

Tópicos Avançados em Entomologia Molecular

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular

INCT – EM – 2012.



CAPÍTULO 16

1

Nematoides Entomopatogênicos.

**Daniela Peres Almenara, Carolina Rossi, Maira Rodrigues de Camargo
Neves e Carlos Eduardo Winter.**

Laboratório de Biologia Molecular de Nematoides, Departamento de
Parasitologia – ICB – USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, 05508-900 São
Paulo SP, BRASIL. e-mail: cwinter@icb.usp.br.
<http://www.icb.usp.br/~cwinter/>.

Copyright: © 2012 [Daniela Peres Almenara, Carolina Rossi, Maira Rodrigues de Camargo Neves e Carlos Eduardo Winter]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações Iniciais.

O Filo Nematoda é um grupo numeroso e diversificado de metazoários, cujas espécies apresentam características morfológicas comuns, como o corpo alongado e cilíndrico, além da presença de um pseudoceloma (Wood, 1988). Essa aparente simplicidade morfológica esconde, no entanto, uma ampla variedade de estruturas especializadas presentes na anatomia desses animais, como por exemplo, os aparelhos bucais e as ornamentações da cutícula. Essa diversidade dentro do filo está intimamente relacionada às características biológicas e ecológicas (De Ley, 2006). Existem espécies de vida livre (terrestres e aquáticos) e parasitas, sendo as últimas encontradas tanto em hospedeiros animais (vertebrados e invertebrados) quanto em plantas. O total de espécies é estimado entre 100.000 e 1.000.000 (Lambshhead, 1993).

Dentro dessa variabilidade de nichos ecológicos, encontram-se espécies de nematoides nocivas a artrópodes, muitas delas exploradas comercialmente no controle biológico de insetos-praga. Desde o século XVII podem ser encontrados relatos da presença de nematoides no interior de insetos. Em 1602, o italiano Ulisses Aldrovando descreveu a presença de grandes vermes dentro de cadáveres de gafanhotos. As espécies de nematoides associadas a insetos encontram-se distribuídas em diferentes famílias, quatro delas com maior importância no que diz respeito à exploração econômica para controle: Mermithidae, Sphaerulariidae, Steinernematidae e Heterorhabditidae (Popiel & Hominick, 1992).

Os mermitídeos são parasitas obrigatórios de artrópodes, sendo insetos a maioria das espécies hospedeiras. As infestações por mermitídeos são letais para o inseto, no entanto o uso desses vermes para controlar insetos-praga é inviável em larga escala, uma vez que o parasitismo obrigatório impede a produção comercial em massa desses nematoides (Popiel & Hominick, 1992). Os mermitídeos são bastante dependentes de condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento, tolerando poucas alterações. Em muitas espécies, a determinação sexual é controlada por fatores ambientais, assim como a fecundidade das fêmeas, que é reduzida em situações de estresse populacional (número muito alto de indivíduos) (Hominick e Tingley, 1984). Embora na natureza existam exemplos de infestações duradouras por mermitídeos, a introdução desses vermes para o controle de vetores ou pragas agrícolas nunca apresentou resultados muito promissores. As principais experiências neste campo dizem respeito ao emprego de nematoides do gênero *Romanomermis* sp. para o controle de insetos vetores. Resultados positivos foram obtidos somente em determinadas condições de temperatura, pH e salinidade, confirmando as dificuldades em desenvolver estratégias de controle biológico em grandes áreas (Platzer, 1981).

Na família Sphaerulariidae, a espécie *Deladenus siricidicola* aparece com bastante importância no controle da vespa da madeira *Sirex noctilio*. Esta vespa cosmopolita é importante praga de áreas de reflorestamento, especialmente aquelas com predomínio de árvores do gênero *Pinus* sp. As primeiras experiências em campo foram realizadas na Austrália, aonde a presença de *S. noctilio* foi responsável pela devastação das florestas de *Pinus radiata* (Fenili e cols., 2000). Ao contrário dos mermitídeos, *Deladenus* pode ser cultivado em laboratório, em larga escala, e a infecção de larvas de *Sirex*

pode chegar a 100% nas áreas onde o nematoide é empregado (Popiel & Hominick, 1992).

As famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae compreendem os nematoides entomopatogênicos, cuja biologia, ciclo de vida e aplicações em controle biológico serão descritos, com detalhes, no decorrer deste capítulo.

Nematoides Entomopatogênicos – Heterorhabditidae e Steinernematidae.

3

O termo entomopatogênico pode ser definido como capacidade de matar ou causar patologia em insetos e é aplicado amplamente em biologia para os organismos que liberam toxinas e outras substâncias com atividade inseticida. Entre as espécies entomopatogênicas mais estudadas encontram-se os fungos que secretam substâncias ativas contra diferentes ordens de inseto e alguns aracnídeos (Ortiz-Urquiza e cols., 2010; Campos e cols., 2010; Toledo e cols., 2010). Embora os fungos sejam mais estudados e aplicados como fontes naturais de inseticidas, Nematoides Entomopatogênicos (NEPs) são os que melhor mostram a complexidade deste hábito de vida. Eles possuem diversas espécies, classificadas em dois gêneros: *Heterorhabditis* e *Steinernema*.

A origem dos NEPs remonta provavelmente ao período pré-Paleozóico (cerca de 375 milhões de anos) (Poinar, 1983) e os dois gêneros possuem histórias evolutivas independentes, que convergiram para este nicho ecológico nos tempos atuais. Postulou-se que o gênero *Heterorhabditis* evoluiu a partir de um ancestral que habitava sedimentos marinhos, enquanto o gênero *Steinernema* possuiria um ancestral terrestre (Poinar, 1993). Estudos filogenéticos baseados na sequência do gene das subunidades ribossômicas corroboram a hipótese de Poinar (1993) de que *Steinernema* e *Heterorhabditis* não possuem ancestral comum (Elsworth e cols., 2011). De acordo com a classificação em clados propostos por Blaxter e colaboradores (1998), o gênero *Steinernema* pertence ao clado IV (Tylenchina), juntamente com espécies dos gêneros *Meloidogyne* (parasitas de plantas), *Strongyloides* (parasita de vertebrados) e *Panagrolaimus* (microbívoros). *Heterorhabditis* pertence ao clado V (Rhabditia) que inclui também o nematoide-modelo *Caenorhabditis elegans*, além de espécies parasitas de vertebrados dos gêneros *Ancylostoma* e *Haemonchus*.

As distâncias taxonômicas entre os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* refletem diferenças biológicas entre os dois gêneros. Como veremos mais adiante, estes NEPs se associam simbioticamente com diferentes gêneros de bactérias e possuem particularidades em seus ciclos de vida.

A primeira descrição de um NEP no Brasil é atribuída a Lauro Travassos que, em 1927, criou o gênero *Steinernema* (Hunt, 2007). O gênero *Heterorhabditis* teve a primeira espécie brasileira (classificada como *Rhabditis humbletoni*) descrita por Pereira (1937). Neste trabalho, o autor descreve, também, o ciclo desse nematoide.

Em termos de distribuição geográfica, ambos os gêneros são cosmopolitas, havendo exemplos da recuperação de NEPs em solos de seis diferentes biomas mundiais (Neoártico, Neotropical, Paleoártico, Etíope, Oriental e Australiano) (Lawrence e cols., 2006). A prospecção de NEPs no

solo normalmente é realizada através da utilização de larvas do lepidóptero *Galleria mellonella* como isca. As larvas são expostas à amostra de solo e monitoradas quanto à infecção. Estes estudos, no entanto, normalmente limitam-se a determinar presença ou ausência dos NEPs, não se preocupando com identificação das espécies. Dados gerais apontam para uma maior abundância de steinernematídeos em regiões temperadas e heterorhabditídeos em solos tropicais e subtropicais (Popiel & Hominick, 1992; Lawrence e cols., 2006).

A maior parte do conhecimento sobre ecologia de NEPs baseia-se na extrapolação de dados obtidos em laboratório. Os principais fatores limitantes à permanência das populações de NEPs parecem ser as taxas de irradiação por luz U.V. e disponibilidade de água no solo (tolerância à dessecação) (Wilson e Gaugler, 2004). A mortalidade de NEPs também está associada à predação por ácaros e collembola (Epsky e cols., 1988; Gillmore & Potter, 1993). Estudos realizados por Wilson e Gaugler (2004) apontaram outros elementos que influenciam a distribuição dos NEPs: textura do solo, temperatura, presença de culturas agrícolas e disponibilidade de hospedeiros. A presença de cobertura vegetal rasteira ou em decomposição, favorece a proteção do solo e a manutenção da umidade, sendo esta combinação um ecossistema favorável à presença e à persistência de NEPs. No que diz respeito à presença de hospedeiros, são notadas algumas diferenças entre a prevalência de *Steinernema* e *Heterorhabditis*. Na natureza, as estratégias utilizadas pelos JIs para infectar insetos não são padronizadas. JIs de *Heterorhabditis* apresentam comportamento do tipo “cruiser”, pois vagam pela água intersticial do solo até encontrar um inseto. Já em JIs de espécies do gênero *Steinernema* é comum o comportamento de emboscada, quando o JI se posiciona de forma a interceptar um inseto que se movimenta próximo. Desse modo, *Heterorhabditis* é menos influenciado pela menor disponibilidade de hospedeiros, uma vez que busca ativamente os insetos disponíveis na área, guiados provavelmente por sinais do ambiente, recebidos por órgãos quimiotáteis (chamados anfídeos) existentes na parte anterior do corpo.

O genoma de *Heterorhabditis bacteriophora* começou a ser sequenciado em 2005. A linhagem selecionada foi TTO1, uma vez que o genoma de sua bactéria simbiote, *Photorhabdus luminescens* TTO1 já estava completo (Ciche e cols., 2006; Duchaud e cols., 2003) (ver próximo tópico). O tamanho estimado para o genoma foi de aproximadamente 112 Mb (Ciche, 2007). Sandhu e colaboradores (2006) analisaram 1246 ESTs (Expressed Sequence Tags – sequências transcritas) de *H. bacteriophora* (linhagem GPS11). Foram encontradas 417 sequências com alta similaridade as de *C. elegans*. A maioria delas (67%), no entanto, não apresentaram similaridade significativa com outras sequências depositadas em bancos de dados (Ciche, 2007).

O transcriptoma de *H. bacteriophora* TTO1 foi publicado em 2009 (Bai e cols., 2009). Foram obtidas 31.485 ESTs com alta qualidade provenientes de bibliotecas de cDNA construídas a partir de RNA de vermes adultos. Análises de bioinformática estimaram 10.886 ESTs únicas e distintas, sendo 12 delas semelhantes a genes envolvidos no fenômeno de RNAi (interferência de RNA), 22 semelhantes a genes envolvidos na via de “dauer” (forma de resistência encontrada em alguns nematoides, entre eles *C.elegans*) e 51 semelhantes a genes envolvidos em respostas de defesa do organismo e combate a diferentes formas de estresse. A comparação entre as ESTs obtidas e

sequências de outros nematoides de vida livre permitiu a identificação de 554 ESTs exclusivas de *H. bacteriophora*.

Experimentos de silenciamento parcial de transcritos através da imersão de larvas de *H. bacteriophora* em suspensão de dsRNA (RNA-dupla fita) mostraram que estes NEPs apresentam a via de RNAi completa e funcional. Foram observados fenótipos anormais em decorrência do silenciamento de diferentes genes, com penetrância de até 100% (Ciche & Sternberg, 2007).

O genoma mitocondrial de *Steinernema carpocapsae* foi concluído e publicado em 2005 (Montiel e cols., 2006). Análises comparativas com os genomas mitocondriais de outros nematoides mostraram haver maior proximidade filogenética entre as sequências de *Ascaris suum* e *C. elegans* do que com o verme *Strongyloides stercoralis*, contrariando resultados obtidos com filogenias empregando sequências de genoma nuclear.

O trabalho de Hao e colaboradores (2010) analisou transcritos de *S. carpocapsae* induzidos após contato com a hemolinfa de *Galleria mellonella*. Foram obtidas 2180 ESTs de alta qualidade e cerca de 63% das sequências únicas puderam ser alinhadas com sequências protéicas disponíveis em bancos de dados. Foram anotadas 377 sequências homólogas a sequências de *C. elegans*, 431 a *Caenorhabditis briggsae* e 75 a outros nematoides. Foram encontradas 119 sequências com funções metabólicas preditas: proteases, inibidores de proteases, lectinas, antioxidantes, proteínas de choque térmico, entre outras, fornecendo dados iniciais sobre moléculas potencialmente expressas em processos como invasão do inseto e sobrevivência à resposta imunológica.

Simbiose Nematóide – Bactéria.

Na natureza existem muitos exemplos de relações mutualistas entre bactérias e organismos eucariotos. Estudos mais aprofundados dessas ocorrências naturais de simbiose revelam uma grande complexidade que envolve diferentes sinais e vias moleculares bastante reguladas e especializadas.

O gênero de bactérias intracelulares *Wolbachia* possui espécies colonizadoras de diferentes invertebrados, incluindo insetos, crustáceos e nematoides (Paracer & Ahmadjian, 2000). Esses simbiontes são transmitidos, geração após geração, através do citoplasma do óvulo e podem afetar o hospedeiro de diferentes maneiras. Um dos fenômenos mais estudados, desencadeado pela presença de *Wolbachia* é a incompatibilidade citoplasmática (IC), que se caracteriza pela produção de descendentes aberrantes como consequência de alterações na migração dos cromossomos do espermatozóide logo após a fertilização. As aberrações se caracterizam principalmente pela eliminação dos cromossomos paternos, gerando embriões haplóides, muitas vezes inviáveis (Stouthamer e cols., 1999). A IC induzida pela presença de *Wolbachia* pode ser verificada em espécies de insetos de diferentes ordens (Paracer & Ahmadjian, 2000; Sinkins, 2004) e também em ácaros e isópodes (Stouthamer e cols., 1999).

Outro exemplo bastante conhecido é a interação entre bactérias do gênero *Buchnera* e afídeos (Baumann e cols., 1995). Todas as espécies conhecidas de afídeos abrigam-nas no citoplasma de suas células, em uma simbiose obrigatória para ambas as espécies envolvidas (Paracer & Ahmadjian,

2000). Estes endossimbiontes são responsáveis por vias de síntese de alguns aminoácidos e vitaminas utilizados pelo metabolismo dos insetos, tornando-os dependentes dos procariontes para completar seu desenvolvimento com sucesso. *Buchnera* possui o ciclo de vida adaptado a acompanhar o do afídeo, apresentando taxas muito lentas de crescimento e apenas uma cópia do gene de RNA ribossômico, ao contrário da maioria das bactérias, que o apresentam em múltiplas cópias (Baumann e cols., 1995).

