

Marco Antonio Arantes da Silva

Clonagem e expressão de CipA (PMN_0325), um
cristal intracitoplasmático de *Photorhabdus*
luminescens linhagem MN7 em *Escherichia coli*

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter

Versão corrigida

São Paulo

2017

Resumo

SILVA, M. A. A. **Clonagem e expressão de CipA (PMN_0325), um cristal intracitoplasmático de *Photorhabdus luminescens* linhagem MN7 em *Escherichia coli***. 2017. 57 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Photorhabdus luminescens (Enterobacterales; Morganellaceae) MN7 é uma enterobactéria encontrada na natureza apenas associada a seu simbionte, nematoide da espécie *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida; Heterorhabditidae) LPP7. Coletados em Monte Negro (RO), Brasil, essa dupla nematoide/bactéria é altamente eficiente em invadir e matar invertebrados que tenham uma fase de vida no solo. As bactérias são responsáveis por matar o hospedeiro secretando diversos metabólitos secundários e toxinas. Dentro do cadáver do inseto o nematoide se reproduz alimentando-se da bactéria. Bactérias do gênero *Photorhabdus* produzem cristais formados pelas proteínas conhecidas por CIPs (Crystal Inclusion Proteins). Duas classes de cristais foram observadas compostas dos polipeptídeos CipA e CipB. Na fase estacionária de crescimento esses cristais correspondem a até 40% do total de proteínas na célula. Baseados em dados da literatura e na sequência do genoma de *P. luminescens* linhagem MN7, desenhamos uma estratégia para clonar e expressar a ORF (open read frame) completa dos genes que codificam CipA e CipB em MN7. Ao fazermos uma busca por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no genoma de *P. luminescens* linhagem MN7 encontramos uma ORF que codificaria uma terceira Cip, com similaridade maior a CipB, que foi denominado CipB2. Os três genes foram amplificados e subclonados, porém apenas CipA foi expressado em *Escherichia coli*. A proteína recombinante foi purificada em coluna quelante de níquel e utilizada para inóculo em camundongos Balb/c para obtenção de anticorpo para futuros ensaios. Conseguimos assim comprovar a presença de todas as ORFs e a funcionalidade da ORF de CipA.

Palavras-chave: *Heterorhabditis*. Proteína recombinante, nematoide.

Abstract

SILVA, M.A. A. **Cloning and expression of CipA (PMN_0325), an intracytoplasmic crystal of *Photorhabdus luminescens* MN7 strain in *Escherichia coli*.** 2017 57 p. Master thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Photorhabdus luminescens (Enterobacterales; Morganellaceae) MN7 is an enterobacterium found in nature only associated with its symbiont, nematodes of the species *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida; Heterorhabditidae) LPP7. Collected in Monte Negro (RO), Brazil, this nematode/bacteria pair is highly efficient in invading and killing invertebrates that have a life stage in the soil. Bacteria are responsible for killing the host by secreting various secondary metabolites and toxins. After the bioconversion of the insect corpse by the symbiont the nematode reproduces, feeding on the bacteria. Bacteria of the genus *Photorhabdus* produce intracellular crystals composed of proteins known as CIPs (Crystal Inclusion Proteins); the two classes of crystals observed contain the polypeptides CipA and CipB respectively. In stationary growth phase these crystals amount to 40% of the total proteins in the cell. Based on literature data and the genome sequence of *P. luminescens* MN7 strain, we designed a strategy to clone and express the complete open reading frame of the genes encoding CipA, CipB in MN7. A BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search of the genome of *P. luminescens* lineage MN7 found an ORF that would encode a third Cip, with greater similarity to CipB, which was denominated CipB2. All three genes were amplified, and sub cloned, but only CipA was expressed in *Escherichia coli*. The recombinant protein was purified on a Nickel chelating column and used for inoculum in Balb/c mice to obtain antibody for future assays. We thus proved the presence of all ORFs and the functionality of the ORF of CipA.

