fragmento que abrange ambos os ITS e o *Caenorhabditis elegans*) compreendido entre os oligonucleotídeos SSU-18PF e LSU-NC2 (**Figura 8 e Tabela 2**). O oligonucleotídeo SSU-18PF foi modificado a partir de um outro denominado NC5 (NEWTON et al., 1998) sobre as sequências da subunidade grande do ribossomo (LSU) de várias espécies de nematoides usadas por BLAXTER et al. (1998) e corresponde às posições 2671 ... 2690 dos genes do rDNA de *C. elegans* (GenBank Acc. Nr. X03680). Nesse fragmento estão localizados os ITS 1 e 2 onde está o fragmento coberto pelos oligonucleotídeos ITS-1-1-f e ITS-2-1-r para o sequenciamento (**Figura 8 e Tabela 2**). O oligonucleotídeo reverso LSU-NC2 é universal para genes de LSU rDNA de nematoides (BLAXTER et al., 1998; WIMMER, 2007) que corresponde às posições 3745 ... 3764 rDNA dos genes do rDNA de *C. elegans* (GenBank Acc. Nr. X03680).

2. O segundo fragmento abrange quase todo o rDNA LSU, compreendido entre os oligonucleotídeos SSU-A e SSU-18P que também são universais para nematoides (**Figura 8 e Tabela 2**).

Figura 8- Esquema do citrômero ribossômico. Acima dos genes estão representados os oligonucleotídeos utilizados. As barras na parte inferior representam os fragmentos obtidos na PCR.

Tabela 2- Códigos e sequências do oligonucleotídeos sintetizados para amplificação, identificação e sequenciamento dos genes ribossomais dos isolados de nematoides do Gênero *Heterorhabditis*.

Nome	Sequência	Or	Tm °C	Utilização
SSU-18PF	GTGAACCTGCRGMWGGATCA	→	49	Amp. ITSs e 5,8 S rDNA
LSU-NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT	←	43	Amp. ITSs e 5,8 S rDNA
SSU-18P	TGATCCWKCYGCAGGTTTAC	←	49	Amplificação LSU rDNA
SSU-A	AAAGATTAAGCCATGCATG	→	39	Amplificação LSU rDNA
ITS2-1-r	CGGAAGAAGTTTCAGCTTACGACC	←	59	Sequenciamento
ITS1-1-f	AGCTCTCGGTGAGGTGTCTATTCT	→	60	Sequenciamento
HVTG1	GTIGTICGYCGWAARCGYAG	→	48	Amplificação do gene vit6
HVTG1_vit6	AAGACGGCARWARCG	←	42	Amplificação do gene vit6

Com relação ao DNA ribossômico bacteriano os oligonucleotídeos PL_SSU_f e PL_SSU_r (**Figura 9** e **Tabela 3**) correspondem ao gene de SSU-rDNA da bactéria *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii*, linhagem TT01 e foram utilizados para a amplificação do fragmento nos nossos isolados bacterianos. Os oligonucleotídeos internos (BSF349, BSR357, BSF517, BSR534, BSF784, BSR798, BSF917, BSR 926, BSF1099, BSR1114, BSF1391) foram utilizados para o sequenciamento completo do fragmento (**Tabela 3**).

```

AAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCAACAATGCAAGTCGAGCGGTAAACAGGAAAG 80
      ─── PL-SSUf ───→
      ─── f27 ───→
CGCTTGCGCTTTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGAGGGCGGGGATAACCACTGGA 160
AACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCGCGAGACCAAAGTGGGGGACCTGAAAGGGCCTCACGCGTCCGGATGAACCCAGA 240
TGGGATTAGCTGGTAGGTAGGGTAATGGCCTACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCGCCACACTG 320
GGACTGAGACACGGCCGAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT 400
GCCGCGTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTCAAGCGGGAGGAAGGGTTAGCCTGAAGAGGGTTAGATT 480
TTGACGTTACCCGCAAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGG 560
      ─── U514f ───→
AATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGGCGGTCAATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCATCT 640
AAGACTGGTTGACTGGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATA 720
CCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCT 800
GGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCTGTGGCTTCCGAAGCTAACGCGTTAAATCGA 880
CCGCTCGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA 960
ATTGATGCAACGCGAAGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCCTCAGAATTTGCTGGAGACAGCGAAGTGCCCTTAGGGAAC 1040
GAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAT 1120
      ─── PL06 ───→
CCTTTGTTGCCAGCAGCTGAAGGTGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAAGTGGGGATGACGCTAA 1200
GTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGATACAAGTGAAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGC 1280
GGAAACACACAAGTCTGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACGCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGTAGA 1360
TCAGCATGCTACGGTGAAATACGTTCCCGGGCCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAAGTC 1440
GGTAGCTTAACCGAAAGGGGGCGCTGACCACTTTGTGGCTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAACCGTAGGGG 1520
      ─── U1492r ───←
AACCTGCGGTTGGATCACTCCTTA 1545
      ─── PL-SSUr ───←

```

Figura 9- Sequência da fita não transcrita de um dos genes do rRNA 16S de *P. luminescens* ssp. *laumondii*, linhagem TT01. Na sequência está mostrada a posição dos primers PL_SSU_f e PL_SSU_r, construídos sobre a sequência de *Photorhabdus* TT01. As outras posições mostradas correspondem aos oligonucleotídeos universais para a sequência do gene do rRNA 16S de enterobactérias.

Tabela 3- Códigos e sequências do oligonucleotídeos sintetizados para amplificação, identificação e sequenciamento dos genes ribossomais e fimbriais da linhagem bacteriana MN7

Nome	Sequência	O	Tm °C	Utiliz.
PL_SSU_f	GAAGAGTTTGATCATGGCTC	→	52	Amplif. SSU-rDNA
BSF349	CTGCTGCCTYCCGTA	→	42	Sequenciamento
BSF517	GCCAGCAGCCGCGGTAA	→	57	Sequenciamento
BSF784	ACAGGATTAGATACC	→	33	Sequenciamento
BSF917	GAATTGACGGGGGCCCC	→	48	Sequenciamento
BSF1099	CCGCAACGAGCGCAAC	→	54	Sequenciamento
BSF1391	TGTACACACCGCCCGTC	→	51	Sequenciamento
BSR357	CTGCTGCCTYCCGTA	←	42	Sequenciamento

Continua

Conclusão

Nome	Sequência	O	Tm °C	Utiliz.
BSR534	ATTACCGCGGCTGCTGGC	←	57	Sequenciamento
BSR798	GGTATCTAATCCTGT	←	33	Sequenciamento
BSR926	GTCAATTCATTGAGTTTTA	←	42	Sequenciamento
BSR1114	GTTGCGCTCGTTGCGG	←	54	Sequenciamento
PL_SSU_r	AAGGAGGTGATCCAACCGCA	←	60	Amplif.16SrDNA
PhfA_L	AATTAATGGTATTATTCTGACTTC	→	53	Fímbrias
PhfB_U	TTGATTGGTGTGTATAACTGTCTG	←	47	Fímbrias

2.4.8.1 Clonagem dos produtos das PCR

Foram utilizados dois plasmídeos distintos, como vetores, para a clonagem dos produtos das PCR: - pCR 2.1-TOPO®, Invitrogen® Life Technologies; - pJET 1.2®, Fermentas® Life Sciences.

O kit pCR 2.1-TOPO® da Invitrogen® Life Technologies consiste de plasmídeos lineares complexados a moléculas de DNA topoisomerase I do vírus *Vaccinia* ligadas às suas ponta de timidina (T) livres. Isso permite a ligação do DNA do plasmídeo às extremidades com adeninas livres dos fragmentos amplificados na PCR (SCHUMAN, 1994).

O kit pJET 1.2® da Fermentas® Life Sciences consiste de um vetor de clonagem linearizado que possui extremidades não-coesivas permitindo a clonagem de fragmentos de PCR originados com a utilização de DNA polimerases de alta fidelidade (p. ex. PFU Taq Polimerase). Fragmentos com extremidades coesivas devem ser submetidos a um processo de retirada das adeninas (A) salientes nas extremidades 3' através do uso de uma enzima específica para este processo. O plasmídeo pJET 1.2® recircularizado sem a presença do inserto expressa uma enzima de restrição letal (*Eco47IR*) e não é propagado, matando as células que o recebem tornando desnecessária a triagem de colônias. A enzima responsável pela inserção do fragmento no sítio de clonagem é a T4 DNA ligase.

Os produtos de PCR podem ser utilizados diretamente após a reação, apenas passando por triagem em gel de agarose no caso de bandas inespecíficas, onde a banda majoritária era excisada do gel com uso de bisturi e sob luz U. V. e eluída com kit Zymoclean® Gel DNA

Recovery (ZYMO, USA), segundo as instruções do fabricante. Alternativamente pode se utilizar colunas específicas (Microcon®, Millipore - E.U.A.) para a retirada dos componentes desnecessários ainda presentes no produto de PCR. Estas colunas são compostas por matrizes de sílica com afinidade por DNAs relativamente pequenos, retendo-os e permitindo a passagem de sais, dNTPs, enzimas, DNA genômico e outros componentes, vestígios da reação de PCR.

Para a ligação, o produto de PCR foi adicionado a 100 ng dos plasmídeos pCR 2.1-TOPO® ou pJET 1.2®. Em cada caso o tampão específico foi adicionado conforme instruções do fabricante e as reações foram incubadas à temperatura ambiente (25 °C) por pelo menos 30 minutos e mais tempo quando necessário (p. ex. pequena quantidade de produto de PCR disponível, o que requeria maior eficiência do processo). O fragmento de DNA foi adicionado à reação de ligação seguindo a proporção de excesso molar de cerca de três vezes em relação à quantidade de vetor.

2.4.9 Eletroforese de DNA em gel de agarose

O DNA foi dissolvido em *Tampão de amostra para eletroforese de DNA* e fracionado por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão *TAE* 1X (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) a 11,63 V/cm. Os volumes das amostras a serem aplicadas variaram conforme os diferentes parâmetros envolvidos em cada situação, como dimensões dos poços de cada gel e concentração das amostras a serem analisadas.

Foram utilizados três diferentes marcadores de tamanho para padrão nas eletroforeses: GeneRuler® 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Canadá) - apresenta 14 fragmentos com os seguintes tamanhos em pares de bases: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000 (em destaque), 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500 e 250; Lambda DNA/*Hind*III Marker 2 (Fermentas, Canadá) - apresenta 8 fragmentos com os seguintes tamanhos em pares de bases: 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564, 125 e 1 kb Ladder (Promega, E.U.A.) - apresenta 13 fragmentos com os seguintes tamanhos em pares de bases: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000 (em destaque), 2.500, 2.000, 1.500, 1.000(em destaque), 750, 500 e 250. As quantidades aplicadas de cada marcador seguiram as especificações dos fabricantes.

O DNA foi corado com Brometo de Etídeo (EtBr) 0,5 mg/ml e os fragmentos foram detectados em transluminador de luz ultra-violeta e fotografados com filtro laranja (600BP40) usado nos equipamentos EagleEye® II Still Video System (Stratagene® - atual Agilent Technologies®, E.U.A.) e Image Quant 300® (G.E. Lifesciences®, E.U.A.).

2.4.10 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida

O DNA foi dissolvido em *Tampão de Amostra para eletroforese de DNA* e fracionado por eletroforese em gel poliacrilamida (BioRad, E.U.A.) 10 % (m/v), em tampão *TBE* 0,5X. Os volumes das amostras a serem aplicadas variaram conforme os diferentes parâmetros envolvidos em cada situação, como dimensões dos poços de cada gel e concentração das amostras a serem analisadas.

As amostras de DNA foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % (m/v) para separação de fragmentos de DNA com diferenças de tamanho, em número de pares de bases, menores que o poder de resolução dos géis de agarose.

O DNA foi corado com Brometo de Etídeo (EtBr) 0,5 mg/ml e os fragmentos foram detectados em transluminador de luz ultra-violeta e fotografados com filtro laranja (600BP40) usado nos equipamentos EagleEye® II Still Video System (Stratagene® - atual Agilent Technologies®, E.U.A.) e Image Quant 300® (G.E. Lifesciences®, E.U.A.).

2. 4. 11 Sequenciamento

As sequências foram obtidas, a partir de plasmídeos ou fragmentos amplificados, utilizando-se o protocolo de “Cycle Sequencing”, com o kit ABI PRISM® dGTP BigDye® Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Invitrogen Lifesciences®, E. U. A) baseado no método de sequenciamento enzimático de DNA (SANGER; NICKLEN COULSON, 1977). Este método se baseia na utilização de nucleotídeos trifosfatados que não possuem o grupo 3’-OH (didesoxirribonucleotídeos), introduzidos em uma reação de síntese de DNA. A mistura de reação contém DNA polimerase, o DNA a ser sequenciado, os dNTPs, um iniciador que se anela à extremidade 3’ da região a ser sequenciada e finalmente os didesoxirribonucleotídeos marcados com uma molécula fluorescente específica para cada tipo de desoxirribonucleotídeo. Foram utilizadas aproximadamente 300 ng do fragmento e 3,0 pmol do oligonucleotídeo. Os tubos ou placas contendo as reações foram colocados nas plataformas dos aparelhos ABI 310 e ABI 3700 (Applied Biosystems, atual Invitrogen Lifesciences, E.U.A.). O fracionamento do DNA ocorre por eletroforese capilar, que promove migração dos fragmentos de comprimentos distintos através de um polímero. O capilar apresenta uma janela transparente, por onde passa um feixe de laser, cuja função é excitar os fluoróforos dos terminadores. Os fluoróforos utilizados neste kit, são específicos para cada terminador. Cada um emite fótons em comprimentos de onda diferentes, captados por uma câmara CCD. Os dados de fluorescência são interpretados por um computador acoplado ao aparelho e apresentados na forma de um eletroferograma. Este reflete os perfis eletroforéticos

---

dos fragmentos fluorescentes sobrepostos, compondo a sequência.

3. 4. 12 Bioinformática

As sequências obtidas são inicialmente analisadas e editadas nos programas do conjunto Lasergene 99 (DNASTAR, E.U.A.) e MEGA versão 4.1 (TAMURA et al., 2007). Uma vez expurgados de erros e avaliadas quanto a sua qualidade pelo software PHRED (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998) as sequências finais foram alinhadas no programa Clustal X v. 2.0.10. (LARKIN et al., 2007; THOMPSON et al., 1997).

Os alinhamentos são inicialmente transformados em árvores por meio do método de Neighbor-Joining (NEI, 1996) e posteriormente por algum método de parcimônia máxima e máxima verossimilhança (GRAUR; LI, 2000). Este procedimento permitia a comparação das árvores obtidas com os outras presentes na literatura.

As análises filogenéticas das sequências dos isolados de nematóides e bactérias permitiram a obtenção de árvores enraizadas ou não, construídas por Máxima Parcimônia (MP), por Máxima Verossimilhança (ML) e análise Bayesiana. A análise de MP e ML foi realizada no programa PAUP (ver. 4.0b10) com modelo de substituição selecionado por hLRT com o programa Modeltest 3.7 (POSADA, 1998; 2005). No caso do SSU rRNA de MN7 a análise de ML foi realizada no programa RAxML (STAMATAKIS, 2006), utilizando inicialmente o modelo geral reversível no tempo ("General Time Reversible Model") (LANAVE et al., 1984; RODRIGUEZ et al., 1990), com distâncias entre pares calculadas por taxas que apresentam uma distribuição gama contínua (GTR+G)(LANAVE et al., 1984; RODRIGUEZ et al., 1990). A análise Bayesiana foi realizada no programa MrBayes (v. 3.1.2; HUELSENBECK e RONQUIST, 2001). O modelo de substituição foi selecionado utilizando o mrmodeltest (NYLANDER, 2004).

2. 6 SOLUÇÕES UTILIZADAS

Solução	Composição
CSH I	Glicose 50 mM; EDTA 10 mM; Tris 25 mM pH 8,0
CSH II	SDS 1% (m/v); NaOH 0,2 N
CSH III	KCl 3 M; Acetato 5 M
Meio CFA-agar	
Meio EPM-agar	Ágar bacteriológico: 1,1% (m/v); Triptona: 1% (m/v); Extrato de carne: 0,2% (m/v); Cloreto de sódio 0,5% (m/v); Fosfato dissódico: 0,2% (m/v); L-triptofano: 0,1% (m/v); Citrato férrico amoniacal: 0,0035% (m/v); Tiosulfato de sódio: 0,0035% (m/v); Glicose: 0,1925% (m/v); Uréia: 0,83% (m/v); Azul de bromotimol: 0,0003% (m/v).
Meio LB	Triptona 1% (m/v); Extrato de Levedura 0,5% (m/v); NaCl 170 mM.
Meio LB-agar	Triptona 1% (m/v); Extrato de Levedura 0,5% (m/v); NaCl 170 mM; Bacto-agar 2,5% (m/v).
Meio MacKonkey-agar	Meio MacKonkey-agar Peptona 1,7% (m/v); Peptona Protease 0,3% (m/v); Lactose 1% (m/v); Sais Biliares No. 3 0,15% (m/v); Cloreto de Sódio 5% (m/v); Agar 1,35% (m/v); Vermelho Neutro 0,003% (m/v); Cristal Violeta 0,0001% (m/v).
Meio MILi-agar	Extrato de Levedura: 0,3% (m/v); Peptona bacteriológica: 1,0% (m/v); Triptona: 1,0% (m/v); L-lisina: 1,0% (m/v); Glicose: 0,1% (m/v); Ágar bacteriológico: 1,0% (m/v); Nitrato de potássio: 0,005% (m/v); Púrpura de bromocresol: 0,0002% (m/v).
Meio NA	Extrato de Carne 0,03% (m/v); Peptona 0,05% (m/v) e Agar 0,15% (m/v)
Meio NBTA-agar	Nutrient agar (NA) suplementado com Cloreto de 2,3,5 Trifeniltetrazolio 0.004% (m/v) e Azul de Bromotimol 0.0025% (m/v).
Meio NGM-agar	CaCl ₂ 1 mM; MgSO ₄ 1 mM; TPK 50 mM pH6,0; Colesterol 5 µg/ml; Peptona 0,25% (m/v); Bacto-agar 2,5% (m/v); NaCl 51 mM.