Simbiontes bacterianos também são especialmente conhecidos por suas funções digestórias. Inúmeras espécies animais apresentam uma dieta baseada na capacidade de produção enzimática dos microorganismos colonizadores do seu trato gastrointestinal. A maioria dos mamíferos herbívoros, por exemplo, possui bactérias anaeróbias em seu trato digestório, responsáveis por fermentar fibras vegetais e degradar a celulose das paredes celulares, permitindo o aproveitamento de aminoácidos e ácidos graxos (Paracer & Ahmadjian, 2000). Além disso, a microbiota colonizadora do trato gastrointestinal possui funções relacionadas à imunidade e secreção de metabólitos secundários. Recentemente, foi mostrado que bactérias do gênero *Wigglesworthia* são indispensáveis para a resposta imune da mosca tsé-tsé *Glossinia morsitans* (Weiss, 2011). Moscas adultas que não possuem a bactéria apresentam grande comprometimento das respostas imunológicas celular e humoral frente à infecções-desafio com diferentes microorganismos, além de reduzir a expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos e moléculas sinalizadoras do sistema imune.

Nematoides entomopatogênicos apresentam um tipo de simbiose bastante específica: os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* são colonizados, exclusivamente, por bactérias dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, respectivamente.

Trata-se de uma associação não-obrigatória para os procariontes. Tanto *Photorhabdus* quanto *Xenorhabdus* podem ser cultivadas livres do nematoide, em condições laboratoriais adaptadas dos meios tradicionais de cultivo de enterobactérias, como *Escherichia coli*.

Culturas axênicas (sem as bactérias simbiontes) de *Steinernema* e *Heterorhabditis* são viáveis em meio sintético e podem ser obtidas em larga escala com o uso de fermentadores ou meio sólido (Isláz-Lopez e cols., 2005; Bedding, 1984).

O sistema *Heterorhabditis-Photorhabdus* é bastante restritivo. Uma espécie de nematoide apresenta como simbiote sempre e somente uma única linhagem daquela espécie de bactéria. No caso do par *Steinernema-Xenorhabdus*, a especificidade é menor: diferentes espécies de nematoide podem apresentar a mesma espécie de bactéria simbiote (Forst & Clarke, 2002).

Durante o ciclo de vida dos NEPs, os simbiontes bacterianos apresentam um papel fundamental: matar o inseto e permitir que o nematoide se alimente no cadáver, além de controlar o microecossistema estabelecido, impedindo a infecção por outros microorganismos. As bactérias entomopatogênicas possuem um extenso repertório de genes envolvidos na produção de toxinas e metabólitos secundários. Acredita-se que estas moléculas sejam responsáveis por garantir tanto o processo de patogenicidade para o inseto quanto o reconhecimento pelo nematoide e a manutenção da simbiose (Clarke, 2008).

Photorhabdus luminescens e *Xenorhabdus nematophila* são as espécies mais estudadas dentro dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*. Embora apresentem comportamentos semelhantes dentro do ciclo de vida dos NEPs, algumas características fenotípicas diferem entre estas duas espécies de bactérias. A maioria das linhagens de *P. luminescens* é bioluminescente, propriedade observada devido à presença de todos os genes do operon *lux*, codificadores de uma luciferase, semelhante ao que ocorre nos microorganismos marinhos bioluminescentes (Paracer & Ahmadjian, 2000). *P. luminescens* também sintetiza um pigmento do tipo antraquinona e antibióticos da classe dos estilbenos (Brachmann e cols., 2007; Joyce e cols., 2008). *Xenorhabdus nematophila* não apresenta bioluminescência nem síntese de pigmentos, e seus metabólitos secundários são antibióticos de diferentes classes: xenocumarinas e xenorhabdinas. Outras características bioquímicas também diferem entre elas: algumas linhagens de *P. luminescens* possuem atividade de catalase e urease, ausentes em *X. nematophila*.

As diferenças entre os dois pares de simbiontes também podem ser notadas na maneira de colonização do hospedeiro nematoide pela bactéria: *Heterorhabditis* retém as bactérias na porção anterior do intestino (2/3 iniciais) enquanto *Steinernema* possui um divertículo intestinal especializado para abrigar as células de *Xenorhabdus*.

O genoma de *Photorhabdus luminescens* (linhagem TT01) foi completamente sequenciado. Possui aproximadamente 5,6 Mpb, com conteúdo de GC ao redor de 42%. Foram anotados 4389 genes que codificam proteínas, incluindo um número muito grande de toxinas, maior que o de outras bactérias patogênicas descritas. Muitas destas toxinas são secretadas, responsáveis provavelmente pela morte do inseto parasitado (Duchaud e cols., 2003). Também, graças à análise do genoma, foram detectados 22 genes que codificam policetídeo sintases (PKSs), peptídeo sintases não-ribossômicas (NRPSs) e quimeras dessas duas enzimas, que, em outras bactérias, já foram caracterizadas como componentes de vias de síntese de moléculas com atividade antibiótica (McDaniel e cols., 1999; Fischbach e Walsh, 2006). No total, 6% do genoma parece estar envolvido na biossíntese de pequenas moléculas bioativas, derivadas do metabolismo dessas enzimas. Esses dados são bastante significativos; o gênero *Streptomyces*, uma fonte clássica de moléculas antibióticas, por exemplo, tem apenas 3% do genoma relacionado à biossíntese de metabólitos deste tipo (Clarke, 2008). Também já foram sequenciados os genomas das espécies *P. asymbiotica* e *P. temperata* (Duchaud e cols., 2003; Wilkinson e cols., 2009; Wilkinson e cols., 2010).

As primeiras toxinas de *Photorhabdus* caracterizadas (toxinas Tc e Mcf) são exemplos de proteínas envolvidas no controle da resposta imunológica do inseto infectado, através da indução de apoptose nas células do sistema imune. Essa propriedade tóxica também foi verificada em células de mamíferos (Waterfield e cols., 2001; Daborn e cols., 2002; Au e cols., 2004; Dowling e cols., 2004, Waterfield e cols., 2005). Os trabalhos de Brugirard-Ricaud e cols. (2004a, 2004b) caracterizaram a proteína efetora LopT, capaz de impedir processos fagocíticos fundamentais para o estabelecimento de uma resposta imunológica completa por parte do inseto hospedeiro. Além disso, bactérias do gênero *Photorhabdus* produzem compostos que inibem a enzima fosfolipase A2 do inseto infectado. Esta enzima está envolvida na biossíntese de eicosanóides reguladores da resposta imunológica celular (Kim e cols., 2005;

Stanley, 2006).

Infecções artificiais (injeção direta da bactéria, na hemolinfa) realizadas em *Manduca sexta* mostram que *Photorhabdus* se multiplica inicialmente no intestino médio e na hemolinfa das larvas e, mais tardiamente, no corpo gorduroso e outros tecidos. No intestino médio, as células da bactéria ocupam uma região bastante específica, entre a matriz extracelular e a lâmina basal do epitélio. Neste nicho, as bactérias produzem a toxina TcA (Toxin Complex A), ativada no próprio intestino e uma metaloprotease denominada PrtA (Daborn e cols., 2001; Silva e cols., 2002; French-Constant e cols., 2003). Também já foi demonstrado, *in vitro*, que uma proteína termo-estável secretada por *Photorhabdus* é capaz de inibir a fagocitose realizada por hemócitos de *M. sexta*. Esta proteína ainda não foi completamente caracterizada (Daborn e cols., 2001; Silva e cols., 2002; French-Constant e cols., 2003).

Outras moléculas, muitas vezes não-proteicas, são produzidas por *Photorhabdus* e podem representar fatores de virulência ativos na infecção do inseto. Quando o meio de cultura condicionado pelo crescimento de *Photorhabdus* sp. é submetido à extrações com solventes orgânicos, algumas frações apresentam atividade inibitória da enzima fenoloxidase e do processo de formação de nódulos e melanização, importantes na resposta imunológica do inseto (Eleftherianos e cols., 2007). Derzelle e colaboradores (2002) identificaram e caracterizaram um grupo de genes envolvidos na biossíntese de um antibiótico β -lactâmico do grupo dos carbapenemos, comumente empregados contra bacilos gram-negativos, cocos gram-positivos e microorganismos anaeróbios (Bradley e cols., 1999). A biossíntese de antibióticos, provavelmente evita que outras espécies de bactérias infectem o cadáver colonizado por *Photorhabdus*. Também foi demonstrada a biossíntese de um pigmento do tipo antraquinona (Brachmann e cols., 2007). É o primeiro exemplo de biossíntese de antraquinonas por bactérias gram-negativas. Ainda não é conhecida a função desse pigmento em *P. luminescens*, mas a molécula apresenta uma atividade antimicrobiana fraca.

O gênero *Photorhabdus* também apresenta vias de síntese de estilbenos. O locus gênico relacionado a essa via de síntese encontra-se presente em diferentes linhagens analisadas (Joyce e cols., 2008). Estilbenos são moléculas sintetizadas normalmente por plantas, e possuem efeitos biológicos variados, tais como: antibióticos (Willians, 2005), antiinflamatórios (Kim e cols., 2008), antitumorais (Surth, 2003; Cao e cols., 2008) e neuroprotetores (Orhan e cols., 2008). Entre os estilbenos mais conhecidos está o resveratrol, encontrado na casca da uva. Esta molécula apresenta efeitos bastante benéficos para a saúde humana e sua possível biossíntese por organismos procaríotos representaria uma importante conquista para o emprego biotecnológico e farmacêutico desta molécula (Ulrich, 2005; Katsuyama e cols., 2008). Recentemente, a molécula 3,5-dihidroxi-4-isopropilestilbeno (a mesma isolada de *Photorhabdus*) teve atividade antiinflamatória caracterizada e sua aplicação no combate à psoríase é objeto de uma patente (WELICHEM BIOTECH, INC./US Patent 2005/0059733 A1).

O genoma de *Xenorhabdus nematophila* (ATCC 19061) já está completo (cerca de 4,43 Mpb) e as sequências obtidas encontram-se em fase de análise e anotação (NCBI, GenBank, número de acesso FN667742). Foram preditos 4298 genes codificadores de proteínas, um número semelhante ao encontrado para *P. luminescens*. Também foi sequenciado o DNA plasmidial encontrado

nessa mesma linhagem de *X. nematophila* (NCBI, GenBank, número de acesso FN667743). Trata-se de um plasmídeo com 155.327 nucleotídeos, com estimativa de 175 genes codificadores de proteínas.

Análises funcionais já permitiram a identificação de genes de *X. nematophila* possivelmente relacionados à sua simbiose com *S. carpocapsae*. Heugens e colaboradores (2002) caracterizaram mutantes de *X. nematophila* com menor capacidade de infectar e estabelecer associação com *S. carpocapsae*, uma vez que apresentavam até 15 vezes menos colonização do divertículo intestinal dos vermes. Foram identificados 15 loci gênicos mutados. As ORFs caracterizadas encontraram similaridade em banco de dados com genes codificadores de proteínas regulatórias, proteínas das vias de biossíntese de aminoácidos e proteínas de membrana. Três destes genes: *nilA*, *nilB* e *nilC* (*nematode intestine localization*) tiveram sua função caracterizada. São sequências geneticamente ligadas que coordenam, regulam e codificam proteínas de membrana fundamentais para a colonização do nematoide hospedeiro (Goodrich-Blair, 2007). Homólogos de *nilB* estão presentes em bactérias patogênicas que colonizam mucosas, como *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* e codificam lectinas que facilitam a interação das células com o ambiente mucoso.

Também já foram caracterizadas toxinas produzidas por *Xenorhabdus*. Brown e colaboradores (2003) identificaram uma proteína de 42 kDa, tóxica para insetos. Quando expressa em sistema recombinante, esta toxina (Tc) provocou a morte de larvas de *G. mellonella* e *Helicoverpa armigera* nas doses de 30 a 40 ng/g. *X. nematophila* também secreta para o meio de cultura um peptídeo citotóxico (xenorhabdolisina : C1-Xax), indutor de lise celular nos insetos e de hemólise de glóbulos vermelhos em mamíferos (Ribeiro e cols., 2003). O complexo de toxinas secretadas inclui, ainda, a proteína Xpt, também com atividade inseticida (Sergeant e cols., 2006). Estas proteínas matam os insetos quando injetadas artificialmente, liberadas durante a infecção com NEPs ou administradas via oral (Herbert & Goodrich-Blair, 2007). Toxinas do tipo Tc e C1 são encontradas também em bactérias patogênicas dos gêneros *Pseudomonas* e *Yersinia*, mas suas funções ainda não foram completamente elucidadas. Trabalhos realizados com *Y. pestis* sugerem a necessidade de Tc para a colonização do intestino das pulgas (Parkhill e cols., 2001).

Xenorhabdus também produz metabólitos secundários, incluindo pigmentos e antibióticos de amplo espectro, como *Photorhabdus* (Gaugler e Kaya, 1990). No genoma de *X. nematophila* e também no genoma de *X. bovienii* foram encontrados diferentes agrupamentos de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários, de diferentes classes, desde moléculas mais simples como cetonas e amidas até compostos mais complexos como xenocumarinas (antibióticos) e outros produtos derivados também da ação de enzimas do tipo PKS/NRPS (Bode, 2009).

Ciclo de Vida.

Os NEPs apresentam, durante seu ciclo de vida, uma forma larval de resistência conhecida como Juvenil Infectante (JI), encontrada livre no solo. Este JI possui duas cutículas superpostas e seus orifícios naturais (boca e ânus) encontram-se fechados, de forma a evitar dessecação e conferir maior tempo de sobrevivência. Dentro de seu tubo digestivo, os JIs carregam uma

monocultura de bactérias. Como já discutimos acima, estas bactérias pertencem a uma única espécie (uma para cada espécie de nematoide) e permanecem com crescimento e metabolismo controlado dentro do intestino do JI, até que este encontre um inseto para infectar. Os JIs infectam este inseto adulto ou larva, penetrando em orifícios como boca, ânus ou espiráculos ou ainda perfurando regiões menos resistentes do exoesqueleto. Algumas espécies de NEPs possuem um dente córneo na região anterior do corpo que facilita a penetração. Uma vez no hemoceloma (principal cavidade do corpo do inseto), os JIs liberam as bactérias neles contidas, iniciando uma infecção. Essas bactérias rapidamente matam o inseto (normalmente entre 24 e 48 horas -Ciche & Ensign, 2003) e iniciam um processo chamado bioconversão do cadáver, caracterizado pela proliferação intensa de bactérias e secreção de metabólitos secundários, toxinas e exoenzimas. As bactérias são, isoladamente, as responsáveis pela morte do inseto: quando inoculadas artificialmente, são necessárias menos de 10 células (CFU = colony forming unit; unidade formadora de colônia) para atingir a dose letal para 50% dos insetos ($LD_{50} < 10$) (Milstead, 1979). Além disso, nematoides livres de suas bactérias simbiotes são muitíssimas vezes menos eficientes para ocasionar a morte do seu hospedeiro (Han e Ehlers, 2000).