Keywords: *Photorhabdus luminescens*. *Heterorhabditis*. Recombinant protein

1 INTRODUÇÃO

1.1 O filo Nematoda

Os nematoides são metazoários com simetria bilateral e tamanho que varia entre menos de cem micrômetros até alguns metros (DECRAEMER et al., 2014). Sua dispersão e abundância em número de indivíduos são de tal ordem que, se todo o planeta desaparecesse e só eles permanecessem, a forma da Terra ainda poderia ser discernida do espaço (COBB, 1915). As estimativas atuais pressupõem que existam milhões de espécies no filo Nematoda (LAMBSHEAD et al., 1993). Essas afirmativas refletem a grande variedade de nichos que esses organismos podem habitar. São encontrados nematoides em ambientes terrestres ou aquáticos, podendo ser de vida livre ou parasitas de animais, plantas e humanos. Uma cutícula epidérmica constituída principalmente de colágeno, proporcionando resistência e impermeabilidade é uma das características que permite essa distribuição cosmopolita (WOOD, 1988) e a sua resistência a ambientes extremos (WHARTON, 2002). A utilização de dados moleculares associados a dados morfológicos

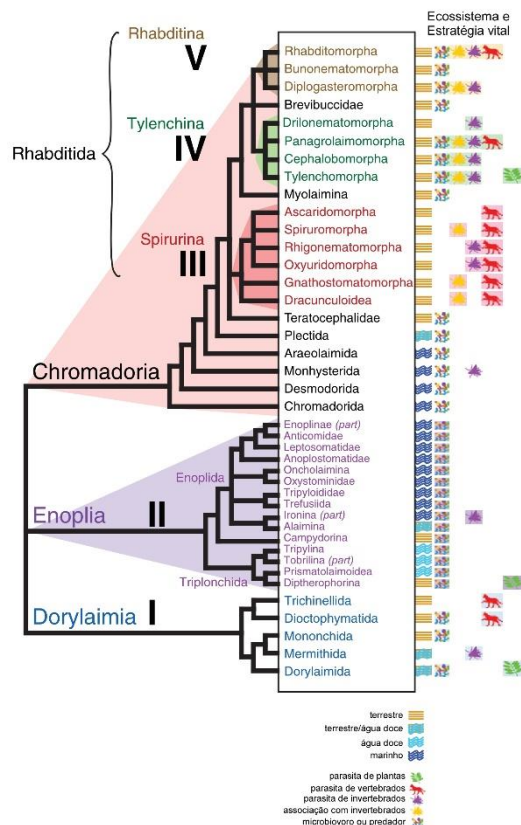


Figura 1 - Estrutura filogenética dos Nematoda. Esquema baseado na análise do RNA da subunidade menor do ribossomo (SSU rRNA) e interpretação das relações morfológicas entre os taxa. Os nomes sistemáticos dos taxa são dados para os nós principais na filogenia. Clados I, II, Chromadoria, III, IV e V foram definidos inicialmente por Blaxter et al. (1998). Para cada ordem/subordem, os hábitos tróficos e os ecossistemas estão indicados por pequenos ícones (modificado de Blaxter e Koutsovoulos, 2015).

permitiu a construção de uma taxonomia cladística mais robusta para o filo Nematoda (**Figura 1**). Essa nova taxonomia permite comparar nematoides que evoluíram para explorar os diferentes nichos ecológicos.

1.2 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans tem sido usada como organismo modelo desde que Brenner

(1974) mostrou a simplicidade de cultivo e o número fixo de células, entre outras características. Foi o primeiro animal a ter o genoma completamente sequenciado (TCESC, 1998). O conhecimento obtido nos últimos 40 anos, permitiram que diversos avanços acontecessem no conhecimento de mecanismos básicos comuns a outros animais, como a demonstração do fenômeno de interferência por dsRNA de (RNAi) (FIRE, 1998) e demonstração do papel de genes da via de insulina na regulação do tempo de vida (FRIEDMAN; JOHNSON, 1988; KENYON et al., 1993; KIMURA et al., 1997), bem como a descoberta dos primeiros vírus de nematoides (FELIX et al., 2011), entre outras. Todo esse conhecimento obtido foi analisado à luz da evolução permitindo a caracterização de diversos genes e vias de sinalização conservados que desempenham funções semelhantes, quando não idênticas, em outros animais, incluindo seres humanos. (CARROL et al., 2004).

1.3 Nematoides entomopatogênicos

Assim como *C. elegans*, outros nematoides são utilizados como modelos em pesquisa como os nematoides entomopatogênicos (ou patogênico para insetos), conhecidos pelo acrônimo NEP's. Esses NEP's pertencem, como *C. elegans*, à classe Chromadoria. São divididos em dois gêneros, *Heterorhabditis* e *Steinernema*. Ambos os gêneros vivem em associação com enterobactérias. Os simbiosites de *Heterorhabditis* spp. pertencem ao gênero *Photorhabdus* enquanto que os de *Steinernema* spp. pertencem ao gênero *Xenorhabdus* (FORST; NEALSON, 1996). Esses nematoides não são seletivos quanto aos insetos que parasitam, podendo infectar diversas espécies de animais que tenham uma fase de vida no solo (POINAR JR; GEORGE, 1976). O par nematoide/bactéria é um excelente modelo para estudo de processos de infecção por patógenos e resposta dos hospedeiros contra o nematoide e também de respostas imunológicas antibacterianas.