Continua

Continuação

Solução	Composição
Meio para <i>Galleria mellonella</i>	200 g de mel; 250 g de glicerol (Synth, Brasil); 400 g de leite em pó integral; 120 g de levedura de cerveja seca (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>); 200 g de germen de trigo (<i>Triticum</i> spp.) e 440 g de farinha de trigo.
Meio SOC	Tryptona 2% (m/v); Extrato de levedura 0,5% (m/v); NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl ₂ 10 mM e Glicose 20 mM.
Solução de digestão	200 µl de Solução de Lise de Núcleo; EDTA 25 µM pH 8,0; Proteinase K 400 µg; RNase A 20 µg
Solução de lise	NaOH 0,2 M e SDS 1% (m/v).
Solução de neutralização	Hidrocloreto de Guanidina 4,09 M; Acetato de Potássio 0,76 M e Ácido Acético Glacial 2,12 M pH 4,2
Solução para ressuspensão de células	Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 10 mM e RNase A 100 µg/ml.
TAE pH 7,5	Tris 40 mM pH 7,5; EDTA 2mM e Ácido Acético 0,18% (v/v).
Tampão (Buffer) QIAGEN® EB	10 mM Tris-Cl, pH 8.5.
Tampão (Buffer) QIAGEN® N3	Composição confidencial.
Tampão (Buffer) QIAGEN® PB	Composição confidencial.
Tampão (Buffer) QIAGEN® PE	Composição confidencial.
Tampão (Buffer) QIAGEN® P1	50 mM Tris·Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A.

Continua

Continuação

Solução	Composição
Tampão (Buffer) QIAGEN® P2	200 mM NaOH; 1% SDS (w/v). KCl 3 M; Acetato 5 M
Tampão da enzima “Platinum® Taq DNA Polymerase” (Invitrogen) 1x	Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM.
Tampão de amostra para eletroforese de DNA	Ficoll 400 20% (m/v); EDTA 100 mM; SDS 1% (m/v); Azul de Bromofenol 0,25% e Xileno cianol 0,25%.
Tampão de amostra para SDS-PAGE	SDS 2,6%; Tris 62,5 mM pH 6,8; Glicerol 12,6% (m/v); EDTA 0,5 mM; Azul de Bromofenol 0,015% (v/v) e β-mercaptoetanol 2,5% (v/v).
Tampão de corrida para SDS-PAGE	Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM e SDS 0,1% (m/v).
Tampão de digestão de núcleo (Nuclei Lysis Buffer)	Composição confidencial.
Tampão de lise (Wizard® SV Lysis Buffer)	Composição confidencial.
Tampão de lise de <i>C. elegans</i>	NaCl 100 mM; Tris 10 mM pH 8,0; EDTA 100 mM; SDS 1% (v/v); β-mercaptoetanol 2% (v/v); Proteinase K (20 mg/ml) 1% (v/v).
Tampão de lise de <i>Heterorhabditis</i> sp.	Tris HCl 100mM pH 8,0; EDTA 50 mM; SDS 1% (v/v); Proteinase K 100 ug/ml.

Continua

Conclusão

Solução	Composição
Tampão M9	KH_2PO_4 17,2 mM; Na_2HPO_4 42,2 mM; NaCl 85,5 mM; MgSO_4 1mM.
Tampão S	Tampão fosfato 50 mM pH 6,0 e NaCl 100 mM.
TBE pH 7,5	Tris 108 g; Ácido bórico 55 g; EDTA 9,3g p/L.
TBS	NaCl 137 mM; KCl 15 mM; Tris 25 mM pH 8,3.
TE pH 8,0	Tris 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM.
TE RNase pH 8,0	Tris 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM; RNase A (pancreática) 20 $\mu\text{g/ml}$.

3 RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 NEMATOIDES

3.1.1 Análise do ITS do rDNA de diferentes nematoides

Os oligonucleotídeos SSU-18PF e LCU-NC2 (**Figura 8 e Tabela 2**) foram utilizados numa PCR com DNA de diferentes nematoides. Os resultados foram obtidos com DNA extraído de *Heterorhabditis indica* linhagem LPP1, de *Oscheius tipulae* linhagem CEW1, de *C. elegans* linhagem N2 e a linhagem Ilhéus (um nematoide de vida livre ainda não identificado coletado de uma amostra de solo em Ilhéus, BA). O tamanho estimado para o fragmento de *C. elegans* está próximo daquele determinado pelo projeto genoma deste nematoide (<http://www.wormbase.org>). O fragmento do isolado Ilhéus (~980 pb) tem tamanho próximo ao de *C. elegans* enquanto o do isolado LPP1 (~840 pb) é semelhante a *O. tipulae* (linhagem CEW1) (830 pb).

Uma vez obtida a sequência parcial dos ITSs de LPP, construímos dois oligonucleotídeos adicionais (ITS 1-1-f e ITS-2-1-r). Obtivemos a sequência completa do gene de rRNA 5.8S, o que permitiu sequenciar o ITS1 e 2 dos outros isolados, usando quatro oligonucleotídeos.

Os fragmentos de rDNA de cada uma das linhagens citadas foram clonados em plasmídeos comerciais (Material e Métodos) e foram sequenciados utilizando oligonucleotídeos que são complementares às sequências que flanqueiam o "polylinker" do plasmídeo. Submetidas a análise por BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), os resultados mostraram que os ITSs das linhagens sequenciadas apresentam semelhanças com aqueles de diversas espécies de nematoides do gênero *Heterorhabditis* (**Figura 10**).

Figura 10- Resultado da PCR utilizando os iniciadores SSU-18PF e LSU-NC2 e

DNAs de:

a = isolado LPP1

b = isolado de nematoide rabditóide de vida livre (coletado em Ilhéus, BA)

c = *Caenorhabditis elegans* (linhagem N2)

d = *Oscheius tipulae* (linhagem CEW1)

Na foto estão mostrados os tamanhos calculados utilizando-se o padrão indicado à esquerda.

O esquema acima da foto mostra a posição dos dois oligonucleotídeos em relação aos genes de rRNA e seus espaçadores internos transcritos (ITS). O tamanho dos fragmento mostrado no esquema corresponde aos ITS de *C. elegans*.

3.1.2 Análise das sequências de ITS de nematoide

As sequências de ITS 1 e 2 obtidas a partir das linhagens LPP foram inicialmente analisadas e editadas, se necessário, manualmente com o uso do programas do conjunto Lasergene 99 (DNASTAR, E.U.A.) e MEGA versão 4.1 (TAMURA e cols., 2007). Uma vez expurgados de erros e avaliadas quanto à sua qualidade através do software PHRED (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998) e, sendo selecionadas apenas as sequências com valores de PHRED acima de 40. Os consensos das sequências foram alinhadas no programa Clustal X v. 2.0.10. (GIBSON; HIGGINS, 2007; THOMPSON e cols., 1997).

Análise específica das sequências de LPP1, 2, 3 demonstrou que estas são praticamente idênticas, com apenas 5 posições diferentes entre si. A sequência destes isolados é também praticamente idêntica à de *Heterorhabditis indica* (Figura 11 e Tabela 4).

Figura 11- Alinhamento das sequências do ITS1 das linhagens LPP01, LPP02 e LPP03 com as espécies *H. brevicaudis*, *H. hawaiiensis*, *H. indica* e *H. sp LQ2004*. Há entre elas apenas cinco posições variáveis e que não podem ser resolvidas em clados distintos de uma árvore filogenética, quer seja pelo método de Máxima Parcimônia (MP) ou pelo de Máxima Verossimilhança (ML). Nossos dados indicam que o ITS 1 ainda é insuficiente para resolver esta politomia.

Tabela 4- Matriz de distância produzida a partir das sequências de alguns isolados de *Heterorhabditis*. O trecho destacado em negrito representa as linhagens de *Heterorhabditis indica* LPPn, muito semelhantes entre si.

	H.b.	H.a.	LPP7	H.f.	H.m.	H.i.	LPP1	LPP2	LPP3
H.b.		96.3	96.3	96.3	95.0	79.4	78.4	79.9	79.8
H.a.	96.8		97.2	96.3	96.3	79.4	78.4	78.9	79.8
LPP7	95.3	97.5		95.4	94.1	79.0	78.1	78.5	79.5
H.f.	96.0	97.3	95.5		97.2	80.3	79.4	79.8	80.7
H.m.	94.8	96.0	95.3	97.8		81.3	80.4	80.8	81.7
H.i.	82.5	84.8	82.5	83.8	83.0		98.6	99.1	99.5
LPP1	82.3	84.5	82.3	83.5	82.8	99.3		99.1	98.6
LPP2	82.8	85.0	82.8	84.0	83.3	99.8	99.5		99.1
LPP3	82.8	85.0	82.8	84.0	83.3	99.8	99.5	100.0	

O outro isolado, LPP7, apresentou sequência praticamente idêntica à de *Heterorhabditis baujardi*, o que permitiu a clara separação dos isolados estudados em dois grupos diferentes: - Grupo *indica* composto por LPP1, 2 e 3 além de *Heterorhabditis indica*; - Grupo *baujardi*, composto por LPP7, *H. baujardi*, *H. mexicana*, *H. floridensis* e *H.*

amazonensis. Após análise sequências estudadas, percebeu-se que o grupo *baujardi* apresentava uma inserção em ITS1 que continha um sítio de clivagem para a enzima de restrição *Tth* 111 (**Tabela 4**). O resultado obtido permitiu testar outras linhagens antes do sequenciamento de modo a determinar a qual grupo pertenciam. LPP5, LPP7, LPP8 e LPP10 foram consideradas pertencentes ao grupo *baujardi*. LPP1, LPP2, LPP3, LPP4 e LPP9 foram consideradas pertencentes ao grupo *indica* (**Figura 11**).

Análises filogenéticas permitiram a obtenção de árvores não enraizadas, construídas por dois métodos: - Máxima Parcimônia; - Máxima Verossimilhança. Ambas foram obtidas através do programa PAUP (ver. 4.0b10) e utilizando o modelo de substituição GTR+I selecionado por hLRT com programa Modeltest 3.7. (**Figura 12**).

Figura 12- Análise filogenética de oito espécies de *Heterorhabditis* e dos isolados LPPn. (A) Árvore filogenética não enraizada obtida pelo método de máxima verossimilhança (Max. Likelihood – ML), usando apenas sequências de ITS1; A escala representa o número de substituições por sítio. (B) Árvore filogenética não enraizada obtida pelo método de máxima parcimônia (Max. Parsimony – MP) usando apenas sequências de ITS1; A escala representa o número de substituições por sítio. (C) Árvore filogenética não enraizada obtida pelo método de máxima verossimilhança (Max. Likelihood – ML) usando sequências de ITS1 e 2 de modo a resolver a politomia formada pelas outras linhagens LPP; A escala representa o número de substituições por sítio. Os valores de “bootstrap” apresentados sobre os ramos das árvores foram obtidos por buscas heurísticas acima de 100 (parcimônia) ou 1000 (ML) réplicas.

Fonte: Adaptado de DOLINSKI et al., 2008.

Para a árvore obtida pelo método de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood – ML) a pontuação da melhor árvore foi de 147,8. Para a árvore obtida pelo método de máxima parcimônia (Maximum Parsimony – MP) a pontuação para a melhor árvore encontrada foi de 258. Do total de 415 caracteres, 106 foram informativos para calcular a parcimônia. As árvores mostradas na **Figura 12A** e **B** não incluem as linhagens do grupo *indica* por que na análise do ITS 1 este grupo formou uma politomia, resolvida apenas com o uso combinado

das sequências de ITS1 e 2 (**Figura 12C**).

3.1.3 Linhagens de nematoides identificadas

Amostras de solo coletadas em Monte Negro, RO, pelo Doutor Luis Marcelo Camargo no Campus avançado da USP e enviadas para a Dra Claudia Dolinski (UENF, RJ) foram triadas com larvas de *Galleria mellonella* e originaram isolados que foram caracterizados morfolologicamente e biologicamente.

Durante este trabalho foram identificadas e utilizadas duas espécies pertencentes ao gênero *Heterorhabditis*: - *H. indica* e – *H. baujardi*. Ao longo do trabalho os isolados LPP foram sendo classificados como pertencentes a uma ou outra espécie, chegando-se aos dados sintetizados na **Tabela 5**. O **Anexo A** apresenta alinhamento das sequências das linhagens apresentadas e de sequências presentes na literatura, pertencentes às espécies já descritas.

Tabela 5 – Linhagens de nematoides entomopatogênicos isoladas em Monte Negro, Rondônia e sua classificação taxonômica, determinada a partir da abordagem integrada de morfologia e análise filogenética.

Linhagem	Espécie
LPP1	<i>Heterorhabditis indica</i>
LPP2	<i>Heterorhabditis indica</i>
LPP3	<i>Heterorhabditis indica</i>
LPP4	<i>Heterorhabditis indica</i>
LPP5	<i>Heterorhabditis baujardi</i>
LPP7	<i>Heterorhabditis baujardi</i>
LPP8	<i>Heterorhabditis baujardi</i>
LPP9	<i>Heterorhabditis indica</i>
LPP10	<i>Heterorhabditis baujardi</i>
LPP11	<i>Heterorhabditis baujardi</i>
LPP15	<i>Heterorhabditis baujardi</i>

3.2 BACTÉRIAS

3.2.1 Isolamento, manutenção e caracterização bioquímica da linhagem MN7

Através da abordagem descrita em Material e Métodos, fomos capazes de isolar bactérias simbiotes da linhagem LPP7 de nematoides entomopatogênicos (*Heterorhabditis baujardi*) obtidos em Monte Negro, RO.

Foram isoladas bactérias de todas as linhagens de nematoides entomopatogênicos

cultivadas em nosso laboratório. Essas bactérias são γ -proteobactérias gram-negativas e crescem satisfatoriamente em *LB* a 30 °C, mas não a 37 °C. A curva de crescimento mostra que as culturas líquidas atingem fase estacionária somente após 12-18h (NEVES, comunicação pessoal)³.

As colônias são mucosas e após dois dias, em meio sólido, ficam levemente alaranjadas. As duas variantes fenotípicas podem ser diferenciadas com uso do *Meio agar MacConkey* ou *NBTA*. As colônias da variante I absorvem a pigmentação adquirindo uma coloração arroxeada (*MacConkey*) ou azulada (*NBTA*), já as colônias da variante II permanecem sem absorver os pigmentos.

As linhagem foram denominadas MNx (de Monte Negro, local onde ocorreu o isolamento das linhagens de nematoides), onde *x* é o número da linhagem de nematoide correspondente, origem das bactérias isoladas. A adoção do código utilizado deu-se conforme critério adotado nas demais linhagens bacterianas, simbiontes de *Heterorhabditis*, isoladas em outras localidades do mundo.

Por uma questão metodológica, procedemos à caracterização de apenas um isolado bacteriano, posteriormente identificado e denominado *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* linhagem MN7 (DOLINSKI et al, 2008; FISHER-LE SAUX et. al, 1999; TAILLIEZ et al, 2009).

A determinação de características fisiológicas e bioquímicas das bactérias permitiu demonstrar que *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* linhagem MN7 é: - uma enterobactéria com capacidade de fermentar a glicose com produção de gás; - móvel; - produtora de L-triptofano-desaminase; - não produtora da enzima dessulfidrase; - não produtora de urease; - não produtora de triptofanase; - não produtora de lisina-descarboxilase.

A determinação de resistências a antibióticos da linhagem MN7, realizada pela aluna

---

³ NEVES, M.R.C São Paulo, 2009 (comunicação pessoal realizada durante seu estágio de IC no LBMN durante o ano de 2009 e que se estende até o presente momento).

de Iniciação Científica Maira R. de Camargo Neves, permitiu observar suscetibilidade dessas bactérias, nas culturas em LB agar crescidas na presença do multidisco de antibióticos Laborclin®, a antibióticos das classes dos aminoglicosídeos, anfenicóis, cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas de segunda geração, rifamicinas, tetraciclina, e a um antagonista do ácido fólico. A bactéria é resistente a todas as moléculas da classe das penicilinas, as cefalosporinas de primeira, segunda e quarta gerações, inibidores de biossíntese de ácidos nucleicos como glicopeptídeos, derivados de Nitrofurano, fluoroquinolonas de quarta geração, e de segunda geração com exceção de Ciprofloxacina, além de ser resistente a apenas dois inibidores de síntese de proteínas: macrolídeos e lincosamídeos (NEVES, resultados não publicados)⁴.

O isolado foi mantido tanto em cultura líquida como placas de *meios LB* e ou *NA*. Aliquotas também foram congeladas em *Meio LB* suplementado com Glicerol 15% (v/v) em nitrogênio líquido e se encontram estocadas em nosso Departamento.

3. 2. 2 Caracterização molecular da linhagem MN7

A **Figura 6** mostra um esquema da organização de um dos conjuntos de rRNA no genoma de *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii*, linhagem *TT01*. A região representada corresponde à área de interesse para a caracterização molecular de *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* linhagem MN7, chamada simplesmente MN7 a partir de agora.

O DNA de MN7 foi extraído como descrito em Materiais e Métodos. O uso dos oligonucleotídeos PL_SSU_f e PL_SSU_r (**Tabela 3**), numa reação de PCR, resultou num fragmento de aproximadamente 1500 nucleotídeos. Este fragmento, quando digerido com a enzima de restrição *Eco* RI, originou dois fragmentos de tamanhos próximos (650 pb e 870 pb) como predito para diversos gêneros de bactérias do grupo das γ -proteobactérias, às quais

---

⁴ NEVES, M.R.C São Paulo, 2009 (resultados não publicados, parte do projeto de IC da aluna, desdobramento desta tese)

pertencem os gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, simbioses de nematoides entomopatogênicos.

A digestão do mesmo fragmento com a enzima de restrição *Sau* 3AI origina um fragmento principal de aproximadamente 1000 pb nestes dois gêneros, enquanto que as outras γ -proteobactérias (*Escherichia*, *Plesiomonas* e *Serratia*, por exemplo) apresentam padrão de digestão diferente, composto por diversos fragmentos menores (**Figuras 13 e 14**). Esses dados mostraram, de modo preliminar, que a bactéria isolada pertencia a um desses dois gêneros de simbioses. Tal constatação permitiu que passássemos ao próximo passo na caracterização molecular que seria o sequenciamento completo do fragmento de 1500 pb obtido a partir de MN7.

Figura 13- PCR e análise de restrição do fragmento de DNA do SSU rRNA amplificado a partir de DNA de MN07. DNA genômico da bactéria isolada de juvenis infectantes de LPP07 foi submetido a reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos PLSSUf e PLSSUr. O produto amplificado foi digerido com *Eco* RI e *Sau* 3AI. (a) produto da amplificação; (b) digestão com *Eco* RI; (c) digestão com *Sau* 3AI.

Figura 14- Mapas de restrição do SSU rDNA de diferentes gêneros de γ -proteobactérias.

Notar a ausência do sítio de *Sau* 3AI na posição aproximada de 650 bp nos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*.

O sequenciamento completo do fragmento empregou outros oligonucleotídeos presentes na literatura e descritos como capazes de cobrir a região para enterobactérias em geral (**Tabela 3**). As sequências obtidas foram submetidas ao BLAST do NCBI (ALTSCHUL e cols., 1997) e mostrou ser uma sequência similar ao rDNA de bactérias do gênero *Photorhabdus*, simbiontes exclusivos de nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis*.