Quando cultivadas em meio artificial, *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* produzem e secretam diferentes proteases, lipases, quitinases e lecitinases, especialmente durante a fase pós-exponencial de sua curva de crescimento (Akhurst & Boemare, 1990; Thaler e cols., 1998).

O ciclo de vida de NEPs do gênero *Steinernema* (Nguyen e Smart, 1992) pode ser descrito a partir da entrada do JI no inseto. Essa penetração ocorre através da boca ou dos espiráculos do organismo invadido. O JI chega até o hemoceloma, onde libera as bactérias. Ele então retoma seu desenvolvimento e se alimenta ativamente das bactérias que estão se multiplicando no cadáver. Os juvenis crescem e mudam, dando origem aos adultos de primeira geração (machos ou fêmeas). Havendo machos e fêmeas no mesmo cadáver, ocorre a cópula. Inicialmente, os ovos fertilizados são postos e, mais tarde, alguns são retidos no interior do abdômen da fêmea até a eclosão dos juvenis de estágio 1 (J1), quando rompem a parede do corpo da mãe e atingem também o inseto, onde vão se alimentar. Alguns J1 vão mudar para o estágio J2 e, mais tarde, vão se transformar em JI (J3 infectantes), retendo a cutícula do estágio anterior. Outros J1 vão completar o ciclo de desenvolvimento, passando por J2, J3, J4 e adultos de segunda geração, que são menores que os de primeira geração. Estes adultos copulam e novos ovos e juvenis são liberados. Quando os recursos alimentares se esgotam, estes ciclos de reprodução cessam e os JIs migram para o ambiente, onde permanecem até encontrarem outro inseto e reiniciar o ciclo.

O ciclo de *Heterorhabditis* (**Figura 1; Figura 2**) é muito semelhante ao de *Steinernema*, porém os vermes adultos de primeira geração são hermafroditas com morfologia de fêmeas (Poinar, 1990). Essas “fêmeas hermafroditas” são protândricas, ou seja, possuem gônadas que primeiro produzem espermatozoides que ficam armazenados na espermateca a espera dos ovócitos que irão então ser produzidos. As infecções de um inseto por *Heterorhabditis* podem ter sucesso mesmo quando há penetração de um único JI, pois não há necessidade de cópula entre adultos de primeira geração para a produção de ovos fertilizados. Ao contrário do que ocorre em *Steinernema*, os

J1 de *Heterorhabditis* não precisam utilizar orifícios naturais do inseto para penetração. A presença de um dente córneo permite que os JIs perfurem a cutícula do inseto, especialmente nas regiões mais finas e flexíveis, como entre os segmentos apendiculares. (Forst & Clarke, 2002). Há, também, no ciclo de *Heterorhabditis*, predominância do fenômeno de Endotoquia Matricida, quando os ovos eclodem no interior do corpo da mãe e os juvenis rompem a parede para serem liberados, matando a fêmea ou o hermafrodita. A partir da segunda geração de *Heterorhabditis* surgem machos e fêmeas e a reprodução agora ocorre por fertilização cruzada entre eles.

Os nematoides do estágio J1 retêm sempre um inóculo de bactéria em seu intestino, e são liberados para o meio externo, onde permanecem até nova infecção. Trabalhos recentes com *Heterorhabditis* indicam que a transmissão de bactérias para as formas juvenis ocorre a partir das bactérias do intestino das fêmeas hermafroditas. As bactérias atravessam as células intestinais do corpo da fêmea e ficam disponíveis para os juvenis recém-eclodidos. Desse modo, pode-se dizer que o fenômeno da endotoquia matricida é responsável por garantir que somente as bactérias simbiotas sejam transferidas para a prole (Ciche e cols, 2008). Nas gerações seguintes, a proliferação exclusiva da bactéria simbiote é controlada pela secreção de toxinas e metabólitos secundários.

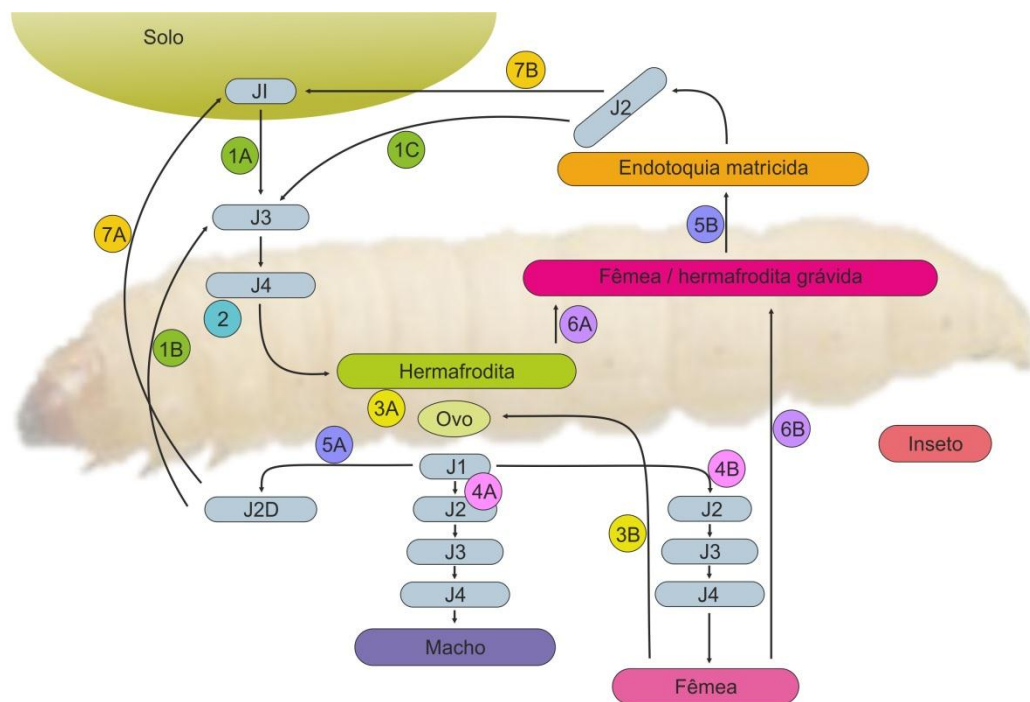


Figura 1. Ciclo de vida detalhado de *Heterorhabditis* sp. Os números abaixo correspondem a passos-chave do ciclo indicados na figura. 1: Recuperação do Juvenil Infectante (JI) a partir do estágio de vida livre (1A); estágio de pré-dauer (J2d) que se originam de ovos postos (1B) ou da endotoquia matricida (1C); 2: Desenvolvimento da hermafrodita; 3: Postura de ovos pela hermafrodita autofecundada (3A) ou da fêmea fecundada por macho (3B); 4: Desenvolvimento do macho (4A) e da fêmea (4B). 5: Formação do JI a partir de ovos (5A) ou da endotoquia matricida (5B); 6: Endotoquia matricida da

hermafrodita (6A) ou da fêmea (6B);7: Migração do JI originário de ovos (7A) ou de endotoquia matricida (7B). (modificado de Ehlers, 2001).

12

A regulação do ciclo de vida, em ambos os gêneros, ainda não foi completamente elucidada. Experimentos *in vivo* (em insetos) realizados por Han e Ehlers (2000) mostraram que JIs de *Steinernema* e *Heterorhabditis* podem se desenvolver em adultos mesmo na ausência das bactérias simbiotes, sugerindo que o fator regulador está na hemolinfa do inseto ou é produzido pelo próprio verme. O crescimento da população de nematoides e a continuidade do ciclo de vida por várias gerações, no entanto, parecem ser regulados por metabólitos de origem bacteriana e pela presença das células em si, que servem como fonte de alimento. Trabalhos realizados *in vivo* e *in vitro* mostraram que a presença das bactérias é fundamental para a recuperação de um grande número de JIs tanto do cadáver do inseto quanto de meio artificial de cultura (Grewal e cols., 1997; Strauch & Ehlers, 1998).

Strauch e Ehlers (1998) propuseram a secreção, pelas bactérias, de “food signals” (sinais de alimento), ativamente secretados por *Photorhabdus* na fase exponencial tardia de sua curva de crescimento, quando a bioconversão do cadáver já se encontra avançada. A presença deste sinal, somente nesta fase, sugere a regulação em estádios tardios do desenvolvimento do nematoide e não apenas na recuperação de JIs.

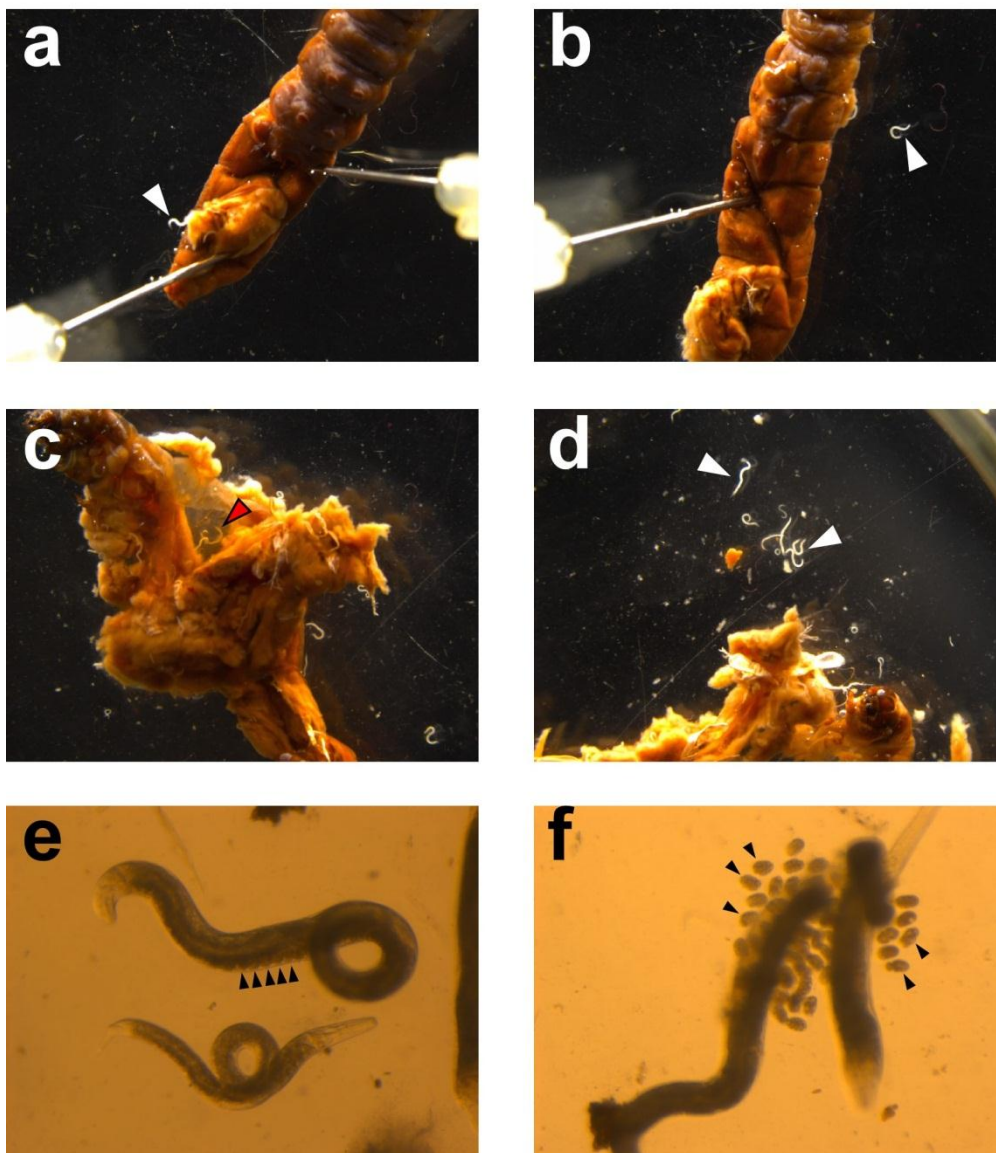


Figura 2. Abertura de um cadáver de *Galleria mellonella* infectado, para retirada de adultos hermafroditas de *Heterorhabditis baujardi* LPP7. (a), (b), (c) e (d) retirada dos adultos (mostrados pelas cabeças de flechas); (e) adultos de *H. baujardi* LPP7 com e sem ovos (mostrados pelas cabeças de flechas); (f) adultos aberto para mostrar os ovos em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário (cabeças de flechas).

Interação com o Sistema Imunológico do Inseto.

Imediatamente após a penetração dos JIs na hemolinfa, o sistema imunológico do inseto precisa lidar somente com a presença do nematoide, até que ele libere suas bactérias simbiotes. Em alguns casos, a liberação das bactérias ocorre até 6 horas após a infecção (com espécies do gênero *Steinernema*) e em cerca de 30 minutos nas infecções com *Heterorhabditis* (Li e cols., 2009). Os nematoides podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico do inseto, sofrendo então um processo conhecido como encapsulamento. Trabalhos realizados com diferentes espécies de inseto das ordens Orthoptera, Coleoptera, Lepidoptera e Diptera mostraram a presença de encapsulamento e melanização (deposição do pigmento melanina) como resposta à infecção por NEPs (Dowds & Peters, 2002).

NEPs podem resistir à resposta de encapsulamento e melanização através de três mecanismos principais: evasão, tolerância e supressão.

A evasão se caracteriza pelo não reconhecimento do nematoide pelas defesas do inseto. A tolerância é a capacidade de alguns nematoides escaparem do encapsulamento como resultado de uma infecção com número elevado de indivíduos: quando muitos JIs invadem o mesmo inseto, o sistema imunológico acaba sobrecarregado, permitindo que alguns JIs escapem e liberem as bactérias. Na supressão, proteínas de superfície dos nematoides permitem a modulação da resposta imunológica do inseto, como veremos mais adiante.

Nematoides parasitas de mamíferos apresentam proteínas de superfície conhecidas como SCPs (Surface Coat Proteins), que interferem diretamente com o hospedeiro, regulando seu sistema imunológico. Estas proteínas incluem glutathione-peroxidases, superóxido dismutases, glutathione S-transferases, peroxi-redoxinas e serpinas (Maizels e cols., 2001).