Os NEPs durante seu desenvolvimento passam por diferentes estádios larvais, J1, J2, J3, J4, adulto e JI (juvenil infectante). O único estágio do ciclo de vida do nematoide que é encontrado no ambiente, fora do inseto é o JI, similar a fase de *dauer* de *C.elegans*. (WOOD, 1988).

1.3.1 Simbiose e ciclo de vida

Tanto os nematoides do gênero *Heterorhabditis*, quanto as bactérias do gênero *Photorhabdus* não são encontrados na natureza dissociados, ambos participam de um

mutualismo multipartido (GOODRICH-BLAIR; HUSSA, 2013). O nematoide é ineficaz em colonizar e se reproduzir no inseto na ausência da bactéria, assim com a bactéria sem o nematoide não consegue chegar ao inseto hospedeiro.

O ciclo de vida inicia-se com os juvenis infectantes (JI), estágio em que o nematoide possui duas cutículas, facilitando sua sobrevivência no solo até encontrar um hospedeiro adequado. Carregam em seu tubo digestivo um pequeno número de bactérias simbiotes (BOEMARE et al., 1993). A penetração no hospedeiro ocorre principalmente pela boca e ânus, porém qualquer orifício no exoesqueleto (como os espiráculos das larvas de insetos), podem ser utilizados. A presença de dentes córneos, auxiliam sua entrada no hospedeiro. Uma vez dentro do inseto, os nematoides regurgitam as bactérias na hemolinfa. Esse processo leva em média 90 minutos, onde é liberada uma célula a cada 2 minutos (CICHE; ENSIGN, 2003). O inseto morre por ação das toxinas bacterianas que desregulam o sistema imune, levando a uma septicemia, esse processo pode durar entre 24 e 72 horas (WATERFIELD et al., 2009). As bactérias produzem também enzimas hidrolíticas (ELEFThERIANOS et al., 2010), que convertem os tecidos do inseto em