As sequências do SSU-rRNA bacteriano foram submetidas a análises mais acuradas, como as empregadas para as sequências dos nematoides. Foram inicialmente analisadas e editadas, se necessário em programas do conjunto Lasergene 99 (DNASTAR, E.U.A.) e MEGA versão 4.1 (TAMURA e cols., 2007). Uma vez expurgados de erros e avaliadas quanto à sua qualidade através do uso do software PHRED (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998), sendo selecionadas apenas as sequências com valores de PHRED acima de 40.

As sequências finais foram alinhadas no programa Clustal X v. 2.0.10. (GIBSON; HIGGINS, 2007; THOMPSON e cols., 1997) e posteriormente passaram por análises filogenéticas empregando os softwares. Apresentamos o alinhamento das sequências das hélices na **Figura 15**.

Figura 15- Alinhamento das sequências correspondentes às hélices e alças do SSU rRNA de *P. luminescens* subsp. *luminescens* MN7 com regiões homólogas de outras espécies mostradas em destaque na **Figura 16**. Os pontos correspondem a nucleotídeos conservados entre as sequências. As abreviaturas correspondem àquelas descritas na **Tabela 6**.

Apresentamos as árvores filogenéticas obtidas na **Figura 16**. As análises realizadas com as sequências completas do SSU-rRNA e também utilizando apenas partes dessas sequências, correspondentes às alças variáveis, permitiram a identificação do nosso isolado como sendo pertencente à espécie *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* linhagem MN7.

Figura 16- Cladogramas das sequências de SSU rRNA de diversas espécies de *Photorhabdus* (ver **Tabela Y** para abreviaturas). **A, C e E** alinhamento dos SSU rRNA correspondente à posição 1322 a 2754 do SSU rRNA de *Escherichia coli* (Acc. Nr. J01695). **B, D e F** alinhamento das alças mais variáveis das espécies de *Photorhabdus* analisadas (ver **Figura Z**). Cladogramas E e F enraizados. Condições para construção dos cladogramas: **(A)** Máxima Parcimônia (PAUP); modelo de substituição = HKY+I+G; número de árvores para “bootstrapping”=1000; pontuação da melhor árvore=267; **(B)** Máxima Parcimônia (PAUP); modelo de substituição = HKY+I+G; número de árvores para “bootstrapping”=100; pontuação da melhor árvore=141; **(C)** Inferência Bayesiana (MrBayes); taxas = γ inv; n° de gerações=106; cladograma obtido pelo consenso de 801 árvores geradas pelo consenso da maioria de 50% no programa PAUP; **(D)** Inferência Bayesiana (MrBayes); taxas = γ inv; n° de gerações=106; cladograma obtido pelo consenso de 201 árvores geradas pelo consenso da maioria de 50% no programa PAUP; **(E)** Máxima verossimilhança (ML; RaxML); modelo inicial = GTR + GAMMA; 300 réplicas; grupo externo TT01; **(F)** Máxima verossimilhança (ML; RaxML); modelo inicial = GTR + GAMMA; 300 réplicas; grupo externo PW14. Em A, B, E e F os números nos ramos correspondem a porcentagem de “bootstrapping”; em C e D os números nos ramos correspondem às probabilidades posteriores.

Tabela 6 – Linhagens de *Photorhabdus* isoladas a partir de nematoides entomopatogênicos, sua classificação taxonômica, accession numbers e hospedeiros dos taxa presentes em nossa análise.

Acc. N.	Espécie	Subespécie	Linhagem	Hospedeiro
BX571863	<i>Photorhabdus luminescens</i>	<i>laumondii</i>	TT01	<i>H. bacteriophora</i> HP88
AY278648	<i>Photorhabdus luminescens</i>	<i>laumondii</i>	HP88	<i>H. bacteriophora</i> HP88
AY278647	<i>Photorhabdus luminescens</i>	<i>laumondii</i>	Brecon	<i>H. bacteriophora</i>
AJ560630	<i>Photorhabdus luminescens</i>	<i>kayaii</i>	DSM 15194	<i>H.</i>
AY278642	<i>Photorhabdus luminescens</i>	<i>akhurstii</i>	W14	Isolado a partir de solo na Flórida, EUA
AJ007359	<i>Photorhabdus luminescens</i>	<i>akhurstii</i>	FRG04	<i>H. indica</i> from Guadeloupe
AJ560634	<i>Photorhabdus luminescens</i>	<i>thracaensis</i>	DSM 15199	<i>H.</i>
AY278670	<i>Photorhabdus</i> sp.	-	JUN	
AY280572	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	<i>australis</i>	9802892	<i>H. gerrardi</i>
AY280574	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	<i>australis</i>	GCH001	<i>H. gerrardi</i>
Z76753	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	ATCC	43952	Isolado clínico
Z76755	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	ATCC	43950	Isolado clínico
Z76754	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	ATCC	43951	Isolado clínico
X82248	<i>Photorhabdus luminescens</i>	<i>luminescens</i>	DSM 3368	-
AY278641	<i>Photorhabdus luminescens</i>	<i>luminescens</i>	Hm	<i>H. bacteriophora</i>
AY216500	<i>Photorhabdus</i> sp.	-	Q614	<i>H. sp.</i>
AY278651	<i>Photorhabdus temperata</i>	-	K122	<i>H. downesi</i>
AY296252	<i>Photorhabdus temperata</i>	-	-	-
J007405	<i>Photorhabdus temperata</i>	-	XINach	<i>H. megidis</i>
AY278653	<i>Photorhabdus temperata</i>	-	HL81	<i>H. megidis</i>
AY278657	<i>Photorhabdus temperata</i>		NC19(=C1)	<i>H. heliothidis</i>

Fonte: Composta a partir de BOWEN; ENSIGN, 1998; MAROKHÁZI et al., 2004; TAILLIEZ et al, 2009)

3.2.3 Determinação da estrutura secundária do SSU-rRNA do simbionte

Após o sequenciamento completo do SSU-rRNA de *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens*, foi possível alinhar as sequências obtidas com as de *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TT01 cujo genoma já foi sequenciado e *Escherichia coli* cuja estrutura secundária do SSU-rRNA já é conhecida e serviu de referência para comparação (**Figura 17**).

3.2.4 Isolamento de linhagens de *Ochrobactrum* sp. a partir dos nematoides das

linhagens LPP

Durante o isolamento das linhagens de *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* linhagem MN7 ocorreu também o isolamento concomitante de linhagens das bactérias do Gênero *Ochrobactrum* (LEBUHN et al, 2000). Vários trabalhos na literatura relatam a co-ocorrência de bactérias entomopatogênicas e *Ochrobactrum* (AGUILLERA, 1993a, b; BABIN, 2000;).

A manutenção dos isolados ocorreu tanto em cultura líquida quanto em placas dos Meios LB e ou NA. Aliquotas também foram congeladas em Meio LB suplementado com Glicerol 15% (v/v) em nitrogênio líquido e se encontram estocadas em nosso Departamento.

3.2.5 Caracterização molecular das linhagens OMNn

O DNA das linhagens OMN2, 3 e 4 foi extraído como descrito em Materiais e Métodos. Através do uso dos oligonucleotídeos PL_SSU_f e PL_SSU_r (Tabela 3), numa reação de PCR, obtivemos fragmentos do SSU-rRNA desses isolados.

Após o sequenciamento parcial dos fragmentos amplificados, os dados obtidos foram submetidos ao BLAST do NCBI (ALTSCHUL et al., 1997) e mostraram ser uma sequência similar ao rDNA de bactérias do gênero *Ochrobactrum*, permitindo a identificação parcial das linhagens como pertencentes a esse gênero (HOLMES et al., 1988; LEBUHN et al., 2000; SEGONDS et al., 1999; VELASCO et al., 1998; WEISBURG et al., 1991).

Chegando à identificação parcial dos isolados, surgiu a denominação OMNn, em consonância com o critério empregado na denominação dos isolados das bactérias simbiotes do Gênero *Photorhabdus*. Novamente os números são correspondentes aos isolados LPPn de NEPs (Tabela 7).

Tabela 7 – Linhagens de bactérias isoladas a partir de nematoides entomopatogênicos de Monte Negro, Rondônia e sua classificação taxonômica.

Linhagem	Espécie
MN7	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>luminescens</i>
OMN2	<i>Ochrobactrum</i> sp.
OMN3	<i>Ochrobactrum</i> sp.
OMN4	<i>Ochrobactrum</i> sp.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

4.1 NEPS E A BIODIVERSIDADE

Há uma grande carência de estudos sobre a nematofauna. As estimativas são de que mais 90 % das espécies de nematóides ainda não foram descritas (BLAXTER, 2003). Algumas iniciativas tem surgido no intuito de estudar mais efetivamente a nematofauna. Levantamentos mais sistemáticos da diversidade de espécies de nematóides marinhos da região da Baixa Califórnia, E.U.A., permitiram a descrição de muitas espécies, mesmo com o impacto das atividades humanas na região e as dificuldades inerentes à coleta de organismos localizados marinhos. A prospecção sistemática neste local tem rendido extensos trabalhos de descrição de novas espécies. (HOLOVACHOV, et al, 2008; MUNDO-OCAMPO et al., 2006).

A maioria dos levantamentos de espécies de NEPs presentes na literatura são também muito fragmentados e restritos, atendo-se à descrição pura e simples, provavelmente aumentando artificialmente a biodiversidade (ANDALÓ; NGUYEN; ALCIDES, 2006; STOCK; GRESS, 2006)

No Brasil poucos estudos foram realizados sobre nematoides entomopatogênicos nativos. A primeira descrição taxonômica de uma espécie entomopatogênica isolada no Brasil foi feita por Pereira em 1927 e era a única até recentemente quando *Heterorhabditis amazonensis* foi descrito por Alcides, Andaló e Nguyen em 2006.

Recentemente o interesse por nematoides entomopatogênicos ressurgiu como uma alternativa para o controle biológico de insetos-pragas e vetores (DOLINSKI et al., 2008). Em outros países, a utilização de nematoides entomopatogênicos para controle biológico de pragas remonta ao fim do século XIX (EHLER, 1990; HUNT; NGUYEN, 2007).

Este trabalho caracterizou alguns isolados de nematóides entomopatogênicos originários de amostras de solo da Floresta Equatorial Amazônica. Os trabalhos experimentais incluíram a caracterização molecular dos dois organismos envolvidos na patogenia: o nematóide e sua bactéria associada. A caracterização biológica e morfológica do nematóide foi feita pela Dra. Claudia Dolinski, UENF-RJ, num projeto em colaboração do nosso laboratório. As amostras de solo foram coletadas em Monte Negro no campus avançado da Universidade de São Paulo (ICB-V), ligado ao Departamento de Parasitologia do ICB.

4.2 ISOLAMENTO DE NEPS

O estudo de isolados nativos de nematóides entomopatogênicos desperta um interesse econômico, que vai além do simples levantamento e catalogação da biodiversidade de modo a balizar as políticas públicas de acesso e uso da biodiversidade (ADAMS, 1998). É evidente o potencial para um possível aproveitamento dos isolados no controle biológico de insetos considerados pragas de plantas cultivadas.

Levantamentos da viabilidade de aplicação a campo dos isolados amazônicos, estudados neste trabalho, tem sido realizados pelo grupo da Dra. Claudia Dolinski, nossa colaboradora, com relativo sucesso. (DEL VALLE et al., 2008). Isolados da região sudeste do Brasil também tem sido descritos e testados, por alguns grupos do estudo de NEPs que estão estabelecidos principalmente em Lavras, MG (ANDALÓ et al., 2006), no Instituto Biológico de Campinas, SP (TAVARES et al., 2007).

A substituição das espécies de NEPs exóticas atualmente empregadas no controle biológico de insetos praga por espécie nativas é amplamente vantajosa, tanto do ponto de vista econômico, quanto do ponto de vista do impacto que a introdução de organismos exóticos nos ecossistemas brasileiros pode produzir. Aliás, a introdução de espécies exóticas de NEP nunca teve o seu impacto sobre a fauna de nematóide nativos estudado de nenhuma forma.

Se existe um interesse em utilizar determinada linhagem de nematóides entomopatogênicos para controle biológico, Gaugler e Kaya (1990) apontam dois aspectos devem ser analisados: 1. melhoramento genético das linhagens e 2. o estudo das interações bactéria-nematóide. Os resultados obtidos facilitarão atingir estes dois aspectos numa futura utilização dos nematóides isolados em Rondônia.

Um aspecto importante do estudo de nematóides entomopatogênicos está relacionado com a identificação das espécies, linhagens de nematóides e suas bactérias associadas. Um problema fundamental no estudo da coevolução hospedeiro-parasita é a reconstrução da história dessa associação. É importante saber até que ponto hospedeiros e parasitas se co-especiaram (associação por descendência) e até que ponto parasitas mudaram de hospedeiros (associação por colonização). Estes processos, combinados com especiação e extinção independentes de ambos os membros da simbiose, deixará seus traços nas filogenias dos hospedeiros e dos parasitas (PAGE; HOLMES, 1998).

A produção em escala industrial de nematóides entomopatogênicos tem uma vasta literatura disponível, onde técnicas permitem o cultivo bem-sucedido destes animais para o controle biológico de pragas culturais causadas por insetos em geral (BEDDING, 1981, 1983;

SHAPIRO-ILAN; GAUGLER, 2002; HUNT; NGUYEN, 2007).

4.3 BIOGEOGRAFIA DO GÊNERO *HETEROTHABDITIS*

Apesar das vantagens que decorrem da descrição de uma nova espécie, a nossa abordagem integrada de biologia molecular e morfologia aponta para a presença em simpatria de dois grupos distintos pertencentes ao gênero *Heterorhabditis*, membros de espécies previamente caracterizadas (*Heterorhabditis baujardi* e *H. indica*), até que mais dados estejam disponíveis. Evitamos assim a “inflação taxonômica” (ISAAC; MALLET; MACE, 2004) ou os erros de tipo I (superestimar a quantidade real de espécies presentes em determinado bioma) (ADAMS, 1998).

A morfologia do gubernáculo é um caracter que ainda carece de investigação aprofundada em outras espécies previamente descritas nestes grupos. É um caracter muito importante do ponto de vista morfológico, dando embasamento à descrições de algumas das espécies que estudamos como *H. baujardi*, *H. amazonensis*, *H. mexicana*, *H. floridensis* e *H. indica*. As evidências moleculares que obtivemos apontam para uma grande similaridade genética entre componentes de cada um dos dois grupos (complexos) de espécies que decrevemos (Grupo *baujardi* e Grupo *indica*) (DOLINSKI, et al. 2008).

Considerando as grandes distâncias geográficas entre os locais de isolamento, duas cenários prováveis surgem de modo a explicar a distribuição biogeográfica destes animais: - Todas as espécies são diferentes, basendo-se apenas na localidade de isolamento; - As espécies pertencem a grupos previamente descritos, a despeito da distância, mas considerando os dados da nossa abordagem integrada de caracteres moleculares e morfológico.

Caso exista a necessidade de optar por algum dos cenários, a questão é como considerar as diferenças (subestimar ou superestimar). Adams (1998) considera as duas soluções erros metodológicos, mas considera que superestimar a biodiversidade (erro do tipo I) é menos grave que subestimá-la. Entretanto, ressalva que a abordagem integrada deve prevalecer sobre as descrições puramente morfológicas, que produziram o cenário atual no estudo da taxonomia do gênero estudado.

Estudos mostraram que os haplótipos de sequencias gênicas de *C. briggsae* tem muito pouca diversidade ao se considerar as mesmas latitudes de ocorrência, mas variam mais à medida que os locais fiquem mais distante da linha do Equador. Isso levanta a possibilidade de ocorrer um padrão de distribuição biogeográfica em “linhas latitudinais”; (DOLGIN; FÉLIX; CUTTER, 2007), talvez numa reprodução em escala maior do fenômeno que ocorre

em regiões montanhosas, com altitudes elevadas, onde a biodiversidade reflete mais fortemente as linhas altimétricas, do que a latitude.

Os dados apresentados reforçam a credibilidade do segundo cenário, propondo uma hipótese razoável para a atual distribuição biogeográfica dos heterorhabditídeos.

4.4 GENÔMICA DE *HETERORHABDITIS*

O advento do sequenciamento completo dos genomas dos nematóides rhabditídeos, *C. elegans* (TCESC, 1998) e *C. briggsae* (STEIN et al., 2003) contribuiu de modo significativo para os estudos genômicos realizados em todos os outros nematóides e para este trabalho, visto que agora é possível comparar as sequências obtidas com os genomas de duas espécies-modelo já estabelecidas. As sequências dos oligonucleotídeos inicialmente utilizados em nossos experimentos de PCR derivam destes estudos.

Durante o ano de 2005 o NHGRI (National Human Genome Research Institute) dos EUA liberou financiamento para o início do sequenciamento 6X ou “high-quality draft” do genoma de *Heterorhabditis bacteriophora*. Atualmente, o pirosequenciamento utilizando o sequenciador 454 (Roche Applied Science, EUA) está terminado <http://genome.wustl.edu/genomes/view/heterorhabditis_bacteriophora/>. Os dados gerados por este projeto serão importantes para a compreensão da relação parasita-hospedeiro no gênero *Heterorhabditis*, bem como para estudos de evolução e distribuição geográfica do gênero (CICHE, 2007)

4.5 GENÔMICA DE *PHOTORHABDUS*

O genoma de *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondi* linhagem TT01 tem aproximadamente 5,6 Mbp (42,9 % GC) e contém 4389 genes <<http://157.99.64.78/PhotoList/>> para proteínas que codificam um número muito grande de toxinas proteicas, maior que o de outras enterobactérias descritas, como *E. coli*. Muitas destas toxinas são secretadas e provavelmente levam à morte do inseto parasitado e torna factível a análise comparada das bactérias simbiontes presentes nos nematóides isolados do solo da floresta amazônica (BOEMARE; AKHURST; MOURANT, 1993; DUCHAUD et al, 2003; HEERMANN; FUCHS, 2008; GAUDRIALT et al., 2006).

O genoma seqüenciado é um poderoso instrumento para análise sobre os diferentes mecanismos metabólicos presentes em *P. luminescens*. A manutenção laboratorial de

bactérias do Gênero *Photorhabdus* tem um fator complicador que é a existência, anteriormente descrita, de duas formas fenotípicas ou fases distintas e denominadas variante I e variante II, com propriedades completamente distintas. A diferenciação entre as duas fases é possível com a utilização do *meio NBTA*, através da absorção do pigmento azul de bromotimol e redução do *TTC* por parte das células em variante I, o que não ocorre com as células em variante II e levando a colônias claramente distintas (AKHURST, 1980; NGUYEN; HUNT, 2007). Turlin et al., 2006 realizam uma análise proteômica da variação fenotípica levando a uma caracterização dos perfis de expressão de cada variante.