SCPs de nematoides entomopatogênicos também se encontram relacionadas à repostas de supressão e evasão frente à imunidade do inseto. SCPs obtidas de *Steinernema glaseri* (NC) são capazes de suprimir, de forma dose-dependente, a resposta imunológica de larvas de *Exomala orientalis* (Coleoptera) tanto na infecção com esta mesma espécie de nematoide (*S. glaseri*) quanto com *Heterorhabditis bacteriophora* (Li e cols., 2009). A composição das SCPs varia muito entre diferentes espécies e até mesmo entre diferentes linhagens de NEPs e a capacidade protetiva destas proteínas contra a melanização e o encapsulamento depende da suscetibilidade inicial da larva infectada a cada uma das espécies/linhagens. As SCPs de *S. glaseri* protegem *H. bacteriophora* na infecção de *E. orientalis*, mas não conferem esta proteção se o inseto infectado for, por exemplo, o lepidóptero *Manduca sexta* (Li e cols., 2007).

Uma vez liberadas as bactérias simbiotes, o sistema imunológico do inseto passa a enfrentar um tipo diferente de organismo, com estratégias alternativas de escape. Patógenos bacterianos possuem duas estratégias principais para escapar da resposta imunológica de seus hospedeiros: evitar ou impedir a sua detecção ou suprimir diretamente a ativação do sistema imune (Vallet-Gely e cols., 2008). Espécies do gênero *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* são capazes de escapar tanto da ação de peptídeos antimicrobianos quanto da ação de

fagócitos presentes no hemoceloma dos insetos. Essas bactérias interferem na atividade de fagócitos bloqueando a produção de metabólitos de ação bacteriostática e também produzem toxinas capazes de destruir os hemócitos ativamente (Eleftherianos e cols., 2009. Daborn e cols., 2002).

Lipopolissacarídeos (LPS) de membrana extraídos de espécies de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* inibem a ativação de importantes vias imunológicas dos insetos, como a cascata de pro-fenoloxidase. Esta cadeia enzimática, quando ativa, promove a morte dos NEPs (Dowds & Peters, 2002).

Além dos fatores relacionados ao controle da resposta imune, *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* produzem compostos com amplo espectro de atividade biológica: antibióticos, antifúngicos, bacteriocinas, proteases, lipases e lipopolissacarídeos. A presença destes compostos impede a colonização do cadáver do inseto por outras espécies bacterianas existentes no ambiente e atuam bioconversão. (Bode e cols., 2009).

Controle Biológico.

A propriedade dos nematoides entomopatogênicos de infectar diferentes ordens de insetos despertou grande interesse da comunidade científica para uma possível aplicação no controle biológico de pragas, principalmente aquelas cujo estágio larval ocorre no solo. Desde a década de 30, os NEPs são estudados e explorados no controle de pragas agrícolas. Os primeiros relatos contam a experiência da utilização de NEPs no combate ao escaravelho-japonês, ou besouro-japonês *Popillia japonica*, uma importante praga de gramados e plantas ornamentais. No entanto, somente na década de 70 é que os experimentos com NEPs e controle biológico de pragas e vetores aumentaram. Os melhores resultados foram obtidos em insetos que possuem ao menos uma fase do seu desenvolvimento na superfície do solo ou em galerias.

Atualmente, existem empresas especializadas na produção em massa de NEPs e de formulações prontas para a aplicação. Um dos estudos mais recentes envolvendo a aplicação de NEPs no campo diz respeito ao controle de uma larva de mariposa que ataca culturas de amêndoas. A espécie de nematoide empregada é *Steinernema carpocapsae*, abundante na América do Norte e a eficiência obtida foi bastante significativa, atingindo até 78% de morte para larvas e pupas (Chambers e cols., 2010). Também recentemente, verificou-se sucesso no emprego de NEPs para o controle de um besouro praga de palmeiras (Dembilio e cols., 2010) e outro que ataca culturas de cerejas e maçãs (Pereault e cols., 2009). Fatores como a redução do emprego de pesticidas são importantes argumentos a favor do emprego de NEPs em controle biológico. No entanto, o alto custo de produção e aplicação restringe esse uso a culturas de alto valor comercial como algumas frutas (Gaugler, 2002) (**Tabela 1**). No Brasil, uma das iniciativas de sucesso foi o emprego de juvenis infectantes de *H. indica* no controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), uma praga de milho (Garcia e cols., 2008). Análises conduzidas no campo mostram que esta espécie de NEP encontrada no Brasil produz resultados semelhantes àqueles decorrentes do controle utilizando *Steinernema*, embora no caso de *Heterorhabditis* as quantidades de JIs aplicadas sejam maiores. Também já foram conduzidos experimentos com *Heterorhabditis* spp. para o controle do “bicho da goiaba” (*Conotrachelus*

TABELA 1

Utilização de Nematoides Entomopatogênicos no Controle de pragas.

NEP	Artrópode-praga (nome científico)	Artrópode-praga (nome popular)	Cultura agrícola/ animal afetado	Referência
S. <i>carpocapsae</i> ; S. <i>riobrave</i>	<i>Synanthedon exitiosa</i>	Broca do Pessegueiro	<i>Prunus</i> sp. (Pêssegos, Ameixa, Nectarina, Cereja)	Cottrell & Shapiro-Ilan, 2006
S. <i>carpocapsae</i> ; H. <i>downesi</i>	<i>Hylobius abietis</i>	Gorgulho do Pinheiro	Pinheiros	Girling <i>et al.</i> , 2010.
H. <i>marelatus</i> ; S. <i>krausseii</i> ; S. <i>carpocapsae</i>	<i>Cydia latiferreana</i>	Lagarta	Avelãs, Amêndoas	Bruck & Walton, 2007.
S. <i>carpocapsae</i>	<i>Hedypathes betulinus</i>	Broca da erva-mate	Erva-mate	Alves <i>et al.</i> , 2009.
S. <i>riobrave</i>	<i>Anthonomus grandis</i>	Besouro bicudo	Algodão	Cabanillas, 2002.
H. <i>bacteriophora</i> ; H. <i>spp.</i>	<i>Dysmicoccus texensis</i>	Colchonilha da Raiz do Cafeeiro	Café	Alves <i>et al.</i> , 2009.
H. <i>indica</i> ; H. <i>sp.</i> ; S. <i>carpocapsae</i>	<i>Bradysia mabiusi</i>	Mosca-dos-fungos	Viveiros de sementes, Cogumelos, Soja, Eucalipto, entre outros	Leite <i>et al.</i> , 2007.
S. <i>carpocapsae</i> ; S. <i>riobrave</i> ; S. <i>feltiae</i> ; H. <i>amazonensis</i>	<i>Mahanarva sp.</i>	Cigarrinha	Cana-de-açúcar, Pastagens	Leite e cols.; 2003
S. <i>carpocapsae</i> ; H. <i>indica</i> ;	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Besouro perfurador de raiz	Diferentes cultivares	Shapiro-Ilan <i>et al.</i> ; 2010
S. <i>carpocapsae</i> ; H. <i>indica</i> ;	<i>Aethina tumida</i>	Pequeno escaravelho de colméias	Colméias	Shapiro-Ilan <i>et al.</i> ; 2010
S. <i>carpocapsae</i> ; S. <i>riobrave</i>	<i>Conotrachelus nenuphar</i>	Gorgulho da ameixa	Diferentes árvores frutíferas	Shapiro-Ilan <i>et al.</i> ; 2008
S. <i>carpocapsae</i> ; S. <i>riobrave</i> ; H. <i>bacteriophora</i>	<i>Cydia pomonella</i>	Traça da maçã	Macieiras	Lacey & Unrui; 1998

psidii), uma larva de besouro responsável por grande prejuízo econômico na produção dessa fruta (Dolinski e cols, 2006). (Tabela 1).

Seleção e Melhoramento.

Estratégias de controle biológico somente são bem-sucedidas se forem precedidas de um planejamento correto, baseado essencialmente em dados da biologia e da ecologia tanto da espécie usada como agente de controle como na espécie alvo a ser controlada. No caso específico dos NEPs, fatores como a virulência das linhagens infectantes, o espectro de hospedeiros suscetíveis, e as taxas de tolerância e sobrevivência aos fatores ambientais são importantes para a delimitação de uma estratégia de sucesso.

Como já comentado anteriormente, a facilidade de obtenção de novos isolados de NEPs, bem como de suas bactérias simbiotes, acarreta quase sempre somente na catalogação da ocorrência desses vermes em uma determinada área. São poucos os casos aonde há uma identificação correta da espécie ou mesmo a caracterização biológica da linhagem. No entanto, estudos visando caracterizar a variabilidade dos isolados de NEPs estão aumentando à medida que o controle biológico vem se firmando como estratégia importante, principalmente na agricultura. As diferenças biológicas encontradas nas linhagens naturais estão permitindo a manutenção de isolados com características cada vez mais adequadas às condições específicas de cada aplicação.

Além de aproveitar a variabilidade natural para a seleção de NEPs mais virulentos e resistentes, já está sendo empregado melhoramento genético das linhagens. O trabalho de Glazer e colaboradores (1991), por exemplo, mostrou ser possível a seleção, através de cruzamentos direcionados, de *H. bacteripophora* com maior resistência ao estresse causado pela exposição à radiação U.V. Atualmente, as linhagens de *S. carpocapsae* utilizadas em projetos de controle biológico foram selecionadas em laboratório de modo a favorecer a predominância de indivíduos mais eficazes na busca pelo hospedeiro e com maiores taxas de fecundidade e reprodução (Tomalak, 1994).

Outra estratégia de melhoramento das linhagens de NEPs é a recuperação, em laboratório, de características típicas de linhagens recém-isoladas. Isolados mantidos em cultivo artificial por longo período de tempo podem deixar de apresentar certas características fenotípicas, especialmente aquelas relacionadas ao parasitismo e virulência. No entanto, a manutenção em laboratório por longos períodos é fundamental para a obtenção de dados mais completos sobre biologia, ecologia, comportamento, entre outras características da linhagem a ser empregada no campo. Experimentos utilizando *S. carpocapsae* mostraram que é possível, através de cruzamentos direcionados, recuperar características “selvagens” nas linhagens cultivadas, recuperando seu potencial infectivo e fitness reprodutivo (Chaston e cols., 2011).

Um terceiro ramo do melhoramento de NEPs é a aquisição de linhagens geneticamente modificadas. Esta possibilidade ainda se encontra em fase muito inicial de pesquisa e se limita principalmente à obtenção de dados sobre

virulência e simbiose utilizando organismos-modelo como o nematoide *Caenorhabditis elegans* e a bactéria *Escherichia coli*. Muitos genes bacterianos relacionados à virulência de infecções já foram caracterizados utilizando-se *C. elegans* como modelo, como no caso das infecções por *Pseudomonas aeruginosa* (Mahajan-Miklos e cols., 1999) e *Salmonella typhimurium* (Labrousse e cols., 2000). Também fatores de virulência de *P. luminescens* já foram estudados no modelo de *C. elegans* e são responsáveis por alterar a sobrevivência, o desenvolvimento, a reprodução e o comportamento deste nematoide (Sicard e cols., 2007).

Tomados em conjunto, dados obtidos através da comparação com organismos modelo (genes semelhantes, vias metabólicas semelhantes, etc.) ou através da reprodução de processos naturais (infecções artificiais, expressão recombinante de proteínas, etc.) permitem definir alvos moleculares que podem ser modificados geneticamente. Essas modificações podem, então, ser introduzidas no genoma de forma a melhorar linhagens de NEPs e bactérias antes de aplicá-las contra um determinado artrópode.

Produção e Segurança.

Nos últimos anos, o cultivo de NEPs em escala comercial sofreu um significativo avanço. Atualmente, é possível obter esses nematoides em condições de competir com os custos do controle biológico através de inseticidas químicos nas culturas de maior valor agregado. Também há grande adesão à tecnologia de emprego de NEPs por parte da chamada “agricultura sustentável”, que objetiva diminuir impactos ambientais.

Para fins de aplicação, os NEPs podem ser produzidos em grandes quantidades tanto *in vivo* quanto *in vitro*. No caso das infecções *in vivo*, o inseto mais utilizado é *Galleria mellonella*, que apresenta um rendimento de $0,5 \times 10^5$ – 4×10^5 JIs por larva infectada, dependendo da espécie de nematoide (Grewal e cols., 2001)(**Figura 3**). Esta técnica foi empregada para a obtenção das primeiras produções em massa de *S. carpocapsae*, nos Estados Unidos (Dukty, 1964). Trata-se de uma técnica de alto custo e não permite grandes expansões, além de empregar uma grande quantidade de mão-de-obra e espaço físico, pois além da manutenção do nematoide, há necessidade de cultivar o inseto hospedeiro em paralelo. Outro aspecto negativo da produção *in vivo* é a falta de padrão dos NEPs obtidos e a susceptibilidade do sistema à infecções e surtos de doenças. Apesar das desvantagens, é uma técnica simples e de baixo investimento inicial, sendo muito utilizada ainda hoje para a produção de NEPs com finalidade de pesquisa em laboratórios.

Existem diferentes técnicas para cultivo *in vitro*, muitas delas ainda em fase de aperfeiçoamento. A cultura em meio sólido, proposta por Bedding em 1984 permite rendimento em torno de 106 JIs por grama de meio. Esta técnica consiste basicamente na utilização de um suporte inorgânico (esponja de poliuretano) embebido em um caldo de tecidos animais homogeneizados, além de óleo ou gordura animal. Trata-se de um método bastante flexível e com baixo custo. Estudos econômicos da produção em larga escala usando o método de Bedding concluíram que esta técnica é viável em termos financeiros para a produção de até 1013 JIs/mês (Friedman, 1990).