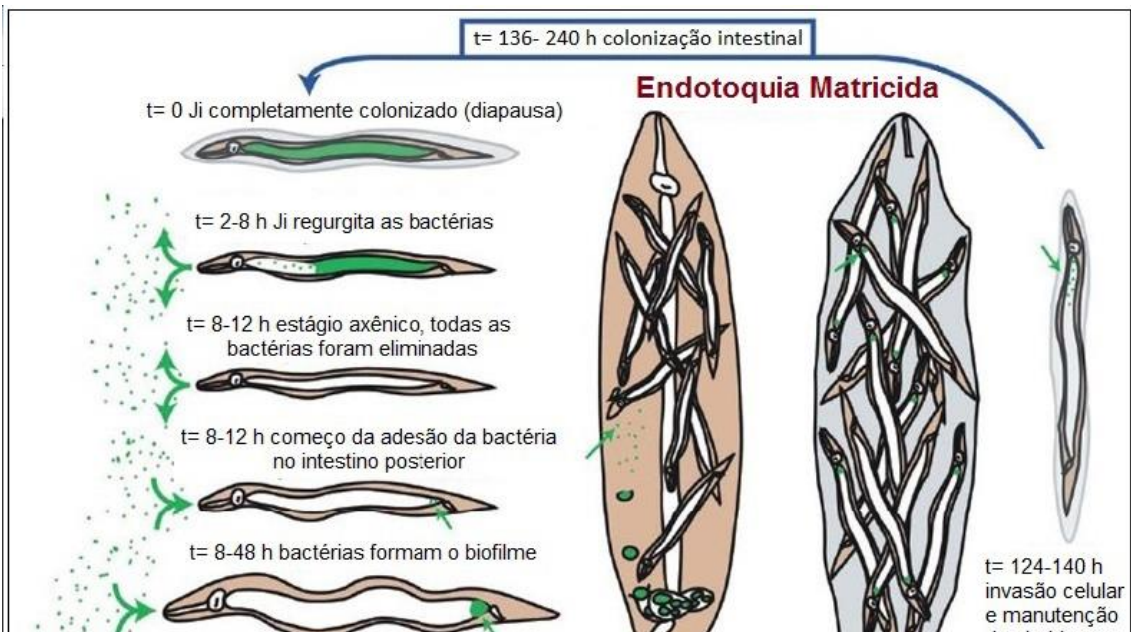


Figura 2- Colonização de *P.luminescens* spp. em seu simbiote *Heterothabditis* spp. e endotoquia matricida. A figura demonstra a interação das bactérias com os nematoides, a escala de tempo representa a infecção em algum hospedeiro. Em t=0 inicia-se a infecção, com o nematoide completamente colonizado. Em t=2-8 h as bactérias são regurgitadas e com t=8-12 h o processo de colonização tem início. *P.luminescens* forma um biofilme e invade células do intestino do nematoide. A prole dos nematoides se desenvolvem dentro da mãe, se alimentando da mesma, em um processo chamado endotoquia matricida, durante esse processo a prole tem contato com as colônias de *P.luminescens*, garantindo assim a exclusividade da simbiose. Após 140h do início da infecção a nova prole está com uma colônia em seu intestino e apta para recomençar o ciclo. (Extraído e modificado de Somvanshi, 2010).

biomassa bacteriana. Com os recursos disponíveis os nematoides se desenvolvem e passam a se reproduzir de 2 a 3 gerações. A primeira geração de JI é de hermafroditas capazes de se autofertilizar, esses hermafroditas não possuem vulva. Seguidos por uma geração que possui machos e fêmeas com vulva. Quando os recursos se esgotam, inicia-se o processo de transmissão das bactérias para a nova prole de nematoides. (**Figura 2**). As bactérias aderem à última célula do intestino dos nematoides conhecida com RGC (rectal gland cell) (CLARK; EASOM, 2012), e formam um biofilme, invadindo a célula e crescendo dentro de vacúolos (CICHE et al., 2008). Após romper as células invadidas, as bactérias têm acesso ao pseudoceloma do verme e à prole que aí está se desenvolvendo, os ovos eclodem dentro da mãe, quando crescem rompem a cutícula da mãe matando-a, em um processo conhecido como endotoquia matricida, garantindo assim a especificidade da simbiose. Essa prole colonizada pelas bactérias se desenvolve até JI.

1.3.2 Importância agrícola de *Meloidogyne* (Tylenchida; Meloidogynidae), *Heterodora* (Tylenchida; Heteroderidae) e *Heterhabditis* (Rhabditida; Heterorhabditidae)

Nematoides causam impacto na agricultura de diferentes formas. Enquanto nematoides dos gêneros *Meloidogyne* e *Heterodera* chegam a causar anualmente prejuízos de 80 bilhões de dólares em culturas de soja, batata e tomate, (AGRIOS, 2005), o gênero *Heterorhabditis* vem sendo utilizado com eficiência no controle agrícola de pragas de importância econômica e substituindo em alguns casos o uso de agrotóxicos, devido a vasta gama de insetos parasitáveis. Há empresas especializadas na produção desses nematoides, porém sua utilização ainda é considerada de alto custo, limitando sua aplicação a culturas altamente rentáveis (GAUGLER, 2002). O nematoide utilizado nesse trabalho *H. baujardi* linhagem LPP7 foi uma das linhagens testadas em cultura de goiabas no combate ao gorgulho da goiaba, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), mostrando ser altamente virulenta para larvas de quarto estágio do inseto. (DOLINSKI, 2006). Em laboratório esses nematoides são mantidos em placas de Petri em meio sólido contendo extrato-de-carne e inóculo da bactéria simbiote *P. luminescens*. Quando inoculados em larvas de *Galleria mellonella* e mantidos a 28 °C os JI atingem idade adulta em aproximadamente 3 dias.