4.6 ESTABELECIMENTO DE ORGANISMOS MODELO

O estabelecimento de organismos modelos é um processo complexo que requer muitos fatores em conjunto e a adesão da comunidade científica. Exemplos presentes na literatura mencionam os modelos já estabelecidos, como *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (DAVIS, 2004).

Atualmente este processo está mais flexível, pois as técnicas necessárias para o sucesso de um modelo estão mais acessíveis, reduzindo a necessidade de investimentos para a obtenção de resultados expressivos. Um dos requisitos mais importantes para um modelo é o sequenciamento completo do genoma, que facilita enormemente a abordagem molecular. As outras características de modelos envolvem características biológicas que facilitem o cultivo laboratorial, tempo de geração curto, possibilidade de realização de estudos genéticos.

Esta flexibilidade permitiu que *Heterorhabditis* e *Photorhabdus* sejam apontados como modelos emergentes e para os quais já estão sendo obtidos resultados no esteio do conhecimento obtido para *C. elegans*. Recentemente foram obtidos resultados envolvendo a ocorrência do fenômeno de RNAi em *Heterorhabditis*, expandindo ainda mais o leque de abordagens moleculares que podem ser empregadas.

As particularidades do modelo ampliam ainda mais as possibilidades de abordagem de uma gama extensa de perguntas biológicas, uma vez que poucos organismos em simbiose atendem aos requisitos para tornarem-se modelos.

O parasitismo pode ser abordado do ponto de vista do nematoide e seu comportamento de busca ativa pelos insetos: Quais sinais ambientais servem de guia para esta busca? Como as raízes de plantas predadas podem recrutar nematoides entomopatogênicos? Como surgiu o hábito entomopatogênico? Se a origem foi independente, o que transformou nematoides forontes de insetos em entomopatógenos. Qual a origem da associação com bactérias?

Com o enfoque voltado para bactéria: quais os mecanismos moleculares que permitem a desativação do sistema imune do inseto durante o ataque ao hospedeiro? Qual o papel dos metabólitos secundários secretados pelas bactérias na colonização dos tecidos e do tubo digestório do inseto? Quais mecanismos permitem à bactéria reconhecer o nematoide e as células corretas para invadir no momento da transmissão a partir da fêmea anfimíctica para a prole de juvenis infectantes? Qual é a sinalização que mostra à bactéria sua localização, no tubo digestório do nematoide ou do inseto hospedeiro? Qual a origem evolutiva das bactérias entomopatogênicas? Seriam parasitas de mamíferos que mudaram de hospedeiros? Seriam bactérias foréticas que passaram a atacar os hospedeiros? Seria a transferência horizontal de genes responsável pela aquisição do grande número de genes envolvidos com a secreção de produtos metabólicos em *Photorhabdus*, como hipotetizado para o operon lux responsável pela luminescência?

As perguntas levantadas poderão ser respondidas através do fortalecimento do modelo *Heterorhabditis/Photorhabdus*, aproveitando-se o excelente momento de crescimento do conhecimento acumulado.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. J. Species Concepts and the Evolutionary Paradigm in Modern Nematology. **Journal of Nematology**, v. 30, n. 1, p. 1–21, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620279/pdf/1.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2008.
- ADAMS, B. J.; FODOR, A.; KOPPENHÖFER, H. S.; STACKEBRANDT, E.; STOCK, S. P.; KLEIN, M. G. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. **Biological Control**, v. 37, p. 32-49, 2006. Disponível em: <doi: 10.1016/j.biocontrol.2005.11.008>. Acesso em: 8 mar. 2010.
- AGUILLERA, M. M.; SMART JR., G. C. Development, reproduction, and pathogenicity of *Steinernema scapterisci* in monoxenic culture with different species of bacteria. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, n. 3, p. 289-294, 1993. Disponível em: <doi: 10.1006/jipa.1993.1115>. Acesso em: 23 jan. 2010.
- AGUILLERA, M. M.; HODGE, N. C.; STALL, R. E.; SMART JR., G. C. Bacterial symbionts of *Steinernema scapterisci*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, p. 68-72, 1993. Disponível em: <doi:10.1006/jipa.1993.1076>. Acesso em: 23 jan. 2010.
- AGUINALDO, A. M. A.; TURBEVILLE, J. M.; LINDFORD, J. M.; RIVERA, M. C.; GAREY, J. R.; RAFF, R. A.; LAKE, J. A. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. **Nature**, v. 387, p. 489-493, 1997. Disponível em: <http://cima.uprm.edu/~n_schizas/CMOB_8676/NematodePhylogeny.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2010.
- AHRINGER, J. Reverse genetics. In: CHALFIE, M. (Ed.). **WormBook**. [S. l.] The *C. elegans* Research Community, 2006. Disponível em: <doi:10.1895/wormbook.1.47.1>. Acesso em: 15 mar. 2010.
- AKHURST, R. J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. **Journal of General Microbiology**, v. 121, p. 303-309, 1980. Disponível em: <doi: 10.1099/00221287-121-2-303>. Acesso em: 26 fev. 2010.
- AKHURST, R.; SMITH, K. Regulation and safety. In GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. New York, NY, USA: CABI Publishing, 2002. p. 311-332.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/25/17/3389>>. Acesso em: 6 mar. 2010.
- ANDALÓ, V.; NGUYEN, K. B.; ALCIDES, M. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology**, v. 8, n. 6, p. 853-867, 2006. Disponível em: <doi: 10.1163/156854106779799286>. Acesso em: 15 fev. 2010.
- BABIC, I.; FISCHER, L. E.; SAUX, M.; GIRAUD, E.; BOEMARE, N. E. Occurrence of natural dixenic associations between the symbiont *Photorhabdus luminescens* and bacteria related to *Ochrobactrum* spp. In

tropical entomopathogenic *Heterorhabditis* spp. (Nematoda, Rhabditida). **Microbiology**, v. 146, p. 709-718, 2000. Disponível em: <<http://mic.sgmjournals.org/cgi/reprint/146/3/709>>. Acesso em: 13 fev. 2010.

BEDDING, R. A. Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. **Nematologica**, v. 27, n. 1, p. 109-114, 1981. Disponível em: <<http://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/brill/00282596/v27n1/s11.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

BEDDING, R. A.; MOLYNEUX, A. S.; AKHURST, R. J. *Heterorhabditis* spp., *Neoaplectana* spp., and *Steinernema kraussei*: Interspecific and intraspecific differences in infectivity for insects. **Experimental Parasitology**, v. 55, n. 2, p. 249-257, 1983. Disponível em: <doi:10.1016/0014-4894(83)90019-X>. Acesso em: 26 fev. 2010.

BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1673-1685, 2005. Disponível em: <doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x>. Acesso em: 8 dez. 2009.

BLACKBURN, M.; GOLUBEVA, E.; BOWEN, D.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*, toxin complex a (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *Manduca sexta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 3036-3041, 1998. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/64/8/3036>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

BLAXTER, M. L.; DE LEY, P.; GAREY, J. R.; LIU, L. X.; 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**, v. 392, p. 71-75, 1998. Disponível em: <<http://www.nem.wur.nl/NR/rdonlyres/D52C0164-63D3-4BE4-B22E-D6EA965208D3/50021/Blaxteretal1998.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2010.

BLAXTER, M. Molecular systematics: Counting angels with DNA. **Nature** v. 421, n. 6919, p. 122-124, 2003. Disponível em: <<http://servente.area.ge.cnr.it/sds/DbToC/include/filefr.php?id=2641043&wh=nm>> Acesso em: 19 fev. 2010.

BODE, H. B. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Current Opinon in Chemichal Biology**, v. 13, n. 2, 2009. Disponível em: <doi:10.1016/j.cbpa.2009.02.037>. Acesso em: 18 fev. 2010.

BOEMARE, N. E.; AKHURST, R. J.; MOURANT, R. G. DNA Relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), Symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a New Genus, *Photorhabdus* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 43, p. 249-255, 1993. Disponível em: <doi: 10.1099/00207713-43-2-249>. Acesso em: 19 nov. 2009.

BOEMARE, N.; LAUMON, C.; MAULEON, H. The entomopathogenic nematode-bacterium complex: biology, life cycle and vertebrate safety. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, n. 3, p. 333-346, 1996. Disponível em: <doi: 10.1080/09583159631316>. Acesso em: 23 fev. 2010.

BOEMARE, N. E.; GIVAUDAN, A.; BREHELIN, M.; LAUMOND, C. Symbiosis and pathogenicity of nematode-bacterium complexes. **Symbiosis**, v. 22, p. 21-45, 1997.

BOEMARE, N. E. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. New York, NY, USA: CABI Publishing, 2002. 402 p.

BONGERS, T.; BONGERS, M. Functional diversity of nematodes. **Applied Soil Ecology**, v. 10, p. 239-251, 1998. Disponível em: <doi:10.1016/S0929-1393(01)00152-4>. Acesso em: 25 fev. 2010.

BONIFASSI, E.; FISCHER-LE SAUX, M.; BOEMARE, N.; LANOIS, A.; LAUMOND, C.; SMART, G. Gnotobiological study of infective juveniles and symbionts of *Steinernema scapterisci*: A model to clarify the concept of the natural occurrence of monoxenic associations in entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, p. 164-172, 1999. Disponível em: <doi:10.1006/jipa.1999.4866>. Acesso em: 23 fev. 2010.

BOWEN, D. J.; ENSIGN, J. C. Purification and characterization of a high-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 8, p. 3029-3035, 1998. Disponível em: <http://aem.hiwire.org/cgi/reprint/64/8/3029>. Acesso em: 23 fev. 2010.

BOWEN, D.; ROCHELEAU, T. A.; BLACKBURN, M.; ANDREEV, O.; GOLUBEVA, E.; BHARTIA, R.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Insecticidal toxins from bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Science**, v. 280, n. 5372, p. 2129-2132, 1998. Disponível em: <doi: 10.1126/science.280.5372.2129> . Acesso em: 10 dez. 2009.

BUSH, A. O.; FERNÁNDEZ, J. C.; ESCH, G. W.; SEED, J. R. **Parasitism – the diversity and ecology of animal parasites**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2001. 576 p.

CICHE, T. A.; ENSIGN, J. C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out?. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1890-1897, 2003. Disponível em: <doi: 10.1128/AEM.69.4.1890-1897.2003>. Acesso em: 10 fev. 2010.

CICHE, T. The biology and genome of *Heterorhabditis bacteriophora*. In: CHALFIE, M. (Ed.). **WormBook**. [S. l.]: The *C. elegans* Research Community, 2006. Disponível em: <doi:10.1895/wormbook.1.47.1>. Acesso em: 15 mar. 2010.

CICHE, T. A.; STERNBERG, P. W. Postembryonic RNAi in *Heterorhabditis bacteriophora*: a nematode insect parasite and host for insect pathogenic symbionts. **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 101, 2007. Disponível em: <doi:10.1186/1471-213X-7-101>. Acesso em: 15 fev. 2010.

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**, v. 74, n. 8, p. 2275-2287, 2008. Disponível em: <doi:10.1128/AEM.02646-07>. Acesso em: 9 mar. 2010.

COSTA, S. C. P.; GIRARD, P. A.; BREHÉLIN, M.; ZUMBIHL, R. The Emerging Human Pathogen *Photorhabdus asymbiotica* is a facultative intracellular bacterium and induces apoptosis of macrophage-like cells. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 1022-1030, 2009. Disponível em: <doi: 10.1128/IAI.01064-08>. Acesso em: 19 mar. 2010.

DAVIS, R. H. The age of model organisms. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 69–76, 2004. Disponível em: <doi:10.1038/nrg1250>. Acesso em: 26 fev. 2010.

DEL VALLE, E. E.; DOLINSKI, C.; BARRETO, E. L. S.; SOUZA, R. M.; SAMUELS, R. I. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii*, (Coleoptera: Curculionidae) larvae. **Biocontrol Science and**

Technology, v. 18, n. 1, p. 33 - 41, 2008. Disponível em: <doi: 10.1080/09583150701721713>. Acesso em: 21 mar. 2010.

DERZELLE, S.; DUCHAUD, E.; KUNST, F.; DANCHIN, A.; BERTIN, P. Identification, characterization, and regulation of a cluster of genes involved in carbapenem biosynthesis in *Photobacterium luminescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3780-3789, 2002. Disponível em: <doi: 10.1128/AEM.68.8.3780-3789.2002>. Acesso em: 18 nov. 2009.

DIETERICH, C. et al. The *Pristionchus pacificus* genome provides a unique perspective on nematode lifestyle and parasitism. **Nature Genetics**, v. 40, p. 1193-1198, 2008. Disponível em: <doi:10.1038/ng.227>. Acesso em: 12 dez. 2009.

DOLGIN, E. S.; FÉLIX, M.-A.; CUTTER, A. D. Hakuna Nematoda: genetic and phenotypic diversity in African isolates of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae*. **Heredity**, v. 100, p. 304-315, 2007. Disponível em: <doi:10.1038/sj.hdy.6801079>. Acesso em: 21 fev. 2010.

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. Disponível em: <doi: 10.1590/S0074-02762008000200005>. Acesso em: 18 jan. 2010.

DORRIS, M.; DE LEY, P.; BLAXTER, M. L. Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. **Parasitology Today**, v. 15, n. 5, p. 188-193, 1999. Disponível em: <<http://faculty.uml.edu/rhochberg/hochberglab/Courses/Parasite/PDF%20Papers/Nematodes/Nematode%20Diversity%20Parasitism.pdf>>. Acesso em: 16 fev. 2010.

DORRIS, M.; VINEY, M. E.; BLAXTER, M. L. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1507-1517, 2002. Disponível em: <doi:10.1016/S0020-7519(02)00156-X>. Acesso em: 11 fev. 2010.

DUCHAUD, E.; RUSNIOK, C.; FRANGEUL, L.; BUCHRIESER, C.; GIVAUDAN, A.; TAOURIT, S.; BOCS, S.; BOURSAUX-EUDE, C.; CHANDLER, M.; CHARLES, J.-F.; DASSA, E.; DEROSE, R.; DERZELLE, S.; FREYSSINET, G.; GAUDRIAULT, S.; MÉDIGUE, C.; LANOIS, A.; POWELL, K.; SIGUIER, P.; VINCENT, R.; WINGATE, V.; ZOUINE, M.; GLASER, P.; BOEMARE N.; DANCHIN A.; KUNST F. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens*. **Nature Biotechnology**, v.21, p. 1307-1313, 2003. Disponível em: <doi:10.1038/nbt886>. Acesso em: 20 dez. 2009.

DUSENBERY, D. B.; SHERIDAN, R. E.; RUSSELL, R. L. Chemotaxis-defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 80, n. 2, p. 297-309, 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1213328/pdf/297.pdf>>. Acesso em: 8 mar. 2010.

EASOM, C. A.; JOYCE, S. A.; CLARKE, D. J. Identification of genes involved in the mutualistic colonization of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* by the bacterium *Photobacterium luminescens*. **BMC Microbiology**, v. 10, a. 45, 2010. Disponível em: <doi:10.1186/1471-2180-10-45>. Acesso em: 20 mar. 2010.

EHLER, L. E. Some contemporary issues in biological control of insects and their relevance to the use of entomopathogenic nematodes. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1990. p. 1-19.

EHLERS, R.-U.; JOHNIGK, S.-A. Juvenile development and life cycle of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. indica* (Nematoda: Heterorhabditidae). **Nematology**, v. 1, p. 251–260, 1999a. Disponível em: <doi: 10.1163/156854199508234>. Acesso em: 19 mar. 2010.

EHLERS, R.-U.; JOHNIGK, S.-A. Endotokia matricida in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp. and the effect of the food supply. **Nematology**, v. 1, p. 717–726, 1999b. Disponível em: <doi: 10.1163/156854199508748>. Acesso em: 19 mar. 2010.

ELEFThERIANOS, I.; BOUNDY, S.; JOYCE, S. A.; ASLAM, S.; MARSHALL, J. W.; COX, R. J.; SIMPSON, T. J.; CLARKE, D. J.; FFRENCH-CONSTANT, R. H.; REYNOLDS, E. S. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defences through phenoloxidase inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 7, p. 2419–2424, 2007. Disponível em: <doi: 10.1073/pnas.0610525104>. Acesso em: 29 mar. 2010.

EMELIANOFF, V.; LE BRUN, N.; PAGÈS, S.; STOCK, S. P.; TAILLIEZ, P.; MOULIA, C.; SICARD, M. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 211–217, 2008. Disponível em: <doi: 10.1016/j.jip.2008.01.006>. Acesso em: 21 fev. 2010.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186–194, 1998. Disponível em: <doi: 10.1101/gr.8.3.186>. Acesso em: 11 fev. 2010.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175–185, 1998. Disponível em: <doi: 10.1101/gr.8.3.175>. Acesso em: 11 fev. 2010.

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; WATERFIELD, N.; BURLAND, V.; PEMA, N. T.; DABORN, P. J.; BOWEN, D.; BLETNER, F. R. A genomic sample sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* W14: potential implications for virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3310–3329, 2000. Disponível em: <http://aem.asm.org/cgi/reprint/66/8/3310>. Acesso em: 19 jan. 2010.

FFRENCH-CONSTANT, R.; WATERFIELD, N.; DABORN, P.; JOYCE, S.; BENNET, H.; AU, C.; DOWLING, A.; BOUNDY, S.; REYNOLDS, S.; CLARKE, D. *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 433–456, 2003. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1574-6976.2003.tb00625.x>. Acesso em: 26 fev. 2010.

FISHER-LE SAUX, M.; VIALARD, V.; BRUNEL, B.; NORMAND, P.; BOEMARE, N. E. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, p. 1645–1656, 1999. Disponível em: <doi: 10.1099/00207713-49-4-1645>. Acesso em: 19 jan. 2010.

FORST, S.; DOWDS, B.; BOEMARE, N.; STACKEBRANDT, E. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 47–72, 1997. Disponível em: <doi:10.1146/annurev.micro.51.1.47>. Acesso em: 20 jan. 2010.

GAUDRIALT, S.; DUCHAUD, E.; LANOIS, A.; CANOY, A. S.; BOUROT, S.; DEROSE, R.; KUNST, F.; BOEMARE, N.; GIVAUDAN, A. Whole-genome comparison between *Photorhabdus* strains to identify

genomic regions involved in the specificity of nematode interaction. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 809–814, 2006. Disponível em: <doi: 10.1128/JB.188.2.809-814.2006>. Acesso em: 7 dez. 2009.

GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1990. 384 p.

GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. New York, NY, USA: CABI Publishing, 2002. 402 p.

GERRARD, J.; WATERFIELD, N.; VOHRA, R.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 229-237, 2004. Disponível em: <doi:10.1016/j.micinf.2003.10.018>. Acesso em: 10 mar. 2010.