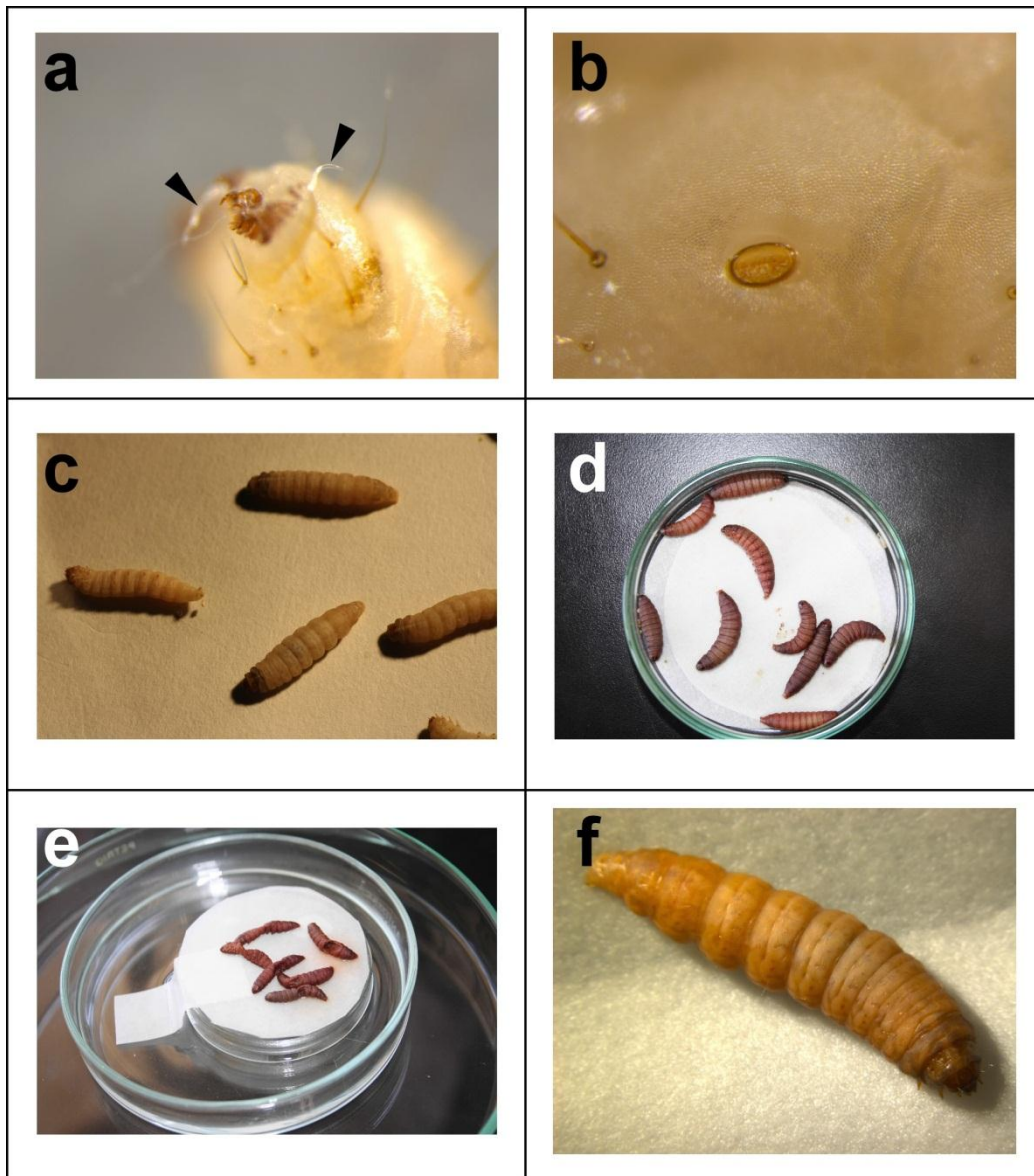


Figura 3. Larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Heterorhabditis baujardi* LPP7. (a) Detalhe da parte posterior de uma larva, mostrando os juvenis infectantes (cabeças de flecha) aderidos à cutícula; (b) Detalhe de um espiráculo lateral, por onde os JIs podem penetrar; (c) Larvas de *G. mellonella*, logo após adição dos JIs; (d) Larvas de *G. mellonella* 2 dias após a infecção; notar a mudança de coloração causada por acúmulo de pigmentos produzidos pela bactéria simbiote; (e) armadilha de White, utilizada para coletar os JIs; (f) detalhe de uma larva de *G. mellonella*, um dia após a infecção.

As técnicas empregando meio líquido e fermentadores são mais utilizadas atualmente para a produção em larga escala de NEPs. Pace e colaboradores (1986) conseguiram produzir cerca de 9×10^4 JIs/ml em fermentadores de 10 litros, com agitação. A utilização de fermentadores do tipo “air lift”, onde o meio de cultura é agitado por um processo controlado de aeração, é possível a produção de quantidades maiores, próximas de 10^5 JIs/ml (Friedman e cols., 1989). Estas culturas apresentam como principal vantagem a possibilidade de expansão sem grande demanda de mão-de-obra e espaço.

Estes últimos métodos, de cultivo em grandes quantidades, apesar de vantajosos quando comparados à produção *in vivo*, ainda apresentam uma série de problemas. O rendimento das culturas é variado, não permitindo previsões precisas e garantias de controle de qualidade nas formulações. Essa variação decorre, principalmente, do fato de que tanto a aeração como a agitação dentro dos fermentadores diminui significativamente as taxas de cópula (Neves e cols., 1998).

Para contornar esses problemas, os produtores de NEPs estão investindo na construção de fermentadores não-convencionais, desenhados de forma a promover a circulação de ar em uma zona delimitada, seguida de uma zona de desaceleração com anteparos de decantação. São os fermentadores do tipo “air lift”. Na zona de decantação, a movimentação do ar é mais baixa, diminuindo a circulação do meio líquido, permitindo desse modo a maior taxa de acasalamento (Neves e cols., 1996).

Contornadas as limitações de produção, a utilização de NEPs em controle biológico também exige a avaliação de questões ambientais e de segurança. A grande diversidade de hospedeiros que pode ser afetada pela presença de *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* spp. e seus simbiossios é uma questão importante a ser avaliada de forma a determinar o impacto da presença dos NEPs nas populações de insetos não-praga, outros invertebrados e mamíferos.

A maioria dos estudos de impacto em populações de diferentes invertebrados foram conduzidos em laboratório. Abelhas melíferas (larvas e adultos) são suscetíveis à infecção por *S. carpocapsae*. No entanto, a utilização de sprays contendo NEPs atinge somente as operárias, não sendo verificada mortalidade nos ovos ou embriões da colméia (Kaya e cols., 1982). Ensaio utilizando grandes concentrações de JIs embebidos em papel filtro mostraram que aranhas, pseudoescorpiões, opiliões e miriápodes são infectados tanto por Steinernematidae quanto Heterorhabditidae (Poinar e Thomas, 1985). No entanto, aplicações de NEPs em quantidades similares as utilizadas em campo para o controle de *Otiiorhynchus* spp. (gorgulho da videira) não foram capazes de matar aranhas e centopéias (Deseo e cols., 1985).

O efeito de NEPs sobre vertebrados foi avaliado em diferentes espécies de peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos. Somente os girinos de algumas espécies de sapos puderam ser infectados pelos JIs de *Steinernema* e *Heterorhabditis* e, embora o desenvolvimento dos nematoides raramente fosse completo, as bactérias simbiossios foram suficientes para causar a morte dos girinos mais jovens (Poinar, 1990).

Diferentes testes mostraram não haver nenhuma patogenicidade para mamíferos (Gaugler e Boush, 1979; Poinar e cols., 1982). Estes resultados levaram à regulamentação, pela Agência Norte-Americana de Proteção ao

Meio-Ambiente, do uso de NEPs de ambas as famílias (Gorsuch, 1982). No entanto, recentemente foram isoladas, de infecções humanas, bactérias do gênero *Photorhabdus*, simbiote de *Heterorhabditis*. A espécie, denominada *Photorhabdus asymbiotica* é um patógeno oportunista, associado a ferimentos superficiais e infecções sistêmicas com bacteremia. Seu vetor invertebrado foi identificado como *H. indica* para linhagens isoladas na Austrália e no Japão (Gerrard e cols., 2006; Kuwata e cols., 2008). Estudos de campo também avaliaram o impacto da introdução de uma espécie de NEP exótica sobre os NEPs que ocorrem naturalmente em uma determinada área. Infecções de larvas de *Galleria mellonella* foram utilizadas para avaliar as possibilidades de co-infestação e prevalência entre as espécies *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* (nativas da Califórnia) e *S. riobrave* (exótica, proveniente do Texas). A presença de *H. bacteriophora* nas infecções foi significativamente suprimida pela presença de *S. riobrave*, mas a presença da espécie nativa sempre pode ser detectada, mesmo depois de dois anos da introdução de *S. riobrave*. Pode-se observar, também, a prevalência de *H. bacteriophora* em camadas mais profundas do solo, sugerindo que a estratificação das populações é a maneira através da qual diferentes espécies de NEPs convivem com sucesso na mesma comunidade (Millar e Barbercherck, 2001).

Formulações e Formas de Aplicação.

Para que as formas infectivas (JIs) alcancem com sucesso o inseto-alvo é necessário definir uma formulação que permita aplicação rápida, direcionada e com boa conservação dos nematoides, principalmente durante transporte para o campo e eventual armazenagem. Fórmulas contendo NEPs apresentam peculiaridades que as diferem dos pesticidas químicos. Antes de serem adicionados à formulação final, os NEPs podem ser armazenados sob refrigeração em soluções aquosas ou superfícies encharcadas, como esponjas e outros substratos sintéticos. Nesta fase, há necessidade somente de aeração mínima e adequação à temperatura ideal de cada linhagem (Georgis, 1990).

Além dos NEPs, as formulações comerciais possuem componentes inertes e outros com função específica de enriquecer a preservação, manipulação, dispersão e estocagem.

Dentre os componentes mais comumente utilizados estão o alginato, a argila, o carvão ativado e géis de poliacrilamida. Estes materiais são chamados “carregadores”, pois imobilizam os JIs, muitas vezes dessecando-os parcialmente, condições estas que acabam por reduzir ainda mais o metabolismo dos vermes. Dessa maneira, os JIs sobrevivem mais a estresses ambientais.

Formulações contendo alginato permitem o encapsulamento dos JIs em uma matriz gelatinosa, solúvel em água e biodegradável. Experimentos realizados com *Steinernema* e *Heterorhabditis* mostraram ser possível o aprisionamento de até 300 JIs por cápsula de gel. Estas cápsulas podem ser engolidas pelo inseto-praga ou dissolvidas no solo, liberando os JIs (Kaya, 1985; Poinar, 1985; Navon e cols., 1999).

A adição de argila ou carvão às formulações permite a absorção gradual da água, submetendo os NEPs à dessecação parcial. Com menos água no corpo, os JIs sobrevivem melhor à temperatura ambiente. Suspensões aquosas

contendo argila podem ser facilmente aspergidas no campo e já são usadas comercialmente na aplicação de NEPs (Georgis, 1990).

Wilson e Ivanova (2004) desenvolveram uma solução aquosa neutra, cuja base é sílica coloidal. Esta formulação líquida, com baixa viscosidade e baixa adesão, permite a aspersão em grandes áreas. Além disso, sua densidade é próxima à densidade dos JIs, permitindo que os mesmos fiquem suspensos na formulação. Em fórmulas líquidas tradicionais, os NEPs tendem a acumular no fundo dos recipientes, morrendo por falta de aeração (Womersely, 1990).

Além de sprays contendo diferentes carregadores, os NEPs podem ser aplicados no campo diretamente em cadáveres mortos de insetos ou iscas. No primeiro caso, são utilizadas larvas de *Galleria mellonella* infectadas envolvidas em argila e distribuídas pelo campo. Este tipo de aplicação muitas vezes possui eficiência maior do que pulverização com suspensões aquosas ou gelatinosas (Shapiro e Glazer, 1996). O trabalho de Ansari e colaboradores (2009) mostrou que cadáveres infectados associados a “caolim” – silicatos hidratados de alumínio – aumenta a porcentagem de JIs de *H. bacteriophora* liberados para o ambiente em experimentos conduzidos em casa de vegetação para controle de *Hoplia philanthus*, um escarabeídeo praga de gramíneas.

As iscas podem conter os JIs em complexados a diferentes materiais inertes, assim como já discutido para as formulações líquidas. Existem também outras estratégias para induzir o inseto-praga a se alimentar dos JIs: imersão ou impregnação dos nematoides em sabugos de milho, casca de amendoim ou farelo de trigo. Além disso, podem ser adicionados atrativos para o inseto como glicose, extrato de malte, sacarose, entre outros (Grewal, 2001).

As concentrações eficazes de NEPs aplicadas em campo ficam em torno de 2,5 bilhões de nematoides/hectare. Essa quantidade é, com frequência, suficiente para haver contato com o inseto praga e liberação de novos JIs após infecções bem-sucedidas (Georgis, 1990). Estes números precisam ser aumentados quando a área apresenta fatores de estresse para os NEPs, sejam eles abióticos (umidade, temperatura, luz) ou bióticos (predadores, insetos-alvo mais resistentes).

NEPs cultivados *in vivo* são mais estáveis nas formulações do que aqueles obtidos *in vitro* (Grewal, 2001). Os JIs apresentam cerca de 60% da sua massa em lipídeos, que constituem a principal fonte de reserva energética desse estágio. A composição e a concentração de lipídeos variam de acordo com as linhagens e, principalmente, de acordo com as fontes de alimento presentes no meio de cultura. Dessa forma, acredita-se que a hemolinfa do inseto seja uma fonte mais completa de nutrição, permitindo que os JIs que emergem dos cadáveres possuam melhores condições energéticas para sobreviver aos períodos de estocagem, quando comparado àqueles crescidos em meio artificial (Grewal e Georgis, 1998; Grewal, 2000).

Eficácia.

Muitos insetos não podem ser controlados por NEPs em decorrência de uma resistência natural ou comportamento que dificulta a infecção. O planejamento de uma estratégia de controle biológico deve, portanto, desenvolver estratégias para a identificação de quais pragas podem realmente ser combatidas e qual a combinação ideal de métodos a serem empregados no

controle. Estudos prévios em laboratório e casas de vegetação são essenciais para a definição das taxas de infectividade de determinadas espécies de inseto frente à linhagem de nematoide selecionada.

O principal fator limitante é a distribuição do inseto no ambiente. Insetos que possuem estádios terrestres em seu ciclo de vida são potencialmente mais suscetíveis à infecção por NEPs. Larvas que penetram em tecidos vegetais também são potencialmente atingíveis, assim como aqueles que se alimentam de folhas ou permanecem algum tempo sobre elas, na forma de pupa. Estudos de campo utilizando *S. carpocapsae*, *S. feltiae* e *H. bacteriophora* mostraram, no entanto, que a infecção é rara e limita-se a situações de alta umidade (>90%) sobre as folhas (Kaya, 1986). A maioria dos testes usando NEPs no controle de insetos foliares não se mostrou funcional (Begley, 1990). Dentre os raros casos de sucesso no controle de insetos-praga em folhagens pode-se citar o combate ao lepidóptero *Hyphantria cunea*, cujas larvas de terceiro instar agregam-se sobre as folhas, facilitando a permanência dos nematoides, protegidos da rápida dessecação (Yamanaka e cols., 1986).