1.4 O gênero *Photorhabdus*

Photorhabdus são bactérias em formato de bastonete, que não esporulam e medem 0,5-2 x 1-10 µm. (BOEMARE et al., 2005), são classificadas como enterobactérias gram-

negativas pertencentes à classe das γ -proteobactérias, a mesma que contém gêneros de bactérias com espécies patogênicas para outros seres vivos como *Salmonella*, *Yersinia* e *Escherichia*. (FUCHS; HEERMANN, 2008). *Photorhabdus* são as únicas bactérias bioluminescentes encontradas fora de ambiente aquático. Existem três espécies pertencentes a esse gênero. *P. luminescens*, *P. temperata* e *P. asymbiotica* (FICHER-LE SAUX et al., 1999). A primeira espécie a ter genoma sequenciado foi *P. luminescens* linhagem TT01, que passou a ser referência para estudos do gênero desde então. (CLARKE, 2014; DUCHAUD et al., 2003). Posteriormente *P. temperata* e *P. asymbiotica* também tiveram seus genomas sequenciados (PARK et al., 2013; WILKINSON et al., 2010), permitindo estudos comparativos entre os gêneros. Até o momento *P. asymbiotica* foi a única espécie do gênero encontrada em seres humanos, colonizando feridas na pele (PEEL et al., 1999). Apesar de descrita inicialmente somente como isolados de casos clínicos humanos, posteriormente *P. asymbiotica* também foi encontrada em simbiose com nematoides da espécie *H. indica*. (GERRARD et al., 2006).

Photorhabdus luminescens, apresenta duas variantes fenotípicas denominadas fase I e fase II. Quando isolada do nematoide apresenta o fenótipo de fase I (ou forma I) e após algumas gerações em cultura apresenta fenótipo de fase II (ou forma II) (KOPPENHÖFER, 2007). O tamanho das células, a produção de pigmentos, as condições de virulência e infecção e a presença de cristais de inclusão os quais discutiremos mais adiante, são algumas características que diferenciam os dois fenótipos (BOEMARE et al., 1997). Além disso essas bactérias devem manter o mutualismo com a nematoide e em outro momento ser capaz de matar e colonizar o inseto hospedeiro. Na forma mutualística as células da bactéria são 17 vezes menores que a na forma patogênica, produzem também menos bioluminescência, menos metabólitos secundários. Entretanto na forma patogênica a produção desses metabólitos secundários é bem ampla. Os genes envolvidos na produção destes metabólitos são aproximadamente 6% dos genes de *P. luminescens* TT01, quase o dobro dos 3,8% presentes em *Streptomyces* considerado um modelo para o estudo dessas moléculas (BODE, 2009). Esses fatos tornam bactérias do gênero *Photorhabdus*, além de modelos para estudo de relações simbióticas, excelente objeto de mineração de compostos com propriedades farmacológicas ou antibióticas. Mesmo não sendo encontradas sozinhas na natureza elas podem ser facilmente cultivadas em meios de cultura desenvolvidos para outras enterobactérias como *E. coli*.

Nos últimos 10 anos surgiram mais de 8000 publicações onde é citada a palavra *Photorhabdus* (busca no Google Scholar em 28/ago/2017). Destas publicações mais de

300 possuem *Photorhabdus* no título e são indexadas no banco de dados PubMed (busca em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> em 28/ago/2017). Diversos estudos estão sendo realizado com esse modelo, como a análise de metabolitos secundários (BAGER, 2016), comparações proteômicas (KUMAR, 2016), entre outros.

1.5 Cristais intracitoplasmáticos

Tais cristais intracitoplasmáticos, observados pela primeira vez em *Xenorhabdus* spp. (BOEMARE et al., 1982), foram caracterizados e isolados em *P.luminescens* linhagem NC1 e Hm e denominados CIP (*cristal inclusion proteins*), chamadas de Cip A e Cip B, que juntas representam 40% das proteínas totais das células em fase estacionária (BOWEN; ENSIGN, 2001). O fato de não serem secretadas pelas bactérias, dificulta sua detecção e assim sua comparação com outras proteínas. CipA/B não demonstram semelhança com nenhuma outra proteína quanto ao alinhamento dos aminoácidos, mas apresentam 25% de identidade entre si (BINTRIM; ENSIGN, 1998). Inativação gênica por inserção já foi obtida para CipA/B em *P. luminescens* TT01 (BINTRIM; ENSIGN, 1998), resultando em fenótipos pleiotrópicos de difícil interpretação. Sabe-se também que CipA/B não são toxinas, pois quando inoculadas em *Galleria mellonella* não matam o inseto e bactérias carenciadas não degradam as Cip's (BOWEN; ENSIG, 2001). Até o momento são incertas as funções destes cristais no comportamento da relação patógeno-hospedeiro.

Nosso grupo isolou (KAMITANI et al., ms submetido) sequenciou e anotou o genoma de *P.luminescens* linhagem MN7 (ALVES et al., em preparação), isolada do nematoide *Heterorhabditis baujardi* LPP7, encontrado em Monte Negro, RO (DOLISNKI et al., 2008). Tanto em *P. luminescens* TT01 como *P. luminescens* MN7 foram encontrados três genes que codificam proteínas anotadas como CIPs.