GERRARD, J. G.; JOYCE, S. A.; CLARKE, D. J.; FFRENCH-CONSTANT, R. H.; NIMMO, G. R.; LOOKE, D. F. M.; FEIL, E. J.; PEARCE, L.; WATERFIELD, N. R. Nematode symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1562-1564, 2006. Disponível em: <doi:10.1017/S0022149X09222942>. Acesso em: 21 jan. 2010.

GHOSH, A. R.; D SEN, D.; SACK, D. A.; A T; HOQUE, A. T. Evaluation of conventional media for detection of colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2163–2166, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265715/pdf/jcm00020-0215.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2010.

GOMES, M. G. L. **Identificação de epítomos da fimbria CFA/I de *Escherichia coli* enterotoxigênica inseridos na flagelina de *Salmonella***. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996. Resumo disponível em: <http://servicos.capes.gov.br/capesdw/resumo.html?idtese=1996131001017012P6>. Acesso em: 11 mar. 2010.

GOODRICH-BLAIR, H.; CLARKE, D. J. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 260-268, 2007. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05671.x>. Acesso em: 25 fev. 2010.

GOUGE, D. H.; SYNDER, J. L. Temporal association of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) and bacteria. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 91, p. 147-157, 2006. Disponível em: <doi: 10.1016/j.jip.2005.12.003 >. Acesso em: 12 jan. 2010.

GRAUR, D.; LI, W.-H. **Fundamentals of molecular evolution**. 2. ed. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates Inc. 2001. 496 p.

GRENIER, E.; CATZEFLIS, F. M.; ABAD, P. Genome sizes of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda : Rhabditida). **Parasitology**, v. 114, p. 497-501, 1991. Disponível em: <doi: 10.1017/S0031182096008736>. Acesso em: 9 jan. 2010.

HEERMANN, R.; FUCHS, T. M. Comparative analysis of the *Photorhabdus luminescens* and the *Yersinia enterocolitica* genomes: uncovering candidate genes involved in insect pathogenicity. **BMC Genomics**, v. 9, a. 40, 2008. Disponível em: <doi:10.1186/1471-2164-9-40>. Acesso em: 5 fev. 2010.

- HODDA, M. Phylum Nematoda. **Zootaxa**, v. 1668, p. 1-766, 2007 (Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy). Disponível em: < <http://www.mapress.com/zootaxa/2007/zt01668p293.pdf> >. Acesso em: 25 fev. 2010.
- HOLMES, B.; POPOFF, M.; KIREDJIAN, M.; KERSTERS, K. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from Human Clinical Specimens and Previously Known as Group Vd. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 38, p. 406-416, 1988. Disponível em: <doi: 10.1099/00207713-38-4-406>. Acesso em: 25 fev. 2010.
- HOLOVACHOV, O.; DE LEY, I. T.; MUNDO-OCAMPO, M.; DE LEY, P.; ROCHA-OLIVARES, A.; BALDWIN, J. G. Nematodes from the Gulf of California. Part 1. The genera *Ceramonema* Cobb, 1920, *Pselionema* Cobb in Cobb, 1933 and *Pterygonema* Gerlach, 1954 (Nematoda: Ceramonematidae) **Nematology**, v. 10, n. 3, p. 347-373, 2008. Disponível em: <http://dob.cicese.mx/labs/ecolmolecular/pdfs/2008_Nematology_10.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2010.
- HOLTERMAN, M.; WURFF, A. VAN DER.; ELSEN, S. VAN DEN.; MEGEN, H. VAN.; BONGERS, T.; HOLOVACHOV, O.; BAKKER, J.; HELDER, J. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among Nematodes and accelerated evolution toward crown clades. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 9, p. 1792-1800, 2006. Disponível em: <doi:10.1093/molbev/msl044>. Acesso em: 28 jan. 2010.
- HOMINICK, W. M.; REID, A. P. Perspectives on entomopathogenic nematology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1990. p. 327-345.
- HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics** 17:754-755, 2001. Disponível em: <<http://www.caprila.org/Phylogeny/molsys/data/manual.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2010.
- HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003. Disponível em: <<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/reprint/19/12/1572>> Acesso em: 21 out. 2009.
- ISAAC, N. J. B.; MALLET, J.; MACE, G. M. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 9, p. 464-469, 2004. Disponível em: <doi: 10.1016/j.tree.2004.06.004>. Acesso em: 21 set. 2009.
- JACKSON, T. J.; WANG, H.; NUGENT, M. J.; GRIFFIN, C. T.; BURNELL, A. M.; DOWDS, B. C. A. Isolation of insect pathogenic bacteria, *Providencia rettgeri*, from *Heterorhabditis* spp. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 3, p. 237-244, 1995. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb05022.x>. Acesso em: 25 fev. 2010.
- KIONTKE, K.; HIRONAKA, M.; SUDHAUS, W. Description of *Caenorhabditis japonica* n. sp. (Nematoda: Rhabditida) associated with the burrower bug *Parastrachia japonensis* (Heteroptera: Cydnidae) in Japan. **Nematology**, v. 4, n. 8, p. 933-941, 2002. Disponível em: <doi: 10.1163/156854102321122557 >. Acesso em: 13 dez. 2009.
- KONINGS, D.A.M.; GUTELL, R.R. A comparison of thermodynamic foldings with comparatively derived structures of 16S and 16S-like rRNAs. **RNA**, v. 1, p. 559-574, 1995. Disponível em: <<http://rnajournal.cshlp.org/content/1/6/559.full.pdf+html>>. Acesso em: 21 nov. 2009.

- KREBS, J. E.; GOLDSTEIN, E. S.; KILPATRICK, S. T. **GENES X**. Sudbury, MA, USA: Jones & Bartlett Learning. 2009. 936 p.
- LANAVE, C.; PREPARATA, G.; SACCONI, C.; SERIO, G. A new method for calculating evolutionary substitution rates. **Journal of Molecular Evolution**, v. 20, p. 86-93, 1984. Disponível em: <doi: 10.1007/BF02101990>. Acesso em: 16 set. 2009.
- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTINGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007. Disponível em: <doi:10.1093/bioinformatics/btm404>. Acesso em: 6 fev. 2010.
- LEBUHN, M.; ACHOUAK, W.; SCHLOTTER, M.; BERGE, O.; MEIER, H.; BARAKAT, M.; HARTMANN, A.; HEULIN, T. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 2207-2223, 2000. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/50/6/2207>. Acesso em: 10 fev. 2010.
- LITVAITIS, M. K.; BATES, J. W.; HOPE, D.; MOENS, T. Inferring a classification of the Adenophorea (Nematoda) from nucleotide sequences of the D3 expansion segment (26/28S rDNA). **Canadian Journal of Zoology**, v. 78, n. 6, p. 911-922, 2000. Disponível em: <http://article.pubs.nrc-cnrc.gc.ca/RPAS/rpv?hm=HInit&calyLang=eng&journal=cjz&volume=78&afpf=z00-039.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2010.
- LIU, J.; BERRY, R. E.; BLOUIN, M. S. Identification of symbiotic bacteria (*Photorhabdus* and *Xenorhabdus*) from the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis marelatus* and *Steinernema oregonense* based on 16S rDNA sequence. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, p. 87-91, 2001. Disponível em: <doi:10.1006/jipa.2001.5007>. Acesso em: 5 dez. 2009.
- MACCONKEY, A. T. Bile salt media and their advantages in some bacteriological examinations. **Journal of Hygiene (London)**, v. 8, n. 3, p. 322-334, 1908. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2167122/>. Acesso em: 19 jan. 2010.
- MALLAT, J.; GIRIBET, G. Further use of nearly complete 28S and 18S rRNA genes to classify Ecdysozoa: 37 more arthropods and a kinorinch. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 3, p. 772-794, 2006. Disponível em: <doi:10.1016/j.ympev.2006.04.021>. Acesso em: 26 fev. 2010.
- MAROKHÁZI, J.; LENGYEL, K.; PEKA, S.; FELFO, G.; PATTY, A.; GRÁF, L.; FODOR, A.; VENEKEIL, I. Comparison of proteolytic activities produced by entomopathogenic *Photorhabdus* bacteria: strain- and phase-dependent heterogeneity in composition and activity of four enzymes. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7311-7320, 2004. Disponível em: <doi: 10.1128/AEM.70.12.7311-7320.2004>. Acesso em: 11 nov. 2009.
- MELDAL, B. H. M.; DEBENHAM, N. J.; DE LEY, P.; DE LEY, I. T.; VANFLETEREN, J. R.; VIERSTRAETE, A. R.; BERT, W.; GAETAN, B.; MOENS, T.; TYLER, P. A.; AUSTEN, M. C.; BLAXTER, M. L.; ROGERS, A. D.; LAMBSHEAD, P. J. D. An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, n. 3, p. 622-636, 2007. Disponível em: <doi:10.1016/j.ympev.2006.08.025>. Acesso em: 25 fev. 2010.

MUNDO-OCAMPO, M.; LAMBSHEAD, P. J. D.; DEBENHAM, N.; KING, I. W.; DE LEY, P. BALDWIN, J. G., DE LEY, I. T.; ROCHA OLIVARES, A.; WAUMANN, D.; THOMAS, W. K.; PACKER, M.; BOUCHER, G. Biodiversity of littoral nematodes from two sites in the Gulf of California. **Hydrobiologia**, v. 586, n. 1, p. 179-189. Disponível em: <doi: 10.1007/s10750-006-0624-z>. Acesso em: 13 fev. 2010.

NEI, M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. **Annual Review of Genetics**, v. 30, p. 371-403, 1996. Disponível em: <doi: 10.1146/annurev.genet.30.1.371>. Acesso em: 13 nov. 2009.

NEWTON, L. A.; CHILTON, N. B.; BEVERIDGE, I.; HOSTE, H.; NANSEN, P.; Genetic markers for stronglyid nematodes of livestock defined by PCR-based restriction analysis of spacer rDNA. **Acta Tropica**, v. 69, n. 1, p. 1-15, 1998. Disponível em: <doi:10.1016/S0001-706X(97)00105-8>. Acesso em: 21 jan. 2010.

NGUYEN, K. B.; SMART JR., G. C. *Neosteinernema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). **Journal of Nematology**, v. 26, p. 162-174, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619491/pdf/162.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2010.

NGUYEN, K. B.; HUNT, D. J. **Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts**. Boston, MA, U.S.A.: Brill, 2007. 832 pp.

NICHOLAS, W. L. **The biology of free-living nematodes**. Oxford, ENG: Clarendon Press, 1984. 260 p.

NYLANDER, J. A. A. **MrModeltest v2**. [Programa de computador distribuído pelo autor.]. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004. Disponível em : <http://www.abc.se/~nylander/mrmodeltest2/mrmodeltest2.html>

PAGE, R. D. M.; HOLMES, E. C. **Molecular Evolution - A phylogenetic approach**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell Science. 1998. 352 p.

PEREIRA, C. *Rhabditis hambletoni* n.sp. nema aparentemente semiparasito da broca do algodoeiro (*Gasterocercodes brasiliensis*). **Archivos do Instituto Biológico**, v. 8, p. 215- 230, 1927.

PHAN, K. L.; SUBBOTIN, S. A.; NGUYEN, N. C.; MOENS, M. *Heterorhabditis baujardi* sp. n. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. **Nematology**, v. 5, n. 3, p. 367-382, 2003. Disponível em: <doi: 10.1163/156854103769224368>. Acesso em: 5 fev. 2010.

PLICHTA, K. L.; JOYCE, S. A.; CLARKE, D.; WATERFIELD, STOCK, S. P. *Heterorhabditis gerrardi* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): the hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (Enterobacteriaceae: γ -Proteobacteria). **Journal of Helminthology**, v. 83, p. 309-320, 2009. Disponível em: <doi:10.1017/S0022149X09222942>. Acesso em: 21 fev. 2010.

PODBILEWICZ, B. Cell fusion. In: CHALFIE, M. (Ed.). **WormBook**. [S. l.] The C. elegans Research Community, 2006. Disponível em: < doi:10.1895/wormbook.1.47.1>. Acesso em: 15 mar. 2010.

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, n. 4, p. 463-470, 1975. Disponível em: <http://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/brill/00282596/v21n4/s7.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2010.

POINAR JR, G. O. **The natural history of Nematodes**. Englewood Cliffs, NJ, USA: Prentice-Hall, 1983. 324 p.

POINAR JR, G. O., Fossil evidence of nematode parasitism. **Revue de Nématologie**, v. 7, n. 2, p. 201-203, 1984. Disponível em: <http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_5/pt5/nemato/15616.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2010.

POINAR JR, G. O.; THOMAS, G. M. Laboratory infection of spiders and harvestmen (Arachnida: Araneae and Opiliones) with *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* nematodes (Rhabditoidea). **Journal of Arachnology**, v. 13, p. 297-302, 1985. Disponível em: <http://www.americanarachnology.org/JoA_free/JoA_v13_n3/JoA_v13_p297.pdf>. Acesso em: 5 mar. 2010.

POINAR JR, G. O. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1990. p. 23-60.

POINAR JR, G. O.; KARUNAKAR, G. K.; DAVID, H. *Heterorhabditis indica* n. sp. (Rhabditida: Nematoda) from India: separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 15, n. 5, p. 467-472, 1992. Disponível em: <http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/fan/40246.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2009.

POINAR JR, G. O., First fossil Record of nematode parasitism of ants; a 40 million year tale. **Parasitology**, v. 125, n. 5, p. 457-459, 2002. Disponível em: <[doi:10.1017/S0031182002002287](https://doi.org/10.1017/S0031182002002287)>. Acesso em: 25 fev. 2010.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, p. 817-818, 1998.

POSADA, D. **Modeltest 3.7**. [Programa de computador distribuído pelo autor.] Program and documentation. 2005. Disponível em: <<http://darwin.uvigo.es/>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

POWERS, T. O.; TODD, T. C.; BURNELL, A. M.; MURRAY, P. C. B.; FLEMING, C. C.; SZALANSKI, A. L. ADAMS, B. A.; HARRIS, T. S. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. **Journal of Nematology**, v. 29, n. 4, p. 441-450, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619808/pdf/441.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2009.

RODRIGUEZ, R.; OLIVER, J.L.; MARIN, A.; MEDINA, J.R. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. **Journal of Theoretical Biology**. 142:485-501.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Invertebrate Zoology**. 6 ed. Fort Worth, TX, USA: Harcourt Brace College Publishers, 1993. 928 p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning : a laboratory Manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 2344 pp.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/74/12/5463.full.pdf+html>>. Acesso em: 15 set. 2009.

- SCHAFFER, W. R. Egg laying. In: CHALFIE, M. (Ed.). WormBook. [S. l.] The C. elegans Research Community, 2006. Disponível em: <doi:10.1895/wormbook.1.47.1>. Acesso em: 15 mar. 2010.
- SCHUMAN, S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 32678-32684, 1994. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/269/51/32678.full.pdf+html>. Acesso em: 26 fev. 2010.
- SEGONDS, C.; HEULIN, T.; MARTY, N.; CHABANON, G. Differentiation of Burkholderia species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2201-2208, 1999. Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/reprint/37/7/2201>. Acesso em: 8 fev. 2010.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; GAUGLER, R. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial simbionts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 137-146, 2002.
- SICARD, M.; FERDY, J. -B.; PAGÈS, S.; GODELLE, B.; BOEMARE, N.; MOULIA. When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). **Journal of Evolutionary Biology**, v. 17, n. 5, p. 985-993, 2004. Disponível em: <doi:10.1111/j.1420-9101.2004.00748.x>. Acesso em: 1 mar. 2009.
- SILVA, C. P. et al. Bacterial infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 329-339, 2002. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118963100/PDFSTART>. Acesso em: 10 mar. 2009.
- SMART JR., G. C. Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects [suplemento/viewpoint]. **Journal of Nematology**, v. 27, n. 4S, p. 529-534, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619649/pdf/529.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2010.
- SOMMER, R. J.; CARTA, L. K.; KIM, S.-Y.; STERNBERG, P. W. Morphological, genetic and molecular description of *Pristionchus pacificus* sp. N. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 19, n. 6, p. 511-521, 1996. Disponível em: <http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/fan/010007632.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2009.
- STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models, **Bioinformatics** v. 22, n. 21, p. 2688-2690, 2006. Disponível em: <doi:10.1093/bioinformatics/btl446>. Acesso em: 10 mar. 2009.
- STEIN, L. D. et al. The Genome Sequence of *Caenorhabditis briggsae*: A Platform for Comparative Genomics. **PLoS Biology**, v. 1, n. 2, p. 167-192, 2003. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pbio.0000045>. Acesso em: 16 mar. 2010.
- STOCK, S. P.; GRIFFIN, C. T.; CHERANI, R. Morphological and molecular characterization of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. **Nematology**, v. 6, n. 3, p. 401-412, 2004. Disponível em: <doi: 10.1163/1568541042360555>. Acesso em: 11 mar. 2010.
- STOCK, S. P.; GRESS, J. C. Diversity and phylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Sky Islands of southern Arizona. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 92, n. 2, p. 66-72. 2006 Disponível em: <doi:10.1016/j.jip.2006.02.001>. Acesso em: 11 mar. 2010.

SUDHAUS, W.; KIONTKE, K. Comparison of the nematode species *Caenorhabditis brenneri* sp. n. and *C. remanei* (Nematoda: Rhabditidae) with the stem species pattern of the *Caenorhabditis elegans* group. **Zootaxa**, v. 1456, p. 45-62, 2007. Disponível em: <<http://www.mapress.com/zootaxa/2007f/zt01456p062.pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2010.

SWITZER, R. C.; MERRIL, C. R.; SHIFRIN, S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 98, n. 1, p. 231-237, 1979. Disponível em: <doi: 10.1016/0003-2697(79)90732-2>. Acesso em: 13 nov. 2009.

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*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 402-407, 1997. Disponível em: <doi: 10.1099/00207713-47-2-402>. Acesso em: 11 dez. 2009.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; MASATOSHI, N.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007. Disponível em: <doi: 10.1093/molbev/msm092>. Acesso em: 1 nov. 2009.

TAILLIEZ, P.; LAROUÏ, C.; GINIBRE, N.; PAULE, A.; PAGES, S.; BOEMARE, N. E. 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. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2009. No prelo. Disponível em: <doi: 10.1099/ijse.0.014308-0>. Acesso em: 25 mar. 2010.

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H.; VOGLER, A. P. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 2, p. 70-74, 2003. Disponível em: <doi: 10.1016/S0169-5347(02)00041-1>. Acesso em: 21 fev. 2010.

TAVARES, F. M.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; ALMEIDA, L. C.; SILVA, A. C.; AMBRÓS, C. M. G. Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Nemata: Rhabditida) sobre larvas do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), em Laboratório e Casa-de-Vegetação. **Nematologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 12-19, 2007. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%20311/12-19%20co.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2010.

The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2012-2018, 1998. Disponível em: <doi: 10.1126/science.282.5396.2012>. Acesso em: 13 fev. 2010.