Insetos que se distribuem em habitats crípticos, com alta umidade, baixa incidência de luz U.V. e temperaturas amenas também são potenciais alvos para o controle utilizando NEPs. Os principais resultados obtidos em campo são, até o momento, aqueles referentes a estratégias de eliminação de insetos-praga que perfuram plantas, permanecendo dentro de caules, folhas ou raízes durante pelo menos uma fase do ciclo de vida (Begley, 1990). Estes insetos, conhecidos popularmente como “brocas” pertencem, na maioria, à ordem Coleoptera ou Lepidoptera, sendo a larva ou a pupa os estádios crípticos mais encontrados. Experimentos de laboratório utilizando *H. bacteriophora* no controle da broca da cana-de-açúcar *Diatrea saccharalis* conseguiram atingir 100% de mortalidade de larvas de terceiro e quartos estádios (Sosa-Jr e cols., 1993). A mortalidade atingida com *S. carpocapsae* foi semelhante: 95%. A transposição destes resultados para o campo, no entanto, encontra uma importante limitação: a definição de um método eficaz de aplicação. No trabalho citado acima, apenas 17 de 50 larvas de *D. saccharalis* morreram quando os nematoides foram aplicados em experimentos de campo, utilizando sprays com NEPs em suspensão (cerca de 3,7 bilhões de nematoides/ha). Formulações com *S. carpocapsae* têm se mostrado bastante eficientes no combate ao besouro *Monochamus alternatus*, praga de árvores madeireiras, como *Pinus* sp. Para matar larvas e adultos do besouro, os NEPs foram aplicados através de injeções diretas nas galerias abertas pelas larvas no caule e galhos das árvores. Com esta estratégia, a mortalidade observada em campo foi de até 80% (Mamiya, 1987).

NEPs podem ser uma boa opção também para o controle de insetos que se desenvolvem em ambiente de matéria orgânica em decomposição e criadouros animais, especialmente porque essas espécies de artrópodes são resistentes à maioria dos tratamentos químicos disponíveis (Begley, 1990). Testes de campo realizados contra larvas de moscas em aviários e granjas apresentaram resultados diversos: Mullens e colaboradores (1987) utilizaram *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*, sem resultados expressivos. No entanto, um estudo realizado com *H. bacteriophora* para controle de *Musca domestica* atingiu resultados significativos quando comparados aos controles sem NEPs (Belton e cols., 1987). Trabalhos realizados em fazendas de criação de suínos

mostraram boa eficácia de aplicações contendo *S. feltiae* e *H. megidis* no controle da mosca doméstica (Renn, 1998).

Existem, ainda, experimentos que buscam o controle de insetos aquáticos através da utilização de NEPs. *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* possuem a capacidade de infectar e matar larvas de *Aedes aegypti* (Molta e Hominick, 1989) e outros dípteros (Gaugler e Molloy, 1981). No entanto, as aplicações em campo são bastante complicadas, pois tanto *Steinernema* sp. quanto *Heterorhabditis* sp. não são adaptadas para ambiente aquático, apresentando limitações de motilidade.

Além das limitações ambientais, alguns artrópodes apresentam resistência à infecção por NEPs em decorrência de fatores comportamentais, morfológicos e fisiológicos. Cupins, por exemplo, apresentam o comportamento de isolar o indivíduo infectado dos demais componentes da colônia, limitando a dispersão dos JIs (Gaugler, 1988). Alguns escarabeídeos aumentam as taxas de defecação, para impedir a entrada de NEPs pelo ânus, além de limparem constantemente a parede do corpo para se livrar dos JIs (Gaugler, 1988). Alguns insetos apresentam pupas muito duras ou recobertas de seda ou muco, impedindo a penetração de JIs. Outros, ainda, apresentam espiráculos muito pequenos e exoesqueleto muito espesso, minimizando a possibilidade de entrada dos nematoides. As defesas fisiológicas incluem encapsulamento e outras respostas imunológicas como discutido anteriormente neste capítulo.

A eficácia dos tratamentos no campo varia também de acordo com a região geográfica. *S. glaseri* provoca 80% de redução nas populações de escarabeídeos na China, mas é pouco eficaz em plantações de cana de açúcar na Flórida (Sosa-Jr e cols., 1993). Estes resultados apontam para constantes estudos relacionados à seleção de linhagens específicas para cada área tratada e cada praga a ser combatida.

Considerações Finais: NEPs no Brasil.

A cultura da cana-de-açúcar é uma das principais atividades agrícolas brasileiras em que estão sendo testadas estratégias de controle biológico através da introdução de NEPs. A produção de cana é vítima de diferentes insetos-praga, dentre eles o “bicudo” (*Sphenophorus levis*, Coleoptera) e cigarrinhas do gênero *Mahanarva* sp. (Hemiptera). Estes insetos são de difícil controle por meio de inseticidas químicos e o rendimento econômico do cultivo (cerca de US\$ 1,8 bilhões/ano em exportações) permite o investimento em novas tecnologias (Leite e cols., 2003). Além disso, o ambiente das plantações é bastante favorável para a atuação dos NEPs: a colheita deixa uma espessa camada de palha cobrindo o solo, protegendo os nematoides da dessecação e exposição excessiva à luz.

Tavares e colaboradores (2007) avaliaram os efeitos de *H. indica* (IBCB-n5) e *Steinernema* sp. (isolado IBCB-n6) na mortalidade de larvas de *S. levis* em experimentos de laboratório e casas de vegetação. Para *Steinernema* a mortalidade observada foi de até 73% nas aplicações em casa de vegetação e para *Heterorhabditis*, 85%. Ambos os resultados foram observados após aplicação de 60 JIs/cm².

Uma iniciativa de sucesso foi o emprego de juvenis infectantes de *H. indica* no controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), uma praga de milho (Garcia e cols., 2008). Análises conduzidas no campo mostram que

esta espécie de NEP encontrada no Brasil produz resultados semelhantes àqueles decorrentes do controle utilizando *Steinernema*, embora no caso de *Heterorhabditis* as quantidades de JIs aplicadas sejam maiores.

Também já foram conduzidos experimentos com *Heterorhabditis* spp. para o controle do “bicho da goiaba” (*Conotrachelus psidii*), uma larva de besouro responsável por grande prejuízo econômico na produção dessa fruta (Dolinski e cols, 2006).

Isolados brasileiros de *Steinernema* e *Heterorhabditis* também já foram avaliados quanto à sua capacidade de controle de insetos sociais, como cupins da espécie *Cornitermes cumulans*. Os JIs são capazes de infectar e matar operários e soldados, sendo a mortalidade obtida para *Heterorhabditis* sp. (CCA-UFSCAR) de até 84% dos soldados. A eficiência de isolados exóticos de *S. carpocapsae* chega a 100% para soldados e operários (Rosa e cols., 2007).

Pesquisadores brasileiros também são responsáveis por avaliar a compatibilidade de NEPs com a utilização de produtos fitossanitários utilizados amplamente no território nacional. Negrisoli-Jr. e colaboradores (2008) acompanharam a mortalidade de JIs de *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* frente à utilização, no campo, do herbicida Glifosato 480 CS (Agripec) (6 litros/hectare). Não foram observadas perdas na infectividade dos JIs e não houve redução significativa das populações, para ambas as espécies, mostrando ser possível a combinação do uso de NEPs para controle de pragas com o controle químico de ervas daninhas através do emprego de glifosato. Estes resultados concordam com estudos realizados em diferentes áreas de cultivo ao redor do mundo sobre a utilização de diferentes pesticidas e herbicidas concomitantemente ao emprego de NEPs. Pentacloronitrobenzeno, benomil, clorotalonil e dicamba não reduziram a viabilidade dos NEPs de ambos os gêneros mesmo após 48 horas de exposição ao produto (Zimmerman e Crashaw, 1990).

Para saber mais.

Photorhabdus/Xenorhabdus.

Au, C., Dean, P., Reynolds, S.E. and ffrench-Constant, R. H. (2004) Effect of the insect pathogenic bacterium *Photorhabdus* on insect phagocytes. *Cell. Microbiol.* **6**, 89-95.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1462-5822.2003.00345.x/full>
doi:10.1046/j.1462-5822.2003.00345.x

Bode, H.B. (2009) Entomopathogenic bacteria as source of secondary metabolites. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 224-230.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593109000246>
doi:10.1016/j.cbpa.2009.02.037

Clarke, D.J. (2008) *Photorhabdus* : a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cell. Microbiol.* **10**, 2159-2167.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-5822.2008.01209.x/full>
doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01209.x

Herbert, E. E. and Goodrich-Blair, H. (2007) Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nature Reviews Microbiol.* **5**, 634-646.

<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n8/abs/nrmicro1706.html>
doi:10.1038/nrmicro1706

Silva, C.P., Waterfield, N.R., Daborn, P.J., Dean, P., Chilver, T., Au, C.P.Y., Sharma, S., Potter, U., Reynolds, S.E. and ffrench-Constant, R.H. (2002) Bacterial Infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. *Cell. Microbiol.* **4**, 329-339.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1462-5822.2002.00194.x/full>
doi:10.1046/j.1462-5822.2002.00194.x

Nematoides Entomopatogênicos.

Ciche, T. A. and Sternberg, P. (2007) Postembryonic RNAi in *Heterorhabditis bacteriophora*: a nematode insect parasite and host for the insect pathogenic symbionts. *BMC Developmental Biology.*

<http://www.biomedcentral.com/1471-213X/7/101>
doi:10.1186/1471-213X-7-101

Ciche, T.A. (2007) *The biology and genome of Heterorhabditis bacteriophora*. In: WormBook eds. The C. elegans Research Community.

<http://www.wormbook.org>
doi:10.1895/wormbook.1.135.1

Grewal, P. De Nardo, E.A.B. and Aguilera, M.M. (2001) Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. *Neotrop. Entomol.* **30**, 191-205.

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2001000200001

doi: 10.1590/S1519-566X2001000200001

Li, X-Y., Cowles, R.S., Cowles, E.A., Gaugler, R. and Cox-Foster, D.L. (2007)
Relationship between the successful infection by entomopathogenic
nematodes and the host immune response. *Int. J. Parasitol.* **37**, 365-374.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002075190600316X>
doi:10.1016/j.ijpara.2006.08.009

Referências Bibliográficas.

- Akhurts, R.J. and Boemare (1990) *Biology and Taxonomy of Xenorhabdus*. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. eds. Gaugler, R. and Kaya, H.K. p. 75-87. Press Inc. Boca Raton, Florida
- Aldrovando, U. (1602) De animalibus insectis libri septem, cum singulorum iconibus ad vivum expressis...cum indice copiosissimo [De Vermibus in cæteris animalibus nascentibus. Cap. III]. J. B. Bellagambam (Bononiæ), p. 678-680.
- Alves, V.S., Alves, L.F.A., de Quadros, J.C. and Leite, L.G. (2009a) Suscetibilidade da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) ao nematoide *Steinernema carpocapsae* (Nematoda, Steinernematidae). *Arq. Inst. Biol.* **76**, 479-482.
- Alves, V.S., Moino Junior, A., Santa-Ceilia, L.V.C., Andaló, V. and Souza, G.C. (2009b) Patogenicidade de nematoides entomopatogênicos à colchonilha da raiz do cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. *Arq. Inst. Biol.* **76**, 67-73.
- Au, C., Dean, P., Reynolds, S.E. and French-Constant, R. H. (2004) Effect of the insect pathogenic bacterium *Photorhabdus* on insect phagocytes. *Cell. Microbiol.* **6**, 89-95.
- Ansari, M.A. , Evans, M. and Butt, T.M. (2009) Identification of pathogenic strains of entomopathogenic nematodes and fungi for wireworm control. *Crop Protection*, **28** : 269-272.
- Bai, X., Adams, B.J., Ciche, T.A., Clifton, S., Gaugler, R., Hogenhout, S.A., Spieth, J., Sternberg, P., Wilson, R.K. and Grewal, P. (2009) Transcriptomic analysis of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* TTO1. *BMC Genomics.* **205**.
- Barbosa-Negrisoni, C.R.C., Garcia, M.S., Dolinski, C., Negrisoni-Jr. A.S., Bernardi, D. and Nava, D.E. (2009) Efficacy of indigenous entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) from Rio Grande do Sul Brazil, against *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in peach orchards. *J. Inver. Pathol.* **102**, 6-13.
- Baumann, P., Baumann, L., Lai, C., Rouhbakhsh, D., Moran, N.A. and Clark, M.A. (1995) Genetics, physiology and evolutionary relationships in the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Ann. Review. Microbiol.* **49**, 55-94.
- Begley, J.W. (1990) *Efficacy against insects in habitats other the soil*. In: Entomopathogenic Nematology, p. 233–246 ed. Gaugler, R. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Beattie, G.A.C. Somsook, V., Watson, D.M., Clift, A.D. and Jiang, L. (1995) Field evaluation of *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Rhabditida: Steinernematidae) and selected pesticides and enhancers for control of *Phyllocnistis citrella* Staiton (Lepidoptera: Gracillariidae). *J. Aust. Ent. Soc.* **34**, 335-342.

- Bedding, R.A. (1984) Large-scale production storage and transport of the insect parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Ann. Appl. Biol.* **104**, 117-120.
- Belton, P., Rutherford, T.A., Trotter, D. B. and Webster, J. M. (1987) *Heterorhabditis heliothidis*: a potential biological control agent of houseflies in caged-layer poultry barns. *J. Nematol.* **19**: 263-266.
- Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Vierstraete, A., Vannfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Firsse, L.M., Vida, J.T. and Thomas, W.K. (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature.* **392**, 71-75.
- Bode, H.B. (2009) Entomopathogenic bacteria as source of secondary metabolites. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 224-230.
- Brachmann, A.O., Joyce, S.A., Jenke-Kodama, H., Schwär, G., Clarke, D.J. and Bode, H.B. (2007). A type II Polyketide Synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *Chem. Biochem.* **14**, 1721-1728.
- Bradley, J.S., Garau, J., Bode, H., Rolston, K.V., Wilson, S.E. and Quinn, P.J. (1999) Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *Int. J. Antimicrobial Agents.* **11**, 93-100.
- Bruck, D.J. and Walton, V. M. (2007) Susceptibility of the filbertworm (*Cydia latiferreana*, Lepidoptera: Tortricidae) and filbert weevil (*Curculio occidentalis*, Coleoptera: Curculionidae) to entomopathogenic nematodes. *J. Inver. Pathol.* **96**, 93-96.
- Brugirard-Ricaud, K., Duchaud, E., Givaudan, A., Girard, P.A., Kunst, F., Boemare, N., Brehélin, M. and Zumbihl, R. (2004a). Site-specific antiphagocytic function of the *Photorhabdus luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cell. Microbiol.* **7**, 363-371.
- Brugirard-Richaud, K., Givaudan, A., Parkhill, J., Boemare, N., Kunst, F., Zumbihl, R. and Duchaud, E. (2004b). Variation in the effectors of the type III secretion system among *Photorhabdus* species as revealed by genomic analysis. *J. Bacteriol.* **186**, 4376-4381.
- Brown, S.E., Cao, A.T., Hines, E.R., Akhurst, R.J. and East, P.D. (2003) A novel secreted protein toxin from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *J. Biol. Chem.* **279**, 14595-14601.
- Cabanillas, H.E. (2003) Susceptibility of the boll weevil to *Steinernema riobrave* and other entomopathogenic nematodes. *J. Inver. Pathol.* **82**, 188-197.
- Campos, R.A., Boldo, J.T., Pimentel, I.C., Dalfovo, V., Araújo, W.L., Azevedo, J.L., Vainstein, M.H. and Barros, N.M. (2010) Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Gen. Mol. Research.* **9**, 1421-1430.
- Cao, T.M., Durrante, D., Tripathi, A., Liu, J., Tsai, S., Kellog, G.E., Simoni, D. and Lee, R.M. (2008) Stilbene derivatives that are colchicine site microtubule inhibitors have antileukemic activity and minimal systemic toxicity. *American J. Hematol.* **83**, 390-397.