A descoberta desses genes, permitiu que pudéssemos iniciar um trabalho sobre as CIPs de *P.luminescens* MN7, buscando compreender qual a relação dessas proteínas na bactéria.

6 Conclusão

Neste trabalho podemos amplificar clonar e expressar CipA, uma proteína recombinante, a partir do DNA genômico de *Photorhabdus luminescens* linhagem MN7, comprovando assim a funcionalidade da ORF, previamente descrita, as outras ORFs de CipB e CipB2 amplificadas e subclonadas não foram expressas, necessitando uma análise mais apurada dos plasmídeos para confirmar a fase de leitura ou algum erro na sequência gerado no processo de amplificação.

A purificação de CipA-recombinante foi realizada e a proteína purificada foi utilizada para imunização em camundongos para obtenção de anti-soro, que não responderam de forma satisfatória.

Futuros ensaios poderão ser realizados com os plasmídeos construídos neste trabalho, para uma compreensão mais aprofundada do comportamento destes cristais que podem estar envolvidas em diferentes processos no interior das células de *Photorhabdus* sp. e em seus simbiontes *Heterorhabditis* sp.

REFERÊNCIAS¹

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 952 p.2005.
- BABENZIEN H-D, SASS H. The sediment-water interface - habitat of the unusual bacterium *Achromatium oxaliferum*. **Advances in Limnology** 48, pp. 247-251, 1996.
- BAGER R, ROGHANIAN M, GERDES K, CLARKE DJ. Alarmone (p)ppGpp regulates the transition from pathogenicity to mutualism in *Photorhabdus luminescens*. **Mol Microbiol**. 100(4):735-47, 2016.
- BERLINER E. Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n.sp. **Z. f. angew. Ent.** 2:29-56, 1915.
- BERTANI G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2 and other experimental systems. **J. Bacteriol.** 186:595-600. 2004
- BINTRIM SB, ENSIGN JC Insertional inactivation of genes encoding the crystalline inclusion proteins of *Photorhabdus luminescens* results in mutants with pleiotropic phenotypes. **J. Bacteriol.** 180:1261-1269, 1998.
- BLAXTER ML, DE LEY P, GAREY, JR, LIU LX, SCHELDEMAN P, VIERSTRAETE A, VANFLETEREN JR, MACKKEY LY, DORRIS M, FRISSE LM, VIDA JT AND THOMAS WK. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature** 392:71-75, 1998.
- BLAXTER M, KOUTSOVOULOS G. The evolution of parasitism in Nematoda. **Parasitology**, v. 10, p1-14, 2015.
- BODE HB. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Curr Opin Chem. Biol.**, v.13, n.2, p.224-230, Apr 2009.
- BOEMARE N, LOIUS C, KUHL G. Etude ultrastucturale des cristaux chez *Xenorhabdus* spp., bactéries inféodées aux nématodes entomophages *Steinernematidae* et *Heterorhabditidae*. **C. R. Soc. Biol.** 177:107-115, 1982.
- BOEMARE NE, AKHURST RJ Genus 26. *Photorhabdus*. In: Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R. & Staley, J.T. (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology, volume 2: The Proteobacteria, part B: The Gammaproteobacteria*. New York, NY, USA, **Springer**, pp; 732-740, 2005.
- BOEMARE NE, AKHURST RJ, MOURANT RG. 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. **Intern. Jour. of Syste. Bacteriol.** 43:249-255, 1993.
- BOEMARE NE, GIVAUDAN A, BREHELIN M, LAUMOND C Symbiosis and pathogenicity of nematode-bacterium complexes. **Symbiosis** 22: 21-45., 1997.
- BOWEN DJ, ENSIGN Isolation and characterization of intracellular protein inclusions produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Appl.**

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Environ. Microbiol. 67:4834-4841, 2001.

BRAVO A, GILL SS, SOBERÓN M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** 49:423-435, 2007.

BRENNER S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics** 77:71-94, 1974.

CARROLL SB, GRENIER JK, WEATHERBEE SD. **From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design**, 2nd edition, Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, x+258 p. 2004.

CICHE TA, ENSIGN JC. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? **Appl. Environ. Microbiol.** 69:1890-1897, 2003.

CICHE TA, KIM K, KAUFMANN-DASZCZUK B, NGUYEN KCQ, HALL DH. Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. **Appl. Environ. Microbiol.** 74:2275-2287, 2008.