THOMAS, G. M.; POINAR JR., G. O. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 29, p. 352-360, 1979. Disponível em: <doi: 10.1099/00207713-29-4-352>. Acesso em: 8 fev. 2010.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/25/24/4876>> Acesso em: 16 fev. 2010.

TÓTH, T.; LAKATOS, T. *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis* nematodes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2579-2581, 2008. Disponível em: <doi: 10.1099/ijs.0.2008/000273-0>. Acesso em: 19 jan. 2010.

TURLIN, E.; PASCAL, G.; ROUSSELLLE, J.-C.; LENORMAND, P.; NGO, S.; DANCHIN, A.; DERZELLE, S. Proteome analysis of the phenotypic variation process in *Photorhabdus luminescens*. **Proteomics**, v. 6, n. 9, p. 2705-2725, 2006. Disponível em: <doi 10.1002/pmic.200500646>. Acesso em: 10 jan. 2010.

VELASCO, J.; ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I.; LEIVA, J.; DÍAZ, R.; MORIYÓN, I. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 48, p. 759-768, 1998. Disponível em: <doi: 10.1099/00207713-48-3-759>. Acesso em: 26 fev. 2010.

WATERFIELD, N. R.; DABORN, P. J.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Genomic islands in *Photorhabdus*. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 541-545, 2002. Disponível em: <doi:10.1016/S0966-842X(02)02463-0>. Acesso em: 10 mar. 2010.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991. Disponível em: <http://jb.asm.org/cgi/reprint/173/2/697>. Acesso em: 9 jan. 2010.

WILKINSON T. L.; HAY D. B. Symbiotic interactions in the entomopathogenic nematodes. **Symbiosis**, v. 22, p. 9-19, 1997.

WILLIAMS, J. S.; THOMAS, M.; CLARKE, D. J. The gene *stlA* encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Photorhabdus luminescens* TT01. **Microbiology**, v. 151, p. 2543-2550, 2005. Disponível em: <doi: 10.1099/mic.0.28136-0>. Acesso em: 25 mar. 2010.

WIMMER, B. **A compilation of primers – ITS Primer Sets**. Disponível em: <http://www.nematodes.org/nematodes/npg/primersets.html>. Acesso em: 17 jan. 2008.

WINTZINGERODE, F. v.; GÖBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, p. 213-229, 1997. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00351.x>. Acesso em: 8 fev. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheet free-living nematodes in drinking-water**. 2010. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/phe_whs_nematodes_fact_sheet.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2010.

WOOD, W. B.; the Community of *C. elegans* Researchers. **The nematode *Caenorhabditis elegans***. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988. 678pp.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. **Steinernematid and Heterorhabditid nematodes : A handbook of techniques**. Southern Cooperative Series Bulletin n. 331, 1988. 324 pp.

WRATHER, J. A.; KOENNING, S. R. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005. **Journal of Nematology**, v. 38, n. 2, p. 173-180, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2586459/pdf/173.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2010.

WRIGHT, K. A. **Microscopic anatomy of invertebrates, vol. 4 : Aschelminthes**. Wilmington, DE, USA: Wiley-Liss Inc., 1991. p. 111-195.

ANEXO A- Alinhamento das sequencias das linhagens LPP obtidas neste trabalho e de linhagens já descritas, presentes no GenBank (*Heterorhabditis indica*, *H. indica* linhagem D1, *H. mexicana*, *H. floridensis*, *H. amazonensis*, *H. tayseraeae*, *H. baujardi*, *H. downesi*, *H. marelatus*, *H. sp.* linhagem LQ-2003GDa, *H. sp.* linhagem LQ-2003GDb, *H. sp.* linhagem LQ-2003GDd).

amazon taysearae mexicana LEP7 baujardi LEP15 LEP11 LEP10 indica LQ-2003GDb indicaD1 LQ-2003GDa LQ-2003GDd LEP3 LEP2 LEP1 LEP9 LEP8 LEP4 downesi marelatus	AATCAAGCTTGTCTTCTGATTTCAGTCGGTGTCTCACCCCATCTAAGCTCTCGGAGAGGTGTCTATTCTTGATTGAGCGGATTTGAGTGACGG	ITS1	amazon taysearae mexicana LEP7 baujardi LEP15 LEP11 LEP10 indica LQ-2003GDb indicaD1 LQ-2003GDa LQ-2003GDd LEP3 LEP2 LEP1 LEP9 LEP8 LEP4 downesi marelatus	GTTTGATTGCGGTATCGATGAAAAACGACGAGCTGCGTTATTTTGCCACGAATTGCAGACGTTAGAGTGGTGAATTTTGAACGCACAGCG	5.8S
amazon taysearae mexicana LEP7 baujardi LEP15 LEP11 LEP10 indica LQ-2003GDb indicaD1 LQ-2003GDa LQ-2003GDd LEP3 LEP2 LEP1 LEP9 LEP8 LEP4 downesi marelatus	CAATGATAATTGGGTATGCTCCCGTAAGG-CTAGAGCATAGACTTAAGAGGTGATCTAGTCTGTGCGCTCACCACCAAAACCGATCGATAG	ITS1	amazon taysearae mexicana LEP7 baujardi LEP15 LEP11 LEP10 indica LQ-2003GDb indicaD1 LQ-2003GDa LQ-2003GDd LEP3 LEP2 LEP1 LEP9 LEP8 LEP4 downesi marelatus	CGTTGGGTTTTCCTTCGCGCAGCTCTGGCTCAGGGTGTGTTAATAGACTTCGGTATTGTTGGAGGCGGCAATAACGCTGAACCAACGCTGG	ITS2
amazon taysearae mexicana LEP7 baujardi LEP15 LEP11 LEP10 indica LQ-2003GDb indicaD1 LQ-2003GDa LQ-2003GDd LEP3 LEP2 LEP1 LEP9 LEP8 LEP4 downesi marelatus	TTGGTGGCTAAATGATGAGACTTTGTCAAAATCACTA-ATCTGCTATGCGGGAGGCTTAATGAGTTGTCTGTGCACTTGACCGACACAC	ITS1	amazon taysearae mexicana LEP7 baujardi LEP15 LEP11 LEP10 indica LQ-2003GDb indicaD1 LQ-2003GDa LQ-2003GDd LEP3 LEP2 LEP1 LEP9 LEP8 LEP4 downesi marelatus	ATAGTGTCTA-AATT--GTGGTGATGCCCCGTACAGGGGAGAAT--GTTGGTTAAATGAACCTCTCTTAAGCGGAGAGATTAGTG	ITS2
amazon taysearae mexicana LEP7 baujardi LEP15 LEP11 LEP10 indica LQ-2003GDb indicaD1 LQ-2003GDa LQ-2003GDd LEP3 LEP2 LEP1 LEP9 LEP8 LEP4 downesi marelatus	GCCAGTATCGGTA-AACTCTCTCCCAATTAACCTTGTTCTAGTAAGGCTATTGAGTATTTGTGGAACATT-----AGCCCTATAGCGATGATG	ITS1	amazon taysearae mexicana LEP7 baujardi LEP15 LEP11 LEP10 indica LQ-2003GDb indicaD1 LQ-2003GDa LQ-2003GDd LEP3 LEP2 LEP1 LEP9 LEP8 LEP4 downesi marelatus	TTCACTTATGG-ATATGCCATGTATGAAATACGACGTGTTATATACAT---AAATCGTGTTCCTATA--AGTCTCATTATGCAACCTGGA	26S

ANEXO B- ARTIGO DE PERIÓDICO

Artigo 1 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.

Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil

Claudia Dolinski^{1/+}, Fernando L Kamitani¹, Inês R Machado, Carlos E Winter¹

LEF/CCTA, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego 2000, 28015-620 Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil ¹Departamento de Parasitologia/ICB2, Universidade São Paulo, São Paulo, Brasil

Despite massive losses of primary forest, the Amazonian rainforest remains an extremely rich source of biodiversity. In recent years, entomopathogenic nematodes (EPNs) have been isolated from soil in various parts of the world and used successfully as biological control agents against numerous insect pests. Therefore, a sampling in the rainforest of Monte Negro, Rondônia, Brazil was conducted with the aim of discovering new strains and/or species of EPNs for future development as biological control agents. From 156 soil samples taken at nine collecting sites, 19 isolates were obtained, all of them belonging to the genus Heterorhabditis. Four strains were subjected to detailed morphological and molecular evaluation. Based on morphometrics and internal transcribed spacer (ITS) sequence data, the strains LPP1, LPP2 and LPP4 were identified as Heterorhabditis indica, whereas LPP7 was considered Heterorhabditis baujardi. Comparative analysis of the ITS1 sequence of H. indica and H. baujardi isolates showed a polymorphic site for the restriction enzyme Tth 111 that could be used to distinguish the two species. Consequently, strains LPP1, LPP2, LPP3, LPP4, and LPP9 were identified as H. indica, whereas LPP5, LPP7, LPP8 and LPP10 were identified as H. baujardi.

Key words: Heterorhabditidae - taxonomy - Nematoda - phylogeny - Brazil

Entomopathogenic nematodes (EPNs) of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae are obligate parasites of insects and are frequently used as biological control agents of economically important insect pests. The two major genera are *Heterorhabditis* Poinar, and *Steinernema* Travassos, with 43 and ten species, respectively (Adams et al. 2006). Surveys for EPNs conducted in various parts of the world reveal that these genera have global distributions. To date, the only places where these nematodes have not been found is Antarctica (Hominick 2002). During the 1990s, most published surveys had insufficient data to test for correlations between habitat variables and EPN distributions (Hominick et al. 1996). However, as more surveys occurred, with larger sample sizes and more accurate identifications, some habitat associations were proposed. *Heterorhabditids* were thought to be associated with sandy coastal soils but more and more *Heterorhabditids* have been reported away from coast lines, and these include *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar and David (Poinar et al. 1992, Phan et al. 2003), *Heterorhabditis mexicana* Nguyen, Shapiro-Ilan, Stuart, McCoy, James and Adams (Nguyen et al. 2004), and *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Stock et al. 1996). Thus, it is likely that EPN habitat preference reflects the prevalence of suitable hosts (Hominick 2002) and species-specific

environmental adaptations (Smits & Ehlers 1991), with each species being physiologically and behaviorally adapted for survival in a range of different habitats. In the Azores, *H. bacteriophora* displayed no habitat preference and was recorded from cropland, woodland, pasture, orchard and native vegetation (Rosa et al. 2000). Similarly, in New Jersey, *H. bacteriophora* was found broadly distributed in turf and weedy habitats (Stuart & Gaugler 1994). Recent surveys in tropical forests indicate that the most common nematodes in this habitat are *H. indica* and *Heterorhabditids baujardi* Phan, Subbotin, Nguyen and Moens (Mason et al. 1996, Josephraj Kumar & Sivakumar 1997, Phan et al. 2003).

The main characteristics that should be used for *Heterorhabditis* species distinctions are a matter of debate. The nematodes of this genus lack morphological variation and some valid characters are hard to see or require careful observation (e.g., spicules). In general, it appears that various morphological features of males and infective juveniles (e.g., number and arrangement of the genital papillae, plus spicule and gubernaculum shape) should be taken into consideration together with morphometric characters (Stock & Kaya 1996, Phan et al. 2003, Nguyen et al. 2004). In addition, molecular data (e.g., internal transcribed spacer1 (ITS1) sequence) should also be incorporated into descriptions (Hominick et al. 1997, Adams et al. 2006).

Native species of entomopathogenic nematodes that are adapted to local environmental and climatic conditions are especially good candidates for use as biological control agents. The objective of the present study was to isolate EPNs from the Southwestern Amazonian rain forest of Monte Negro, Rondônia, Brazil, for future biological control programs and to identify them based on morphometrics and ITS1 sequences.

Financial support: FAPESP, PRONEX, CNPq

+ Corresponding author: claudia.dolinski@censanet.com.br

Received 20 August 2007

Accepted 18 February 2008

MATERIALS AND METHODS

Sampling - Soil samples were collected from nine sampling sites within the Southwestern Amazonian rain forest of Monte Negro, Rondônia, Brazil (10°17'17.43"S, 63°19'17.59"W) (Fig. 1). The collecting points were chosen randomly, but always close to trees from the primary forest (e.g., *Tabebuia alba*, *Aspidosperma cylindrocarpum*, *Ouratea semisserrata*, and *Chorisia speciosa*). The samples were taken from 5 to 10 cm deep and within 100 to 500 m of fresh water. EPNs were isolated from soil by the insect-baiting technique using *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) (Bedding & Akhurst 1975). All soil samples were kept for granulometric analysis. Larvae showing symptoms of EPN infection were kept in Petri dishes with filter paper on the bottom for two or three days. Then, they were washed in sodium hypochlorite 1% for 30 s and placed on modified White traps for infective juveniles (IJs) emergence. Different isolates were multiplied in the laboratory on last instar *G. mellonella* larvae and stored at 16°C (White 1927, Dutky et al. 1964). Each isolate was identified by the letters LPP (Laboratório de Proteção de Plantas, the former name of the present Laboratório de Fitopatologia e Entomologia) and a serial number.

Morphological observations - For morphological studies, third-stage IJs were obtained within seven days of emergence from insect cadavers (Nguyen & Smart Jr. 1995). Other nematode stages were obtained by infecting ten *G. mellonella* larvae with 500 IJs/ml in Petri dishes (90 x 15 cm) lined with filter paper. First generation hermaphrodites and second generation females and males were dissected from the cadavers 6-7 and 8-9 days after infection, respectively. All observations and measurements were performed within one week of harvest.

Slides of fresh nematodes were mounted in Ringer's solution and sealed with paraffin. At least 15 males, 5 females, 5 hermaphrodites and 30 IJs of each isolate were observed, drawn and measured. Measurements were made using a drawing camera (*camera lucida*) (Axio-plan Axiophoto) attached to a Zeiss (MC100 SPOT) light microscope.

Molecular characterization - IJs were harvested from distilled water in modified white traps and processed while fresh. After being washed three times with distilled water, nematodes were concentrated by centrifugation (1,000 g for 1 min). Then genomic DNA was extracted using Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega Corp, Madison, WI) following the manufacturer's instructions. The genomic DNA obtained was then quantified by spectrophotometry. Protocols for genomic DNA extraction without the use of kits can be found in Adams et al. (1998) and Stock et al. (2001).

Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the rDNA comprising both ITS one and two, covering the 5.8S rDNA gene [ITS1+5.8S+ITS2] (1,094 bp in *Caenorhabditis elegans*). The forward primer (SSU-18PF, GTGAACCTGCRGMWGGATCA) was modified from oligonucleotide NC5 (Newton et al. 1998) over the sequences of large subunit ribosomal RNA (LSU rR-

NAs) from several nematode species used by Blaxter et al. (1998) and corresponds to positions 2671..2690 of the rRNA genes of *C. elegans* (GenBank Acc. Nr. X03680). The reverse primer (LSU-NC2, TTAGTTTCTTTTC-CTCCGCT) is a universal primer for the LSU rRNA genes of nematodes (Blaxter et al. 1998, see Wimmer 2007) that corresponds to positions 3745..3764 of the rRNA genes of *C. elegans* (GenBank Acc. Nr. X03680). PCR conditions such as annealing temperature and MgCl₂ or deoxynucleoside triphosphates (dNTP's) concentrations were empirically optimized. Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used for PCR amplifications. Buffer, MgCl₂ and dNTP's solutions were supplied by the manufacturer.

The standard reaction included up to 200 ng of genomic DNA, 0.1 µM of each primer, 10 mM of dNTP's solution, 5mM of MgCl₂ and Buffer 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl and no MgCl₂ added) in a volume of 25 µl. Standard cycling parameters included denaturation at 94°C for 2 min, followed by 30 cycles of 94°C for 45 s, 55°C for 30 s and 72°C for 90 s, followed by a post-amplification extension at 72°C for 5 min.

DNA fragment presence and yield was measured by agarose gel electrophoresis (1% in 1X TAE buffer). PCR products were prepared for cloning or direct sequencing using Microcon® PCR microcolumn (Milipore, Bedford, Massachusetts) following manufacturer's instructions. This step aimed to clear the PCR product from excess salts and primers. PCR fragments were always cloned before final sequencing, but before cloning they were test sequenced to ensure identity. The fragments from all lineages were subcloned into plasmid TOPO2.1® (Invitrogen, Carlsbad, California) in order to avoid the loss of unique isolate fragments and to increase DNA quantity for sequencing.

Sequencing reactions were performed using Big Dye® (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut) terminator cycle sequencing chemistry, and reaction products were separated and detected using an ABI 3100 automatic sequencer.

Sequence analysis - No variation was observed among different clones of the same isolate. Perhaps if we increased the number of observed clones then those

Fig. 1: map showing collecting points in Monte Negro municipality, Rondônia, Brazil.

variations would be visible. The “indica group” shows almost no variation among different isolates from around the world (see results). Sequence alignments were made in Clustal X (v. 1.81, Thompson et al. 1997) using the default parameters (gap opening 15.00, gap extension 6.66). Alignment was checked visually for any inconsistency using the EyeBall Sequence Editor (ESEE v. 3.2s). Using the 18S-5.8S-28S rRNA genes of *C. elegans* (Genbank acc. nr. X03680) as guide sequences, the ITS1 and ITS2 boundaries were determined and excised from the original files for creation of the alignment files.

PAUP (ver 4.0b10) was used for phylogenetic analysis of aligned sequences. Maximum likelihood (ML) and maximum parsimony (MP) trees of ITS one sequences were constructed using the substitution model GTR+I selected by hLRT with Modeltest 3.7. (Posada & Crandall 1998). ML for ITS1+ITS2 sequences used the substitution model GTR+G also selected with Modeltest 3.7. Bootstrap values were obtained by an heuristic search over 100 MP or 1,000 ML replicates.

Sequences used in this work (with their Accession Numbers in GenBank): *Heterorhabdits amazonensis* (DQ665222), *H. bacteriophora* (AF029708), *H. baujardi* (AF548768), *H. mexicana* (AY321478), *Heterorhabdits marelata* (AY321479), *Heterorhabdits megidis* (AY321480), *Heterorhabdits downesi* (AY321482), *H. indica* (AY321483), *Heterorhabdits zealandica* (DQ100268), *Heterorhabdits brevicaudis* (DQ177908), LPP1 (EU363042), LPP2 (EU363040), LPP3 (EU363041), and LPP7 (EU363039).

RESULTS AND DISCUSSION

From 156 soil samples taken at nine collecting points in the rainforest of Monte Negro, Rondônia, we obtained 19 *Heterorhabdits* isolates (12,18%). Most of the positive soil samples were classified as sandy clay loam or sandy loam (Table I).