- Chambers, U., Bruck, D.J., Olsen, J. and Walton, V.M. (2010) Control of overwintering filbertworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae with *Steinernema carpocapsae*. *J. Econom. Entomol.* **103**, 416-422.
- Chaston, J.M., Dillman, A.R., Shapiro-Ilan, D. I., Bilgrami, A.L., Gaugler, R., Hopper, K.R. and Adams, B.J. (2011) Outcrossing and crossbreeding recovers deteriorated traits in laboratory cultured *Steinernema carpocapsae* nematodes. *Int. J. Parasitol.* **41**, 801-809.
- Ciche, T.A., Kim, K-S., Kauffman-Daszczuk, B., Nguyen, K.C.Q. and Hall, D.H. (2008) Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *App. Environ. Microbiol.* **74**, 2275-2287.
- Ciche, T. A. and Sternberg, P. (2007) Postembryonic RNAi in *Heterorhabditis bacteriophora*: a nematode insect parasite and host for the insect pathogenic symbionts. *BMC Developmental Biology.* **7**, 101. <doi:10.1186/1471-213X-7-101>
- Ciche, T.A. (2007) *The biology and genome of Heterorhabditis bacteriophora*. In: WormBook eds. The *C. elegans* Research Community. <<http://www.wormbook.org>>
- Ciche, T.A., Darby, C.; Ehlers, R.U., Forst, S. and Goodrich-Blair, H. (2006) Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biol. Control.* **38**, 22–46
- Ciche, T.A. and Ensign. J.C. (2003) For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, wick end of a nematode is out? *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1890-1897
- Clarke, D.J. (2008) *Photorhabdus* : a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cell. Microbiol.* **10**, 2159-2167.
- Cottrel, T. E. and Shapiro-Ilan, D. I. (2006) Susceptibility of the peachtree borer, *Synanthedon exitiosa*, to *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema riobrave* in laboratory and field trials. *J. Inver. Pathol.* **92**, 85-88.
- Daborn, P.J., Waterfield, N., Silva, C.P., Au, C.P., Sharma, S. and French-constant, R.H. (2002) A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *PNAS.* **99**, 10742-10747.
- Daborn, P.J., Waterfield, N., Blight, M.A. and French-Constant, R. H. (2001) Measuring virulence factor expression by the pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* in culture and during insect infection. *J. Bacteriol.* **183**, 5834-5839.
- De Ley, P. (2006) *A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny*. In: WormBook, eds. The *C. elegans* Research Community. <http://www.wormbook.org>
- Dembilio, O., Llácer, E., Martínez de Altube Mdel, M. and Jacas, J.A. (2010) Field efficacy of imidacloprid and *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*

- (Coleoptera: Curculionidae) in *Phoenix canariensis*. *Pest Management Science*. **66**, 365-370.
- Derzelle, S., Duchaud, E., Kunst, F., Danchin, A. and Bertin, P. (2002). Identification, characterization and regulation of a cluster of genes involved in carbapenem biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3780-3789.
- Deseo, K.V., Kovacs, A., Lercari, G. and Ckonstanzi, M. (1985) Possibilita di applicazione di nematodi entomoparassiti contro insetti dannosi nella floricolura. *Informe Fitopatol.* **11**, 37.
- Dolinski, C., Del Valle, E. and Stuart, R.J. (2006) Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psiddi* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control.* **36**, 422-427.
- Dowds, B.C., and Peters, A. (2002). *Virulence mechanisms*. In: Entomopathogenic Nematology, p. 79–98 ed. Gaugler, R. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Dowling, A.J., Daborn, P.J., Waterfield, N.R., Wang, P., Streuli, C.H. and ffrench-Constant, R.H. (2004) The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy (Mcf) promotes apoptosis in mammalian cells. *Cell. Microbiol.* **6**, 345-353.
- Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudna, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J-F., Dassa, E., Derose, R., Derzell, S., Freyssinet, G., Guadriault, S., Médigue, C., Lanois, A., Powell, K., Siguier, P., Vincent, R., Wingate, V., Zouine, M., Glaser, P., Boemare, N., Danchin, A. and Kunst, F. (2003) The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature Biotechnol.* **2**, 1307-1313.
- Dutky, S.R., Thompson, J.V. e Cantwell, G.E. (1964) A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *J. Insect. Pathol.* **6**, 417-422.
- Ehlers, R-U (2001) Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 623-633.
- Eleftherianos, I., Waterfield, N.R., Bone, P., Boundy, S., ffrench-Constant, R.H. and Reynolds, S.E. (2009) A single locus from the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* inhibits activated *Manduca sexta* phenoloxidase. *FEMS Microbiol. Letters.* **293**, 170-176.
- 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. and Reynolds, S.E. (2007) An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *PNAS* **104**, 2419-2424.
- Elsworth, B., Wasmuth, J. and Blaxter, M. (2011) NEMBASE4: the nematode transcriptome resource. *Int. J. Parasitol.* No prelo.
- Epsky, N.D., Walter, D.E. and Capinera, J.L. (1988) Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of

- entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *J. Economic Entomol.* **81**, 821-825.
- Fenili, R., Mendes, C.J., Miquelluti, D.J., Mariano-da-Silva, S. Xavier, Y.; Ribas, H.S. and Furlan, G. (2000) *Deladenus siricidicola*, Bedding (Neotylenchidae) parasitism evaluation in adult *Sirex noctilio*, Fabricius, 1973 (Hymenoptera: Siricidae). *Rev. Brasil. Biol.* **60**, 683-687.
- Ffrench-Constant, R.H., Waterfield, N., Daborn, P., Joyce, S., Bennet, H., Au, C., Dowling, A., Boundy, S., Reynolds, S. and Clarke, D. (2003) *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. *FEMS Microbiol. Reviews.* **26**, 433-456.
- Fischbach, M.A. and Walsh, C.T. (2006) Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery and mechanisms. *Chemical Reviews.* **106**, 3468-3496.
- Freitas-Ribeiro, G.M., Vasconcelos, V.O., Furlong, J. and Dolinski, C. (2009) Evaluation of the efficacy of strains of *Steinernema carpocapsae* Santa Rosa and ALL (Steinernematidae: Rhabditida) to control engorged female *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* **104**, 1203-1206.
- Friedman, M.J., Langston, S.E. and Pollit, S. (1989) Mass production in liquid culture of insect killing nematodes. Patent International Publication Number WO 89/04602 1-24.
- Friedman, M.J. (1990) *Commercial production and development*. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. eds. Gaugler, R. and Kaya, H.K. p. 75-87. Press Inc. Boca Raton, Florida
- Forst, S. and Clarke, D. J. (2002). *Nematode-bacterium symbiosis*. In: Entomopathogenic Nematology, p. 57–77 ed. Gaugler, R. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Forst, S., Dowds, B., Boemare, N. and Stackenbrandt, E. (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Ann. Review of Microbiol.* **51**, 47-72.
- Garcia, L.C., Raetano, C.G, and Leite, L.G. (2008) Tecnologia de aplicação para os nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) para controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. *Neotrop. Entomol.* **37**, 305-311.
- Gaugler, R. and Boush, G.M. (1979) Non-susceptibility of rats to the entomopathogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae*. *Environ. Entomol.* **8**, 658-660.
- Gaugler, R. and Molloy, D. (1981) Field evaluation of the entomogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae*, as a biological control agent of black flies (Diptera: Simuliidae). *Mosquito News*, **41**: 459-464.
- Gaugler, R. (1988) Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agric. Ecosyst. Environ.* **24**, 351-360.
- Gaugler, R. and Kaya, H.K. (1990) Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. 365pp. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.

- Gaugler, R. (2002) *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, pp.402. New York, NY, USA.
- Georgis, R. (1990) *Formulation and application technology*. In: *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. eds. Gaugler, R. and Kaya, H.K. p. 173-214. Press Inc. Boca Raton, Florida
- Gerrard, J.G., Joyce, S.A., Clarke, D.J., French-Constant, R.H., Nimmo, G.R., Looke, D.F.M., Feil, E.J., Pearce, L. and Waterfield, N.R. (2006) Nematode symbiont for *Photorhabdus aymbiotica*. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1562-1564.
- Gillmore, S.K. and Potter, D.A. (1993) Potential role of collembolan as biotic mortality agents for entomopathogenic nematodes. *Pedobiologica.* **37**, 30-38.
- Girling, R.D., Ennins, D., Dillon, A.B. and Griffin, C.T. (2010) The lethal and sub-lethal consequences of entomopathogenic nematode infestation and exposure for adult pine weevils, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Inver. Pathol.* **104**, 195-202.
- Glazer, I., Liran, N. and Steinberger, Y. (2001) A survey of entomopathogenic nematodes (rhabditida) in the Negev desert. *Phytoparasitica.* **19**, 291-300.
- Goodrich-Blair, H. (2007) They've got a ticket to ride: *Xenorhabdus nematophila* – *Steinernema carpocapsae* symbiosis. *Curr. Opinion Microbiol.* **10**, 225-230.
- Gorsuch, A.M. (1982) Regulations for the enforcement of the Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide act exemption from regulation of certain biological control agents. *Fed. Regist.* **47**, 23928-23930.
- Grewal, P. De Nardo, E.A.B. and Aguilera, M.M. (2001) Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. *Neotrop. Entomol.* **30**, 191-205.
- Grewal, P.S. (2000) Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. *Pest Management Sci.* **56**, 401-406.
- Grewal, P.S. and Georgis, S. (1998) *Entomopathogenic Nematodes*. In: *Methods in Biotechnology: Biopesticides: use and Delivery*. eds. Hall, F.R. and Menn, J. p. 271-299. Humana Press. Totowa, New Jersey.
- Grewal, P.S., Martin, W.R., Miller, R.W. and Lewis, E.E. (1997) Suppression of plant-parasitic nematode populations in turfgrass by application of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Sci. Technol.* **7**, 393-400.
- Han, R.C. and Ehlers, R.U. (2000) Pathogenicity, development and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. *J. Inver. Pathol.* **75**, 55-58.
- Hao, H-J., Montiel, R., Abubucker, S., Mitreva, M., Simões, N. (2010) Transcripts analysis of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* induced *in vitro* with insect haemolymph. *Mol. Biochem. Parasitol.* **169**, 79-86.
- Herbert, E. E. and Goodrich-Blair, H. (2007) Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nature Reviews Microbiol.* **5**, 634-646.

- Heungens, K., Cowles, C. E. and Goodrich-Blair, H. (2002) Identification of *Xenorhabdus nematophila* genes required for mutualistic colonization of *Steinernema carpocapsae* nematodes. *Mol. Microbiol.* **45**, 1337-1353.
- Hominick, W.M. and Tingley, G.A. (1984) Mermithid nematodes and the control of insect vectors of human diseases. *Biocontrol News and Information.* **5**, 7-20.
- Hunt, D.J. (2007) Introduction. In: *Entomopathogenic Nematodes: systematic, phylogeny and bacterial symbionts*. eds. K.B. Nyguen and D.J. Hunt. pp.1-26. Leiden, Brill.
- Islas-López, M-A., Sanjuan-Galindo, R., Rodríguez-Hernández, A-I. and Chavarría-Hernández, N. (2005). Monoxenic production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using culture media containing agave juice (aguamiel) from Mexican maguey-pulguero (*Agave* spp.). Effects of the contents of nitrogen, carbohydrates and fat on infective juvenile production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 91-97.
- Joyce, S.A., Brachmann, A.O., Glazer, I., Lango, L., Schwär, G., Clarke, D.J. and Bode, H. (2008) Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. *Angewandte Chemie.* **47**, 1942-1945.
- Katsuyama, Y., Funa, N. and Horinouch, S. (2008) Precursor-directed biosynthesis of stilbene methyl ethers in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Journal.* **10**, 1286-1293.
- Kaya, H.K., Marston, J.M. Lindegrin, J.E., and Peng, Y.S. (1982) Low susceptibility of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) to the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* Weiser. *Environ. Entomol.* **11**, 920-924.
- Kaya, H.K. (1985) *Entomogenous nematodes for insect control in IPM systems*. In: *Biological Control in Agricultural IMP Systems*. eds. Hoy, M.A. and Herzog, D.C. p. 283-302. Academic Press, New York.
- Kaya, H.K. (1986) *Steinernema carpocapsae: use against foliage feeding insects and effect on non-target insects*. In: *Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology*. eds. Samson, R.A. , Vlak, J.M. and Peters, D. p. 268-270. Proceedings IVth Int. Colloq. Inver. Pathol.
- Kim, Y.H., Kwon, H-S., Kim, D. H., Cho, H.J., Lee, H.S., Jun, J-G., Park, J.H.Y. and Kim, J-K. (2008) Piceatannol, a stilbene present in grapes, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int. Immunopharmacol.* **12**, 1695-1702.
- Kim, Y., Ji, D., Cho, S. and Park, Y. (2005) Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* share an inhibitory action against phospholipase A2 to induce host immunodepression. *J. Inverteb. Pathol.* **89**, 258-264.
- Kuwata, R., Yoshiga, T., Yoshida, M. and Kondo, E. (2008) Mutualistic association of *Photorhabdus asymbiotica* with Japanese heterorhabditid entomopathogenic nematodes. *Microbes Infec.* **10**, 734-741.