CLARKE DJ. The genetic basis of the symbiosis between *Photorhabdus* and its invertebrate hosts. **Adv. Appl. Microbiol.**, v.88, p.1-29, 2014.

COBB NA. *Nematodes and their Relationships*, U. S. Department of Agriculture **Yearbook**, 457-90, 1915.

DECRAEMER W, COOMANS A, BALDWIN J. Morphology of Nematoda. in Schmidt-Rhaesa A (ed.) **Handbook of Zoology** - Gastrotricha, Cycloneuralia and Gnathifera - vol. 2 Nematoda, p. 1-59, 2014

DEL VALLE EE, DOLINSKI C, BARRETO ELS, SOUZA RM, SAMUELS RI. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii* (coleoptera: Curculionidae) larvae. **Bio. Sci. Tech.**, v.18, p.33-41, 2008b.

DEL VALLE EE, DOLINSKI C, SOUZA RM. Dispersal of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (nematoda: Rhabditida) applied to the soil as infected host cadavers. **International Journal of Pest Management**, v. 54, n.2, p.115-122, 2008a.

DOLINSKI C, KAMITANI F, MACHADO IR, WINTER CE Molecular and morphological characterization of *heterorhabditis* entomopathogenic nematodes from the rainforest in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 103, 150-159, 2008.

DOLINSKI C, VALLE ED, STUART RJ. Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in Laboratory and greenhouse experiments. **Biological Control**, v. 38, n.3, p. 422-427, 2006

DUCHAUD E. et al. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Nat. Biotechnol.**, v.21, n. 11, p. 1307-1313, Nov 2003.

DUEBER JE, WU GC, MALMIRCHGINI GR, MOON TS, PETZOLD CJ, ULLAL AV, PRATHER KLJ, KEASLING JD. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. **Nature Biotechnol.** 27:753-759, 2009.

EASOM CA, CLARKE DJ. *HdfR* is a regulator in *Photorhabdus luminescens* that modulates metabolism and symbiosis with the nematode *Heterorhabditis*. **Environmental Microbiology**, 14:953-966, 2012.

ELEFThERIANOS I, FRENCH-CONSTANT RH, CLAKE JD, DOWLING AJ, REYNOLDS SE. Dissecting the immune response to the entomopathogen *Photorhabdus*.

Trends Microbiol. 18:552-560, 2010.

FÉLIX MA, ASHE J, PIFFARETTI G, WU I, NUEZ et al., Natural and experimental infection of *Caenorhabditis nematodes* by novel viruses related to nodaviruses. **PLoS Biol.** 9: e1000586, 2011.

FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** 391: 806-811, 1998.

FISCHER-LE SAUX M. et al. 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. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 49 Pt 4, p. 1645-1656, Oct 1999.

FORST S, NEALSON K. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. **Microbiol. Rev.** 60:21-43, 1996.

FRIEDMAN DB, JOHNSON TE. A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. **Genetics** 118: 75-86, 1988.

GAUGLER R. Entomopathogenic nematology. **ACBI** Publishing, 2002.

GERRARD JG, JOYCE SA, CLARKE DJ, FFRENCH-CONSTANT RH, NIMMO GR, LOOKE DF, FEIL EL, PEARCE L, WATERFIELD NR. Nematode symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*. **Emerg. Infect. Dis.** 12:1562-1564, 2006.

GONNET GH, COHEN MA, BENNER SA. Exhaustive matching of the entire protein sequence database. **Science.** 1992;256:1443-1445.

HANNAY CL. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. **Nature** 172:1004, 1953.

HANNAY CL, FITZ-JAMES P. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Can. J. Microbiol.** 1:694-710, 1955.

HE M, WILDE A, KADERBHAI MA. A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. **Nucl. Acids Res.** 18:1660, 1990.

HEIMPEL AM. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. **Annu. Rev. Entomol.** 12:287-322, 1967.

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, p.40, 2008.

HUSSA EA, GOODDRICH-BLAIR H. It takes a village: Ecological and fitness impacts of multipartite mutualism. **Annual Review of Microbiology**, v.67, n. 1, p. 161-178, 2013.

INOUE H, NOJIMA H, OKAYAMA H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene** 96:23-26, 1990.

JOGLER C, SCHÜLER D. Genomics, Genetics, and Cell Biology of Magnetosome Formation. **Annu. Rev. Microbiol.** 63:501-521, 2009.