Based on Stock and Kaya (1996) and Hominick et al. (1997), the morphological aspects of males and IJs give the majority of taxonomic characters necessary to identify *Heterorhabdits* species. Specifically, body (L) and tail (T) length in IJs, plus body and testis reflexion in males are used to differentiate species. However, Phan et al. (2003) suggest that characters such as L length in IJs, and spicule and gubernaculum length and shape in males are the ones that should be given most consideration. Nguyen and Smart Jr (1995) indicated that characters such as L and T length of IJs, and distance from the anterior end to the excretory pore (EP) are good characters, but that they vary with time of harvest. The E% (EP/T*100) is the least variable.

Another criterion of identification recently being used is the morphometrics of the bursa. Nguyen et al. (2004) stated that the number of bursal papillae is generally constant amongst *Heterorhabdits* species. However, analyzing strains LPP1, LPP2, LPP4 and LPP7 and different species descriptions, we found great variability in papillae number and shape within species (Table II, Fig. 2). Therefore, this character was not used for identification (Fitch 2000).

The species *H. indica*, *H. baujardi*, *H. mexicana*, *Heterorhabdits floridensis* Nguyen, Gozel, Koppenhofer and Adams, and *H. amazonensis* Andaló, Nguyen

and Moino Jr are considered very closely related based on molecular and morphological data and are part of the so called “indica-group” (Nguyen et al. 2004, Andaló et al. 2006). Our observations of various characters of IJs of these species indicate that all values overlap and that the averages are frequently very similar (Table III). The only characters that were different under strict statistical analysis were the indexes E%, c and f, perhaps because we used the value of T length without sheath to obtain the indexes. Data on T length without sheath could not be found in *H. baujardi*'s or *H. indica*'s original descriptions for comparison. Therefore, we could not differentiate our strains from the above species based on IJ characters.

In terms of males, we encountered a similar situation to that of the IJs except for the characters EP and D%. Based on EP, LPP2 (110-121) and LPP4 (110-130) could be differentiated from LPP7 (87-107) and *H. baujardi* (71-107). Based on this criterion, LPP7 could also be differentiated from *H. indica* (109-138) and *H. mexicana* (108-145). Looking at the D%, only LPP7 could be differentiated from *H. mexicana* and *H. floridensis*. Strain LPP7 was not compared to *H. baujardi* by this index because it was not present in the original description. Strain LPP1

Fig. 2: light microscope photograph of male posterior region showing bursal papillae. A: *Heterorhabdits indica* LPP1; B: *H. indica* LPP2; C: *H. indica* LPP4; D: *Heterorhabdits baujardi* LPP7. Scale bar: 30 μ .

TABLE I

List of isolates obtained from nine different collecting points in Monte Negro municipality, Rondônia, Brazil, granulometric analysis and classification of their associated soil (%)

Isolate number	Total sand	Silt	Clay	Texture classification	Collecting point ^a
LPP1	63	17	20	Sandy clay loam	7
LPP2	64	14	22	Sandy clay loam	5
LPP3	62	15	23	Sandy clay loam	7
LPP4	83	3	14	Sandy loam	9
LPP5	73	9	18	Sandy loam	9
LPP6	82	3	15	Sandy loam	7
LPP7	83	4	13	Loamy sand	7
LPP8	84	4	12	Loamy sand	7
LPP9	53	19	28	Sandy clay loam	9
LPP10	68	15	17	Sandy loam	7
LPP11	65	13	22	Sandy clay loam	6
LPP12	62	17	21	Sandy clay loam	4
LPP13	80	17	3	Loamy sand	4
LPP14	64	8	28	Sandy clay loam	3
LPP15	74	6	20	Sandy clay loam	8
LPP16	41	12	47	Clay	2
LPP17	87	3	10	Loamy sand	8
LPP18	63	13	24	Sandy clay loam	3
LPP19	63	20	17	Sandy loam	3

a: see Fig. 1 for localization of collecting points.

TABLE II

Arrangement of bursal papillae in different *Heterorhabditis* species

Species	Number of papillae	Principal formula	Grouping references
<i>H. amazonensis</i>	8	1, 2, 3, 2	Andaló et al. 2006
<i>H. bacteriophora</i>	9	1, 2, 3, 3 (9th pair variable)	Poinar 1976
<i>H. baujardi</i>	8 or 9	1, 2, 3, 2 or 1, 2, 3, 3	Phan et al. 2003
<i>H. brevicaudis</i>	9	1, 2, 3, 3	Liu 1994
<i>H. floridensis</i>	8 or 9	1, 2, 3, 2 or 1, 2, 3, 3	Nguyen et al. 2006
<i>H. hawaiiensis</i> (syn. <i>H. indica</i>)	9	1, 2, 3, 3 (7th and 8th pairs shorter)	Gardner et al. 1994
<i>H. indica</i>	8 or 9	1, 2, 3, 2	Poinar et al. 1992
<i>H. marelatus</i>	9	1, 2, 3, 3 (8th pair shorter)	Liu and Berry 1996
<i>H. megidis</i>	9	1, 2, 3, 3	Poinar et al. 1987
<i>H. mexicana</i>	8	1, 2, 3, 2	Nguyen et al. 2004
<i>H. taysearae</i>	9	1, 2, 3, 3	Shamseldeen et al. 1996
<i>H. zealandica</i>	9	1, 2, 3, 3 (8th pair shorter)	Poinar 1990
<i>H. indica</i> LPP1	8 or 9	1, 2, 3, 2 or 1, 2, 3, 3	Present study
<i>H. indica</i> LPP2	8	1, 2, 3, 2	Present study
<i>H. indica</i> LPP4	8	1, 2, 3, 2	Present study
<i>H. baujardi</i> LPP7	9 or 10	1, 2, 3, 3 or 1, 2, 1, 3, 3	Present study

could not be differentiated from described species by any means (Table IV). Although D% is a valuable character due to its low variability, it was not sufficient to resolve the identification of all Brazilian strains (Nguyen & Smart Jr 1995).

Gubernaculum shape seemed the most constant morphological character among all *Heterorhabditis* species studied, and was a good candidate for identification purposes. More than 20 males from each strain were observed under light microscope and we noticed great flexibility in the gubernaculum of some strains. This flexibility was shown when the spicule was ejected,

and the gubernaculum tip presented a slight curve upwards (Figs 3, 4). Strain LPP1 presented a straight gubernaculum, being flexible in 60% of the specimens observed with an ejected spicule. Similar to strain LPP1, LPP2 also presented a straight and flexible gubernaculum (80% of the specimens). Strain LPP4 presented a straight gubernaculum but no specimens were observed with an ejected spicule. Eighty percent of the specimens from strain LPP7 presented the upper part of the gubernaculum curved and, even when the spicule was ejected, 100% of the specimens did not have it curved upwards (i.e., it was not flexible) (Figs 3, 4).

TABLE III

Comparative morphometrics of infective juveniles from this study and other related species. Measurements are in μm , except the indexes, in form: mean $\pm$ SD (range)

Character	LPP1 Present study	LPP2 Present study	LPP4 Present study	LPP7 Present study	<i>H. indica</i> Poinar 1992	<i>H. baujardi</i> ^a Phan et al. 2003	<i>H. mexicana</i> Nguyen et al. 2004	<i>H. floridensis</i> Nguyen et al. 2006	<i>H. amazonensis</i> Vandaló et al. 2006
n	20	20	20	21	25	75	25	25	20
L	571.1 $\pm$ 26.9 (517.8-607.1)	560.8 $\pm$ 22.2 (530.9-601)	564.5 $\pm$ 24.6 (517.8-600)	563.5 $\pm$ 25.7 (525-600)	528 $\pm$ 26 (479-573)	561 (487-622)	578 $\pm$ 23 (530-620)	562 $\pm$ 24 (554-609)	589 $\pm$ 12 (567-612)
W	22.7 $\pm$ 1.9 (20-26.8)	23.1 $\pm$ 2.8 (20-28.1)	22 $\pm$ 1.3 (19.9-24)	22.2 $\pm$ 1.2 (19.6-24)	20 $\pm$ 6 (19-22)	20 (18-22)	23 $\pm$ 0.8 (18-22)	21.2 $\pm$ 4.6 (19-23)	23 $\pm$ 1.2 (20-24)
T	66 $\pm$ 4.2 (55-69.6)	66.9 $\pm$ 2.5 (60.5-70)	65.7 $\pm$ 3.1 (55-69.6)	66.1 $\pm$ 3.3 (58.9-70)	na	na	66 $\pm$ 3 (59-73)	63 $\pm$ 7.9 (48-68)	69 $\pm$ 4.4 (59-74)
ABD	14.5 $\pm$ 1.46 (12-17)	14.3 $\pm$ 1.3 (13-17)	13.9 $\pm$ 1.2 (13-17)	12.5 $\pm$ 0.7 (12-14)	na	13 $\pm$ 0.7 (11-14)	15 $\pm$ 1.2 (12-17)	14 $\pm$ 3.7 (12-16)	14 $\pm$ 1.4 (13-17)
EP	100.2 $\pm$ 4.3 (90.7-106)	100.3 $\pm$ 3.7 (94-105)	100.4 $\pm$ 4.0 (90.7-106)	100.7 $\pm$ 2.8 (97.1-105)	98 $\pm$ 7 (88-107)	97.3 (90-105)	102 $\pm$ 5.2 (83-109)	109 $\pm$ 10.4 (101-122)	107 $\pm$ 6.1 (89-115)
NR	85.4 $\pm$ 3.5 (78.8-90.7)	85.9 $\pm$ 3.9 (78.8-91.9)	83.7 $\pm$ 4.8 (72-90.7)	81.6 $\pm$ 3.7 (73.2-88.2)	82 $\pm$ 4 (72-85)	81.3 (74-87)	81 $\pm$ 4.2 (74-88)	86 $\pm$ 9.2 (68-107)	85 $\pm$ 4.9 (76-93)
Es	116.7 $\pm$ 3.0 (110.7-119.9)	116.6 $\pm$ 3.2 (110.7-120.6)	115.6 $\pm$ 3.1 (110.7-119.6)	121.5 $\pm$ 4.9 (114.3-129)	117 $\pm$ 3 (109-123)	116.7 (107-124)	122 $\pm$ 27 (104-142)	135 $\pm$ 11.6 (123-142)	121 $\pm$ 6.6 (107-132)
L/W	23.5 $\pm$ 2.0 (20.3-27.7)	24.5 $\pm$ 2.2 (20.6-27.5)	22.4 $\pm$ 2.1 (21.7-29.6)	25.6 $\pm$ 2.1 (22.6-29.8)	26 $\pm$ 4 (25-27)	28.3 (26-32)	25.8 (23.6-28.4)	27.6 $\pm$ 5.2 (25-32)	26 $\pm$ 1.3 (24-29)
L/Es	4.9 $\pm$ 0.3 (4.4-5.6)	4.8 $\pm$ 0.2 (4.5-5.2)	4.9 $\pm$ 0.3 (4.3-5.5)	4.5 $\pm$ 0.3 (4.1-5.2)	4.5 $\pm$ 0.34 (4.3-4.8)	4.8 (4.4-5.5)	4.6 (4.2-5.1)	4.3 $\pm$ 2.1 (3.9-4.9)	4.9 $\pm$ 0.3 (4.4-5.5)
L/T	8.8 $\pm$ 0.6 (7.6-9.8)	8.3 $\pm$ 0.3 (7.9-8.9)	8.7 $\pm$ 0.5 (7.6-9.5)	8.5 $\pm$ 0.6 (7.5-9.9)	5.3 $\pm$ 0.5 (4.5-5.6)	5.6 (4.6-7.3)	5.9 (5.5-6.3)	5.6 $\pm$ 2.4 (5.3-6.6)	5.5 $\pm$ 0.2 (5.1-6.1)
D% = EP/Es X 100	85.9 $\pm$ 3.6 (81.9-91.4)	86.2 $\pm$ 3.3 (82.4-92.7)	86.4 $\pm$ 3.6 (81.9-92.5)	81.8 $\pm$ 3.8 (74.9-88.7)	84 $\pm$ 5 (79-90)	83 (77-90)	81 $\pm$ 3 (72-86)	81 $\pm$ 8.9 (71-90)	88 $\pm$ 2.7 (83-92)
E% = EP/T X 100	152.3 $\pm$ 10.3 (130.3-171.5)	150 $\pm$ 8.5 (130.3-163.3)	152.9 $\pm$ 8.8 (130.4-162.4)	152.5 $\pm$ 7.7 (143.8-172.1)	94 $\pm$ 7 (83-103)	106 (91-128)	104 $\pm$ 5.2 (87-111)	105 $\pm$ 10.2 (95-134)	100 $\pm$ 6 (89-109)
W/T	0.34 $\pm$ 0.03 (0.29-0.38)	0.34 $\pm$ 0.04 (0.29-0.4)	0.33 $\pm$ 0.02 (0.29-0.37)	0.3 $\pm$ 0.05 (0.2-0.35)	0.21 (0.18-0.25)	0.21 (0.19-0.27)	na	na	na

a: average of three strains measured by the authors; na: parameter not analyzed; n: number of specimens analyzed; L: body length; W: greatest body diam; T: tail length without sheath; ABD: anal body diam; EP: distance from anterior end to excretory pore; NR: distance from anterior end to nerve ring; Es: distance from anterior end to end of esophagus.

The morphology of the gubernaculum was originally the most important criterion used to differentiate *H. baujardi* from *H. indica*. The original description of *H. baujardi* shows the upper part of the gubernaculum curved at the tip, with or without an ejected spicule, as shown in LPP7 (Poinar et al. 1992, Phan et al. 2003).

ITS analysis - PCR fragments obtained from LPP1, LPP2, LPP3, and LPP7 were sequenced and compared to other described species (Fig. 5). A preliminary analysis showed that LPP1, LPP2 and LPP3 ITS1 sequences were almost indistinguishable, with only five variable positions (Fig. 5). Their ITS1 sequence is almost identical to that of *H. indica*, which suggests that they all belong to

the same species. The ITS1 sequence of LPP7 showed high similarity to *H. baujardi*.

A partial ML phylogenetic tree was constructed using ITS1+2 sequences from members of the “indica group” as described by Andaló et al. (2006) (Fig. 6). Using the ITS2 sequence together with the ITS1 avoided the polytomy of LPP1, LPP2, LPP3 and *H. indica*, and allowed us to include *H. amazonensis* sequences in the tree. This tree shows that LPP7 and *H. amazonensis* belong to the same clade and we can clearly distinguish two sub-groups of isolates: those (LPP1, LPP2 and LPP3) that group with *H. indica*, and LPP7 that groups with *H. baujardi/H. amazonensis*.

Fig. 3: light microscope photograph of male posterior region showing spicules and gubernaculum. A-C: *Heterorhabditis indica* LPP1; D-E: *H. indica* LPP2. Scale bar: 30 µ.

Fig. 4: light microscope photograph of male posterior region showing spicules and gubernaculum. A-B: *Heterorhabditis indica* LPP4; C-E: *Heterorhabditis baujardi* LPP7. Scale bar: 30 µ.

	1	20	40	60	80
indica	TCGATACCTTATA	GGTACATGCTGATCAGAGATGCCGATAATCATGGAATCAGGCTTGTCTTGGTTCC	AGTCGGTGTCTCAGCCCATCTAAGCTCT		
hawaiiensis	TCGATACCTTATA	GGTACATGCTGATCAGAGATGCCGATAATCATGGAATCAGGCTTGTCTTGGTTCC	AGTCGGTGTCTCAGCCCATCTAAGCTCT		
LPP01	TCGATACCTTATAAGGTACATGCTGATCAGAGATGCCGATAATCATGGAATCAGGCTTGTCTTGGTTCC	CAGTCGGTGTCTCAGCCCATCTAAGCTCT			
LPP02	TCGATACCTTATA	GGTACATGCTGATCAGAGATGCCGATAATCATGGAATCAGGCTTGTCTTGGTTCC	AGTCGGTGTCTCAGCCCATCTAAGCTCT		
LPP03	TCGATACCTTATA	GGTACATGCTGATCAGAGATGCCGATAATCATGGAATCAGGCTTGTCTTGGTTCC	AGTCGGTGTCTCAGCCCATCTAAGCTCT		
	100	120	140	160	180
indica	CGGTGAGGTGTCTATTCTTGATTGGAGCCGCTTTGAGTGACGGCAATGATAGTTGGGTATGTTCCCGTGAGGGTAGAGCATAGACTTTATGAACAGAGC				
hawaiiensis	CGGTGAGGTGTCTATTCTTGATTGGAGCCGCTTTGAGTGACGGCAATGATAGTTGGGTATGTTCCCGTGAGGGTAGAGCATAGACTTTATGAACAGAGC				
LPP01	CGGTGAGGTGTCTATTCTTGATTGGAGCCGCTTTGAGTGACGGCAATGATAGTTGGGTATGTTCCCGTGAGGGTAGAGCATAGACTTTATGAACAGAGC				
LPP02	CGGTGAGGTGTCTATTCTTGATTGGAGCCGCTTTGAGTGACGGCAATGATAGTTGGGTATGTTCCCGTGAGGGTAGAGCATAGACTTTATGAACAGAGC				
LPP03	CGGTGAGGTGTCTATTCTTGATTGGAGCCGCTTTGAGTGACGGCAATGATAGTTGGGTATGTTCCCGTGAGGGTAGAGCATAGACTTTATGAACAGAGC				
	200	220	240	260	280
indica	TGGGCTGTCGCCTCACCACCAAAACCATCGATAAAGTGGTGGCTGAGTGAGAAATCACTGGATCTGCTATGCAGGGAGCCTTAATGAGTTGGTCTTCACCGAC				
hawaiiensis	TGGGCTGTCGCCTCACCACCAAAACCATCGATAAAGTGGTGGCTGAGTGAGAAATCACTGGATCTGCTATGCAGGGAGCCTTAATGAGTTGGTCTTCACCGAC				
LPP01	TGGGCTGTCGCCTCACCACCAAAACCATCGATAAAGTGGTGGCTGAGTGAGAAATCACTGGATCTGCTATGCAGGGAGCCTTAATGAGTTGGTCTTCACCGAC				
LPP02	TGGGCTGTCGCCTCACCACCAAAACCATCGATAAAGTGGTGGCTGAGTGAGAAATCACTGGATCTGCTATGCAGGGAGCCTTAATGAGTTGGTCTTCACCGAC				
LPP03	TGGGCTGTCGCCTCACCACCAAAACCATCGATAAAGTGGTGGCTGAGTGAGAAATCACTGGATCTGCTATGCAGGGAGCCTTAATGAGTTGGTCTTCACCGAC				
	300	320	340	360	
indica	TACAACCGCCACTATCGGTAATCTATTCCCAATTAACCTTGTCTAGTAAAGGCTAAATAGTCAGTGGAAAA				
hawaiiensis	TACAACCGCCACTATCGGTAATCTATTCCCAATTAACCTTGTCTAGTAAAGGCTAAATAGTCAGTGGAAAA				
LPP01	TACAACCGCCACTATCGGTAATCTATTCCCAATTAACCTTGTCTAGTAAAGGCTAAATAGTCAGTGGAAAA				
LPP02	TACAACCGCCACTATCGGTAATCTATTCCCAATTAACCTTGTCTAGTAAAGGCTAAATAGTCAGTGGAAAA				
LPP03	TACAACCGCCACTATCGGTAATCTATTCCCAATTAACCTTGTCTAGTAAAGGCTAAATAGTCAGTGGAAAA				

Fig. 5: alignment of ITS1 sequences from *Heterorhabditis* species LPP1, LPP2, LPP3, *Heterorhabditis hawaiiensis* and *Heterorhabditis indica*. Identical positions are shadowed.