- Labrousse, A., Chauvet, S., Couillaut, C., Kurz, C.L. and Ewbank, J.J. (2000) *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Current Biol.* **10**, 1543-1545.
- Lacey, L.A. and Unruh, T. R. (1998) Entomopathogenic nematodes for control of codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae): effect of nematode species, concentration, temperature and humidity. *Biological Control.* **13**, 190-197.
- Lamshead, P.J.D. (1993) Recent developments in marine benthic biodiversity research. *Oceanis.* **19**, 5-24.
- Lawrence, J.L., Hoy, C.W. and Grewal, P.S. (2006) Spatial and temporal distribution of endemic entomopathogenic nematodes in a heterogeneous vegetable production landscape. *Biological Control.* **37**, 247-255.
- Leite, L.G., Tavares, F.M., Bussólan, R.A., Amorim, D.S., Ambrós, C.M. and Harakava, R. (2007) Virulência de nematoides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) contra larvas da mosca-dos-fungos *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) e persistência de *Heterorhabditis indica* Poinar et al. 1992 em substratos orgânicos. *Arq. Inst. Biol.* **74**, 337-342.
- Leite, L.G., Machado, L.A., Aguilera, M.M., Rodrigues, R.C.D and Negrisoni-Jr, A.S. (2003) Patogenicidade de *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: Rhabditida) a ninfas da cigarrinha da raiz da cana de açúcar *Mahanarva fimbriolata*. *Rev. Agricultura.* **78**, 139-148.
- Li, X-Y, Cowles, E.A., Cowles, R.S. Gaugler, R. and Cox-Foster, D. L. (2009) Characterization of immunosuppressive surface coat proteins from *Steinernema glaseri* that selectively kill blood cells in susceptible hosts. *Mol. Biochem. Parasitol.* **165**, 162-169.
- Li, X-Y., Cowles, R.S., Cowles, E.A., Gaugler, R. and Cox-Foster, D.L. (2007) Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. *Int. J. Parasitol.* **37**, 365-374.
- Mamiya, Y. (1987) *Application of entomogenous nematode on pine logs infested with pine sawyer, Monochamus alternatus*. In: Recent Advances in Biological Control of Insect Pests by Entomogenous Nematodes in Japan. ed. Ministry of Education, Japan. **31**
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M-W., Rahme, L.G. and Ausubel (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell.* **96**, 47-56.
- Maizels, R.M., Blaxter, M.L. and Scott, A.L. (2001) Immunological genomics of *Brugia malayi* filarial genes implicated in immune evasion and protective immunity. *Parasite Immunol.* **23**, 327-344.
- Mannion, C. M. and Jansson, R.K. Infectivity of five entomopathogenic nematodes to the sweetpotato weevil, *Cylas formicarius* (F.), (Coleoptera: Apionidae) in three experimental arenas. *J. Inver. Pathol.* **62**, 29-36.
- McDaniel, R., Thamchaipenet, A., Gustafsson, C., Fu, H., Betlach, Me., Betlach, Ma. and Ashley, G. (1999) Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products. *PNAS.* **96**, 1846-1851.

- Millar, L.C. and Barbercheck, M.E., (2001) Interaction between endemic and introduced entomopathogenic nematodes in conventional-till and no-till corn. *Biol. Control*. **22**, 235–245
- Milstead, J.E. (1979) *Heterorhabditis bacteriophora* as a vector for introducing its associated bacterium into the hemocoel of *Galleria mellonella* larvae. *J. Inv. Pathol.* **33**, 324-327.
- Molta, N.B. and Hominick, W.M. (1989) Dose and time response assessments of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Rhabditida) against *Aedes aegypti* larvae. *Entomophaga*. **34**, 485 – 493.
- Montiel, R., Lucena, M.A., Medeiros, J. and Simões, N. (2006) The complete mitochondrial genome of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*: insights into nematode mitochondrial DNA evolution and phylogeny. *J. Mol. Evol.* **62**, 211-225.
- Mullens, B. A., Meyer, J.A. and Georgis, R. (1987) Field tests of insect-parasitic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) against larvae of manure-breeding flies (Diptera: Muscidae) on caged-layer poultry facilities. *J. Econ. Entomol.* **80**, 438 – 442.
- Navon, A.; Keren, S.; Salame, S. and Glazer, I. (1999) An edible-to-insects calcium alginate gel as a carrier for entomopathogenic nematodes. *Biocontrol. Sci. Technol.* **8**, 429-437.
- Negrisol-Jr, A.S., Barbosa, C.R.C. and Moino Jr, A. (2008) Comparação entre metodologias de avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida). *Nematologia Brasileira Piracicaba*. **32**: 65-75.
- Neves, J.M., Teixeira, J.A., Simões, N. and Mota, M. (1998) Produção de nemátodos entomopatogênicos *Steinernema* spp. em fermentador airlift não convencional: avaliação da eficácia. *Biotec.* **98**, 216.
- Neves, J.M., Mota, M., Simões, N. and Teixeira, J.A. (1996) A rapid method for adults separation from a mixed population of *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). *Fund. Appl. Nematol.* **19**, 103-106.
- Nguyen, K.B. and Smart Jr, G.C. (1992) Life cycle of *Steinernema scapterisci* Nguyen & Smart, 1990. *J. Nematol.* **24**, 160-169.
- Orhan, I., Tosun, F. and Sener, B. (2008) Coumarin, anthraquinone and stilbene derivatives with anticholinesterase activity. *Z Naturforsch.* **63**, 366-370.
- Ortiz-Urquiza, A., Riveiro-Miranda, L., Santiago-Álvarez, C. and Quesada-Moraga, E. (2010) Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Inverteb. Pathology*. **105**, 270-280.
- Pace, G. W. ; Grote, W. and Pitt, J.M. (1986) Liquid cultures of nematodes. Patent International Publication Number WO 86/01094 1-1.
- Paracer, S., and Ahmadjian, V. (2000) Symbiosis. An Introduction to Biological Associations. Oxford: Oxford University Press.

- Parkhill, J., Wren, W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T.G., Prentice, M.B., Sebaihia, M., James, K. D., Churcher, C., Mungall, K.L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S.D., Brooks, K., Cerdeño-Tárraga, A.M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R.M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P.C.F., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. and Barrell, B.G. (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*. **413**, 523-527.
- Pereault, R.J., Whalon, M.E. and Alston, D.G. (2009) Field efficacy of entomopathogenic fungi and nematodes targeting caged last-instar plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in Michigan cherry and apple orchards. *Environ. Entomol.* **38**, 1126-1134.
- Pereira, C. (1937) *Rhabdtis hambletoni* n.sp., nema aparentemente semi-parasito da "bróca do algodoeiro" (*Gasterocercodes brasiliensis*). *Arch. Inst. Biologico.* **8**, 214-230.
- Peters, A. and Ehlers, R-U. (1994) Susceptibility of leatherjackets (*Tipula paludosa* and *Tipula oleracea*, Tipulidae, Nematocera) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *J. Inver. Pathol.* **63**, 163-171.
- Poinar, G.O., Presser, S.B., Hardy, J.L. and Thomas, G.M. (1982). Inoculation of entomogenous nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* and their associated bacteria *Xenorhabdus* spp. into chicks and mice. *Environ. Entomol.* **11**, 137-138.
- Poinar, G.O. (1983) The Natural History of Nematodes. 322pp. Prentice-Hall, Englewood Cliff, New Jersey.
- Poinar, G.O. Jr. (1985) *Neoaplectana intermedia* n. sp. (Steinernematidae: Nematoda) from South Carolina. *Revue de Nematologie.* **8**, 321-327.
- Poinar, G.O. and Thomas, G.M. (1985) Laboratory infection of spiders and harvestmen (Arachnida: Araneae) and Opiliones with neoplectanid and heterorhabditid nematodes (Rhabditidoidea). *J. Arachnol.* **13**, 297-302.
- Poinar, G.O. (1990). *Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae*. In: Gaugler, R.; Kaya, H.K. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. p. 23-60 Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Poinar, G.O. (1993) Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids. *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Fundamental and Appl. Nematology.* **16**, 333-338.
- Platzer, E.G. (1981) Biological control of mosquitoes with mermithids. *Journal of Nematology.* **13**, 257-262.
- Popiel, I. and Hominick, W.M. (1990) Nematodes as biological control agents: part II. *Advances in Parasitol.* **31**, 381-431.
- Renn, N. (1998) Routes of penetration of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* attacking larval and adult houseflies (*Musca domestica*). *J. Inver. Pathol.* **72**, 281-287.
- Rosa, J.M.O., Wilcken, S.R.S., Aguilera, M.M. and Leite, L.G. (2007) Suscetibilidade de *Conitermes cumulans* (Kollar, 1832) a isolados de

nematoides entomopatogênicos. *Nematologia Brasileira Piracicaba*. **31**, 210-221.

Sandhu, S.K., Jagdale, G.B., Hogenhout, S.A., and Grewal, P.S. (2006) Comparative analysis of the expressed genome of the infective juvenile entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **145**, 239–244.

Sergeant, M., Baxter, L., Jarret, P., Shaw, E. Ousley, M., Winstanley, C. and Morgan, J. A.W. (2006) Identification, typing and insecticidal activity of *Xenorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in United Kingdom soil and characterization of the *xpt* toxin loci. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5895-5907.

Shapiro-Ilan, D., Morales-Ramos, J.A., Rojas, M.G. and Tedders, W.L. (2010) Effects of a novel entomopathogenic nematode-infect host formulation on cadaver integrity, nematode yield, and suppression of *Diaprepes abbreviatus* and *Aethina tumida*. *J. Inver. Pathol.* **103**, 103-108.

Shapiro-Ilan, D., Mizell, R.F., Cottrell, T.E. and Horton, D.L. (2008) Control of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, with entomopathogenic nematodes: effects of application timing, alternate host plant and nematode strain. *Biological Control.* **44**, 207-215.

Shapiro-Ilan, D., Glazer, I. and Segal, D. (1996) Trait stability and fitness of the heat tolerant entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* IS5 strain. *Biological Control.* **6**, 238-244.

Sicard, M., Hering, S., Schulte, R., Gaudriault, S. and Schulenburg, H. (2006) The effect of *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) on the survival, development, reproduction and behaviour of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae). *Environ. Microbiol.* **9**, 12-25.

Silva, C.P., Waterfield, N.R., Daborn, P.J., Dean, P., Chilver, T., Au, C.P.Y., Sharma, S., Potter, U., Reynolds, S.E. and French-Constant, R.H. (2002) Bacterial Infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. *Cell. Microbiol.* **4**, 329-339.

Sinkins, S.P. (2004) *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 723-729.

Sosa-Jr., O., Hall, D.G. and Schroeder, W.J. (1993) Mortality of sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae) treated with entomopathogenic nematodes in field and laboratory trials. American Society of Sugar Cane Technologists. Florida and Louisiana Divisions, **13**. 18-21.

Stanley, D. (2006) Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Ann. Reviews Entomol.* **51**, 25-44.

Stouthamer, R., Breeuwer, J.A.J. and Hurst, G.D.D. (1999) *Wolbachia pipientis* : microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 71–102

Strauch, O. and Ehlers, R-U. (1998) Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 369-374.

- Surth, J-Y. (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*. **3**, 768-780.
- Tavares, F. M., Batista Filho, A., Leite, L.G., Almeida, L.C., Silva, A.C. and Ambrós, C.M.G. (2007) 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 Piracicaba*. **31**, 12-19.
- Thaler, J-O., Duvic, B., Givaundan, A. and Boemare, N. (1998) Isolation and entomotoxic properties of the *Xenorhabdus nematophilus* F1 lecithinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2367-2373.
- Toledo, A.V.; de Remes Lenicov, A.M. and Lopez-Lastra, C.C. (2010) Histopathology caused by the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, in the adult planthopper, *Peregrinus maidis*, a maize virus vector. *J. Insect Science*. **10**, 35.
- Tomalak, M. (1994) Selective breeding of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Nematoda: Steinernematidae) for improved efficacy in control of a mushroom fly, *Lycoriella solani* Winnertz (Diptera: Sciaridae). *Biocontrol Sci. Technol.* **4**, 187-198.
- Ulrich, S., Wolter, F. and Stein, J.M. (2005) Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol. Nutr. Food. Res.* **49**, 452-461.
- Vallet-Gely, I., Lemaitre, B. and Bocard, F. (2008) Bacterial strategies to overcome insect defenses. *Nature Review Microbiol.* **6**, 302-313.
- Waterfield, N.R., Bowen, D.J., Fetherson, J.D., Perry, R.D. and ffrench-Constant, R.H. (2001) The tc genes of *Photorhabdus*: a growing family. *Trends in Microbiol.* **9**, 185-191.
- Waterfield, N. R., Hares, M., Yang, G., Dowling, A. and ffrench-Constant, R.H. (2005) Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. *Cell. Microbiol.* **7**, 373-382.
- Weiss, B.L., Wang, J. and Aksoy, S. (2011) Tsetse immune system maturation requires the presence of obligate symbionts in larvae. *Plos Biology*. **9**. <doi:10.1371/journal.pbio.1000619>
- Wilkinson, P., Waterfield, N.R., Crossman, L., Corton, C., Sanchez-Contreras, M., Vlisidou, I., Barron, A., Bignell, A., Clark, L., Ormond, D., Mayho, M., Bason, N., Smith, F., Simmonds, M., Churcher, C., Harris, D., Thompson, N. R., Quail, M., Parkhill, J. and ffrench-Constant, R.H. (2009). Comparative genomics of the emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* with the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*. *BMC Genomics*. **10**, 1-22.
- Wilkinson P, Paszkiewicz K, Moorhouse A, Szubert JM, Beatson S, Gerrard J, Waterfield NR, ffrench-Constant RH. (2010) New plasmids and putative virulence factors from the draft genome of an Australian clinical isolate of *Photorhabdus asymbiotica*. *FEMS Microbiol. Lett.* **309**, 136-143.
- Willians, J.S., Thomas, M. and Clarke, D.J. (2005) The gene stIA encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene

antibiotic in *Photorhabdus luminescens* TT01. *Microbiology*. **151**, 2543-2550.

Wilson, M. and Gaugler, R. (2004) Factors limiting short-term persistence of entomopathogenic nematodes. *J. Appl. Entomol.* **128**, 250-253.

Wilson, M. and Ivanova, E. (2004) Neutral density liquid formulations for nematode-based biopesticides. *Biotechnol. Lett.* **26**, 1167-1171.

Womerseley, C.Z. (1990) *Dehydration survival and anhydrobiotic potential*. In: *Biological Control in Agricultural IMP Systems*. eds. Hoy, M.A. and Herzog, D.C. p. 117-137. Academic Press, New York.

Wood, W.B. (1988) *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor, 678pp. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Yamanaka, K., Seta, K. & Yasuda, M. (1986) Evaluation of the use of entomogenous nematode, *Steinernema feltiae* (Str. Mexican) for the biological control of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, (Lepidoptera: Arctiidae). *Japanese J. of Nematol.* **16**, 26.

Zimmerman, R.J. and Cranshaw, W.S. (1990) Compatibility of entomogenous nematodes (Rhabditida) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenance. *J. Econom. Entomol.* **83**, 97-100.