KAMITANI F. Caracterização molecular de isolados de nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis* spp. e seus simbiontes, *Photorhabdus* spp.,

- provenientes de Monte Negro, RO. 2010. 97 p. **Ph. D. thesis** (Parasitologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- KAYA HK, STOCK P. Chapter vi - techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. (Ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. London: **Academic Press**, p.281-324, 1997.
- KENYON C, CHANG J, GENSCH E, RUDNER A, TABTIANG R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. **Nature** 366: 461-464, 2006.
- KIMURA KD, TISSENBAUM HA, LIU Y, RUVKUN G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Science** 277: 942-946, 1997.
- KOPPENHÖFER HS. Bacterial symbionts of *Steinernema* and *Heterorhabditis*. **Nematol. Monogr Perspect.** 5:735-808, 2007.
- KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution** 33:1870-1874, 2016.
- LAMBSHEAD PJ. Recent developments in marine benthic biodiversity research. **Oceanis**, v.19, p. 5-24, 1993.
- LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON JD, GIBSON TJ, HIGGINS DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 23:2947-2948, 2007.
- LINNAEUS C. *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. 1 (10a ed.). Stockholm: Laurentius Salvius. pp. [1-4], 1-824, 1758.
- PARK GS. et al. Draft Genome Sequence of Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus temperata* Strain M1021, Isolated from nematodes. **Genome Announc.**, v.1, n.5, 2013.
- PEEL MM. et al, Isolation, identification, and molecular characterization of strains of *Photorhabdus luminescens* from infected humans in Australia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n.11, p. 3647-3653, Nov 1999.
- PHAN KL, SUBBOTIN SA, NGUYEN NC, MOENS M. *Heterorhabditis baujardi* sp. n. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. **Nematology** 5:367-382, 2003.
- POINAR JR, GEORGE O. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen., n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. fam.) **Nematologica** 21:463-470, 1976.
- REHBEIN P, SCHWALBE H. Integrated protocol for reliable and fast quantification and documentation of electrophoresis gel. **Elsevier**, v.110, p.1-6, 2015.
- SHI YM, BODE HB. Chemical language and warfare of bacterial natural products in bacteria-nematode-insect interactions. **Nat. Prod. Rep.** DOI: 10.1039/c7np00054e, 2018.
- SHUMAN S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. **J. Biol. Chem.**23;269(51):32678-84, 1994.
- SKERRA A. Engineered protein scaffolds for molecular recognition. **J. Mol. Recogn.** 13:167-187, 2000.

The *C. elegans* Sequencing Consortium . Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science** 282:2012-2018, 2008.

TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.76(9):4350-4, 1979.

WANG Y, HEERMANN R, JUNG K. CipA and CipB as scaffolds to organize proteins into crystalline inclusions. **ACS Synth. Biol.** 6:826-836, 2017.

WATERFIELD NR, CICHE T, CLARKE D. *Photorhabdus* and a host of hosts. **Annu. Rev. Microbiol.** 63:557-574, 2009

WHITE GF. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, v.66, n.1709, p.302-303, 1927.

WILKINSON P. et al. New plasmids and putative virulence factors from the draft genome of an Australian clinical isolate of *Photorhabdus asymbiotica*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 309, n.2, p. 136-143, 2010.

WINTER CE. The yolk polypeptides of a free-living rhabditid nematode. **Comparative biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 103, n.1, p. 189-196, 1992.

WOOD W. Introduction to *C.elegans* biology. In: Wood, W.B. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. [S.l.]: **New York: Cold Spring Harbor.**, 1988

WOODRING J, KAYA HK. Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques southern cooperative. [S.l.]: **Arkansas, Arkansas Agricultural Experiment Station Fayetteville**, p.88, (Series Bulletin), 1988.

YAN M, ROEHRL MH, WANG JY. Discovery of crystalline inclusions in *Bacillus licheniformis* that resemble parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis*. **Can. J. Microbiol.** 53:1111-1115, 2007.

YOU J, LIANG S, CAO L, LIU X, HAN R. Nutritive significance of crystalline inclusion proteins of *Photorhabdus luminescens* in *Steinernema* nematodes. **FEMS Microbiol Ecol** 55:178-185, 2005.

YOU J, HUANG J, CAO L, HAN R. Development of a Free-living Nematode *Panagrellus redivivus* in *Saccharomyces cerevisiae* with *cip* Genes. **China Biotechnology**, 31:44-52, 2011