TABLE IV
Comparative morphometrics of males from this study and other related species. Measurements are in μm , except the indexes, in form: mean $\pm$ SD (range)

Character	LPP1 Present study	LPP2 Present study	LPP4 Present study	LPP7 Present study	<i>H. indica</i> Poinar 1992	<i>H. baijardi</i> ^a Phan et al. 2003	<i>H. mexicana</i> Nguyen et al. 2004	<i>H. floridensis</i> Nguyen et al. 2006	<i>H. amazonensis</i> Andaló et al. 2006
n	20	20	20	21	12	44	20	20	20
L	888.5 $\pm$ 55.5 (821.4-95)	880.5 $\pm$ 65.0 (757.1-982.1)	862.2 $\pm$ 51.7 (789-964.3)	919.9 $\pm$ 56.9 (821.4-1000)	721 $\pm$ 64 (573-788)	878.7 (641-1072)	686 $\pm$ 38 (614-801)	862 $\pm$ 44 (785-924)	752 $\pm$ 43 (692-826)
W	45.4 $\pm$ 1.7 (43-48.5)	45.2 $\pm$ 1.8 (43.6-48.9)	45.9 $\pm$ 2.5 (43-52)	47.7 $\pm$ 3.4 (41.4-52.8)	42 $\pm$ 7 (35-46)	46 (38-53)	42 $\pm$ 3 (38-47)	47.6 $\pm$ 2.2 (43-50)	41 $\pm$ 2.3 (36-43)
T	30.9 $\pm$ 2.0 (28-34)	30.9 $\pm$ 2.1 (28.2-35)	31.4 $\pm$ 1.8 (28.1-34)	32.6 $\pm$ 2.4 (28-36)	28 $\pm$ 2 (24-32)	30.7 (25-38)	27 $\pm$ 4 (21-36)	34 $\pm$ 5.8 (29-40)	33 $\pm$ 2.7 (29-41)
ABD	24.4 $\pm$ 1.87 (21-27.3)	25.7 $\pm$ 1.33 (23.5-28)	24.3 $\pm$ 1.5 (22-27)	23.7 $\pm$ 3.3 (18-28.1)	23 $\pm$ 8 (19-24)	21 (16-27)	24 $\pm$ 1.3 (23-27)	26.3 $\pm$ 3 (20-31)	27 $\pm$ 2.6 (23-33)
EP	112.1 $\pm$ 8.2 (84.3-119)	115.7 $\pm$ 3.4 (110-121)	120 $\pm$ 5 (110-130)	89.6 $\pm$ 3.5 (83-99)	123 $\pm$ 7 (109-138)	84.7 (71-107)	124 $\pm$ 10 (108-145)	117 $\pm$ 6 (104-128)	109 $\pm$ 6 (96-116)
NR	85.8 $\pm$ 6.2 (77.1-98)	86.5 $\pm$ 5.9 (78.9-98)	84.4 $\pm$ 4.9 (78.1-92)	72.4 $\pm$ 4 (65.7-79)	75 $\pm$ 4 (72-85)	67 (54-83)	71 $\pm$ 6 (61-83)	80 $\pm$ 5 (73-90)	79 $\pm$ 5 (71-88)
Es	100.3 $\pm$ 4.14 (90-110)	103.0 $\pm$ 6.5 (90-115)	99.3 $\pm$ 4.1 (90-110)	103.5 $\pm$ 4 (97.8-111.4)	101 $\pm$ 4 (93-109)	105.3 (91-132)	96 $\pm$ 5 (89-108)	105 $\pm$ 4 (97-111)	105 $\pm$ 5 (97-114)
TR	101.2 $\pm$ 13.8 (78.9-118)	100.8 $\pm$ 14.3 (78-118)	99.9 $\pm$ 15.1 (78-118)	89.1 $\pm$ 6 (79.4-99)	91 $\pm$ 26 (35-144)	92 (60-114)	96 $\pm$ 20 (65-130)	na (42 $\pm$ 3.5)	59 $\pm$ 10 (42-85)
SP	36.0 $\pm$ 3.6 (28.9-42)	35.9 $\pm$ 3.2 (31-42)	37.2 $\pm$ 3.1 (33-42)	38.8 $\pm$ 1.7 (36-42)	43 $\pm$ 3 (35-48)	40 (31-47)	41 $\pm$ 3.8 (30-47)	42 $\pm$ 3.5 (36-46)	41 $\pm$ 2.9 (35-45)
GU	18.5 $\pm$ 2.1 (16-23)	18.4 $\pm$ 2.0 (16-23)	18.5 $\pm$ 2.1 (16-23)	19.4 $\pm$ 1.5 (17-21)	21 $\pm$ 3 (18-23)	20.3 (14-26)	23 $\pm$ 3 (18-32)	23 $\pm$ 3.7 (17-30)	21 $\pm$ 1.5 (19-23)
L/W	18.8 $\pm$ 1.6 (16-21.4)	19.9 $\pm$ 1.6 (17.8-23.7)	19.7 $\pm$ 2.4 (16.5-24.4)	19.4 $\pm$ 1.5 (17-22)	26 $\pm$ 4 (25-27)	19.3 (14-22)	na (6.4-11)	na	na
L/Es	8.5 $\pm$ 0.67 (7.3-9.7)	8.6 $\pm$ 0.9 (7.1-9.8)	8.8 $\pm$ 0.57 (8-9.9)	8.8 $\pm$ 0.6 (7.8-9.8)	4.5 $\pm$ 0.34 (4.3-4.8)	8.2 (6.4-11)	na	na	na
L/T	27.6 $\pm$ 2.5 (22.9-32.1)	28.6 $\pm$ 3.2 (22.3-34.4)	27.5 $\pm$ 2.2 (24.1-31.7)	28.3 $\pm$ 2.3 (25.4-32.4)	5.3 $\pm$ 0.5 (4.5-5.6)	29 (22-39)	5.9 (5.5-6.3)	na	na
D% = EP/Es X 100	106.7 $\pm$ 8.4 (86-114)	110 $\pm$ 9.3 (87-119)	112.5 $\pm$ 9.6 (89.7-119.8)	88 $\pm$ 4.9 (80.8-102)	84 $\pm$ 0.05 (79-90)	129 $\pm$ 9 (114-149)	na	112 $\pm$ 4 (105-119)	103 $\pm$ 3.7 (95-109)
EP/T	2.5 $\pm$ 0.31 (2.1-3)	2.5 $\pm$ 0.26 (2.2-2.9)	2.5 $\pm$ 0.25 (2.1-2.9)	2.6 $\pm$ 0.24 (2.3-3.2)	0.94 $\pm$ 0.07 (0.83-1.03)	na	na	na	na
W% = SP/ABDX 100	148 $\pm$ 14 (126-174)	140 $\pm$ 16 (110-177)	153 $\pm$ 17 (130-190)	147 $\pm$ 14 (126-171)	187 (160-210)	191 (138-260)	167 $\pm$ 2 (130-196)	157 $\pm$ 25 (133-209)	152 $\pm$ 20 (120-187)
GS% = GU/SP X 100	52 $\pm$ 6 (45-65)	54 $\pm$ 10.5 (45-80)	40 $\pm$ 4 (45-58)	50 $\pm$ 3 (45-55)	50 $\pm$ 10 (40-60)	50 (38-61)	56 $\pm$ 7 (43-70)	53.8 (47-65)	51 $\pm$ 3.2 (44-56)

a: average and limits of three strains measured by the authors; na: parameter not analyzed; L: body length; W: greatest body diam; T: tail length; ABD: anal body diam; EP: distance from anterior end to excretory pore; NR: distance from anterior end to nerve ring; Es: distance from anterior end of esophagus; TR: testis reflexion; SP: spicule length; GU: gubernaculum.

Fig. 6: phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* species. A: maximum likelihood (ML) unrooted tree of ITS1 sequences, using a likelihood score of $lnl = 1747.8$; B: maximum parsimony (MP) unrooted tree of ITS1 sequences, the best tree score found is 258. From a total of 415 characters, 106 were parsimony-informative; C: ML unrooted tree of the “*indica* group” using ITS1 and ITS2 sequences. The scale bar is the number of substitutions per site. The bootstrap values are shown over the branches. Analyses were made as described in Materials and Methods. The scale bar shows the number of substitutions per site.

Fig. 7: restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of ITS sequences. A: partial alignment of ITS1 sequences from *Heterorhabditis* spp. Gray boxes show unvariable positions. The black box show the restriction site for *Tth* 111 found only in the “*baujardi* sub-group”. Below the alignment the scheme shows the relative position of *Tth* 111 site in the ITS1 sequence; B: RFLP analysis of ITS fragment obtained by polymerase chain reaction (PCR). The PCR fragments obtained from several samples were digested with *Tth* 111 and submitted to agarose gel electrophoresis and Ethidium bromide staining; a: LPP4; b: LPP5; c: LPP7; d: LPP8; e: LPP9, and f: LPP10.

Further analysis of the ITS1 alignment indicated the presence of a unique sequence in the “*baujardi* sub-group” (LPP7, *H. baujardi*, *H. mexicana*, *H. floridensis* and *H. amazonensis*, Fig. 5). This unique sequence contains the cleavage site of the restriction enzyme *Tth*

111 (Fig. 7A). Digested ITS1-5S-ITS2 PCR fragments from unsequenced and sequenced LPP strains were used to diagnose to which group they belong (Fig. 7B). This analysis confirmed the sequence results and showed that the unsequenced isolates LPP5, LPP8 and LPP10 belong to the “*baujardi* sub-group”, while LPP4 and LPP9 belong to the “*indica* sub-group”. Therefore, based on ITS sequence and restriction fragment length polymorphism, the strains from the rainforest of Monte Negro, Rondônia, LPP1, LPP2, LPP3, LPP4 and LPP9 were considered to be *H. indica* whereas the strains LPP5, LPP7, LPP8 and LPP10 were considered to be *H. baujardi*.

Species delimitation can be difficult as discussed extensively by Adams (2001) and Sites and Marshall (2004). The accurate description of a new nematode species is an especially cumbersome task, due to the morphological and reproductive diversity of nematodes (Nadler 2002). Our data on the ITS sequences from Monte Negro isolates suggest the presence of two distinct groups of nematodes of the genus *Heterorhabditis*, which live in sympatry. Data presented in this paper do not allow us to delimit new species or review the already described species of *Heterorhabditis* found in tropical regions. In order to avoid taxonomic inflation (Isaac et al. 2004), these isolates should be considered as members of the previously well characterized species, *H. baujardi* and *H. indica* until more experimental data are obtained. The number of sequences we have for the “*indica* sub-group” isolates (LPP1, 2, 3) support their classification within the previously described species *H. indica*, as was done with *H. hawaiiensis* (Adams et al. 1998). The only “*baujardi* sub-group” sequence (LPP7) presented here, makes it difficult to decide if it belongs to the newly described *H. amazonensis* (Andaló et al. 2006) or to the *H. baujardi* isolated in the forests of Vietnam (around 10–14° N, 107° E) (Phan et al. 2003). It is interesting that *H. baujardi* and *H. indica* were found in the same collecting areas of Vietnam (Phan et al. 2003), similar to what we found in the Amazonian forest (10° S, 63° W), but not necessarily as sympatric populations.

Considering the great geographical distances among sites of occurrence for the “*indica* sub-group” nematodes (i.e., Vietnam, India and Brazil), we envision two possible scenarios: the isolates belong to different species, based on their geographical origin, or they all belong to previously described species. Recently it was shown that gene sequence haplotypes of *Caenorhabditis briggsae* show very little diversity around the globe when considering the same latitude, but that they vary depending on distance to the equator and create what Dolgin et al. (2008) called “latitudinal clades”. Thus, isolates of *H. indica* around the globe might also be “latitudinal clades”, but more extensive studies are needed to test this hypothesis.

Our data on gubernaculum morphology successfully differentiated *H. baujardi* from *H. indica*, and we suggest that this character should be investigated more thoroughly in the other described species in this group (i.e., *H. amazonensis*, *H. mexicana* and *H. floridensis*) to better define their species status.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Khuong Nguyen for sharing unpublished data. To Grace Kelly dos Santos for rearing *G. mellonella* larvae (TEC-NORTE fellowship). To UENF/LBCT for the light microscope facilities, Dr. Luís Marcelo de Aranha Camargo, and staff at ICB5/USP for help in collecting the samples.

REFERENCES

- Adams BJ 2001. The species delimitation uncertainty principle. *J Nematol* 33: 153-160.
- Adams BJ, Burnell AM, Powers TO 1998. A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. *J Nematol* 30: 22-39.
- Adams BJ, Fodor A, Klein MG, Smith HL, Stackebrandt E, Stock SP 2006. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biol Control* 37: 32-49.
- Andaló V, Nguyen KB, Moino A 2006. *Heterorhabditis amazonensis* n.sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematology* 8: 853-867.
- Bedding RA, Akhurst RJ 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109-110.
- Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71-75.
- Dolgin ES, Félix MA, Cutter AD 2008. Hakuna Nematoda: genetic and phenotypic diversity in African isolates of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae*. *Heredity* 100: 304-315.
- Dutky SR, Thompson JV, Cantwell GE 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *J Insect Pathol* 6: 417-422.
- Fitch DH 2000. Evolution of “Rhabditidae” and the Male Tail. *J Nematol* 32: 235-244.
- Gardner SL, Stock SP, Kaya HH 1994. A New Species of *Heterorhabditis* from the Hawaiian Islands. *J Parasitol* 80: 100-106.
- Hominick WH 2002. Biogeography. In R Gaugler, *Entomopathogenic Nematology*, CABI Publishing, New York, p. 115-143.
- Hominick WM, Briscoe BR, Garcia Del-Pino F, Heng J, Hunt DJ, Kozodoy E, Mracek Z, Nguyen KB, Reid AP, Spiridonon S, Stock P, Sturhan D, Waturu C, Yoshida M 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *J Helminthol* 71: 271-298.
- Hominick WM, Reid AP, Bohan DA, Briscoe BR 1996. Entomopathogenic nematodes: Biodiversity, geographical distribution and de convention on Biological Diversity. *Biocontrol Sci Technol* 6: 317-331.
- Isaac NJB, Mallet J, Mace GM 2004. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends Ecol Evol* 19: 464-469.
- Josephraj Kumar A, Sivakumar CV 1997. A survey for entomopathogenic nematodes in Kanyakumari district, Tamil Nadu, India. *Indian J Entomol* 59: 45-50.
- Liu J 1994. A new species of the genus *Heterorhabditis* from China (Rhabditidae: Heterorhabditidae). *Acta Zool Sinica* 19: 268-272.
- Mason JM, Razak AR, Wright DJ 1996. The recovery of entomopathogenic nematodes from selected areas within Peninsular Malaysia. *J Helminthol* 70: 303-307.
- Nadler SA 2002. Species delimitation and nematode biodiversity: phylogenies rule. *Nematology* 4: 615-625.
- Newton LA, Chilton NB, Beveridge I, Hoste H, Nansen P, Gasser RB 1998. Genetic markers for strongylid nematodes of livestock defined by PCR-based restriction analysis of spacer rDNA. *Acta Trop* 69: 1-15.
- Nguyen KB, Shapiro-Ilan DI, Stuart RJ, McCoy CW, James RR, Adams BJ 2004. *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. *Nematology* 6: 231-244.
- Nguyen KB, Smart Jr GC 1995. Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida). *J Nematol* 27: 206-212.
- Phan LK, Subbotin SA, Nguyen CN, Moens M 2003. *Heterorhabditis baujardi* sp. n. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam with morphometric data for *H. indica* populations. *Nematology* 5: 367-382.
- Poinar Jr GO 1976. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae n. fam.) *Nematologica* 21: 463-470.
- Poinar Jr GO, Jackson T, Klein M 1987. *Heterorhabditis megidis* sp. n. (Heterorhabditidae: Rhabditida) parasitic in the Japanese beetle, *Popillia japonica* (Scarabaeidae: Coleoptera), in Ohio. *Proc Helminthol Soc Washington* 54: 53-59.
- Poinar Jr GO, Karunakar GK, David H 1992. *Heterorhabditis indica* n.sp. (Rabditida: Nematoda) from India: separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. *Fundam Appl Nematol* 15: 467-472.
- Posada D, Crandall KA 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Rosa JS, Bonifassi E, Amaral J, Lacey LA, Simões N, Laumond C 2000. Natural Occurrence of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernema, *Heterorhabditis*) in the Azores. *J Nematol* 32: 215-222.
- Shamseldean MM, El-Sooud AB, Abd-Elgawad MM, Saleh MM 1996. Identification of a new heterorhabditid species from Egypt, *Heterorhabditis taysearae*, n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Egypt J Bio Pest Control* 6: 129-138.
- Sites JW Jr, Marshall JC 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annu Rev Eco Evol Syst* 35: 199-227.
- Smits PH, Ehlers RU 1991. Identification of *Heterorhabditis* spp. by morphometric characters and RFLP and of their symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. by species specific DNA probes. *Bull SROP/WPRS* 14: 195-201.

- Stock SP, Campbell JF, Nadler SA 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *J Parasitol* 87: 877-889.
- Stock SP, Kaya HK 1996. A multivariate analysis of morphometric characters of *Heterorhabditis* species (Nemata: Heterorhabditidae) and the role of morphometrics in the taxonomy of species of the genus. *J Parasitol* 82: 806-813.
- Stock SP, Strong DR, Gardner SL 1996. Identification of *Heterorhabditis* (Nemata: Heterorhabditidae) from California with a new species isolated from the larvae of the ghost moth *Hepialis californicus* (Lepidoptera: Hepialidae) from the Bodega Bay Natural Preserve. *Fundam Appl Nematol* 19: 585-592.
- Stuart RJ, Gaugler R 1994. Patchiness in populations of entomopathogenic nematodes. *J Invertebr Pathol* 64: 39-45.
- Swofford DL 1998. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0, Sinauer, Sunderland, MA.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876-4882.
- White GF 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. *Science* 66: 302-303.
- Wimmer B 2007. A compilation of primers – ITS Primer Sets. [updated 2006 Nov 20; cited 2008 Jan 17]. Available from: <http://www.nematodes.org/nematodes/npg/primersets.html>