



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ
CAMPUS LUIZ MENEGHEL
MESTRADO EM AGRONOMIA

MARIANA FERRACIN DE MACEDO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO
ISOLADO DE NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis* sp. UENPn-01
OBTIDO EM ÁREA DE PASTAGEM NO MUNICÍPIO DE RIBEIRÃO CLARO,
PARANÁ**

BANDEIRANTES, PR, BRASIL

2020

MARIANA FERRACIN DE MACEDO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO
ISOLADO DE NEMATOIDE ENTOMOPATOGENICO *Heterorhabditis* sp. UENPn-01
OBTIDO EM ÁREA DE PASTAGEM NO MUNICÍPIO DE RIBEIRÃO CLARO,
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte
do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

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

BANDEIRANTES, PR, BRASIL

2020

Ferracin de Macedo, Mariana
FM141i Identificação molecular e caracterização morfológica
do isolado de nematoide entomopatogênico
Heterorhabditis sp. UENPn-01 obtido em área de
pastagem no município de Ribeirão Claro, Paraná. /
Mariana Ferracin de Macedo; orientadora Viviane
Sandra Alves - Bandeirantes, 2020.
57 p. :il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade
Estadual do Norte do Paraná, Centro de Ciências
Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.

1. Controle Biológico. 2. Entomopatógeno. 3.
Análise Molecular. I. Alves, Viviane Sandra, orient.
II. Título.

MARIANA FERRACIN DE MACEDO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO
ISOLADO DE NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis* sp. UENPn-01
OBTIDO EM ÁREA DE PASTAGEM NO MUNICÍPIO DE RIBEIRÃO CLARO,
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte
do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Viviane Sandra Alves

Prof^a. Dr^a. Bruna Aparecida Guide

Prof^o Dr^o Dhiego Gomes Ferreira

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Santa Terezinha do Menino Jesus, por todas as bênçãos derramadas em minha vida e por me ajudar a superar todos os obstáculos.

Aos meus pais José e Regina, por serem meu apoio, minha base e, por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao meu irmão, Gustavo, por toda parceria, ajuda e incentivo.

A minha família, principalmente a minha avó Benedita, que é o nosso alicerce.

A minha tia e madrinha, Fátima, por ser tão companheira comigo.

Ao meu amigo e namorado, Murilo, que me incentivou e apoiou.

Aos meus amigos, que sempre torceram por mim e me fizeram companhia, além de boas risadas em todos momentos.

A minha amiga e parceira de laboratório, Gabriela, por todo aprendizado quando ingressei no LECOM, por toda a ajuda e por sofrer comigo durante os trabalhos realizados.

A minha orientadora Vivi, que me deu a oportunidade de entrar no LECOM como estagiária antes de ser aluna do programa de pós-graduação. A partir daí, todo aprendizado foi fundamental para chegar até aqui. Obrigada por todo apoio, e por acreditar sempre em mim. Obrigada pela amizade. Obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Dhiego Gomes Ferreira, por toda ajuda e paciência para que este trabalho pudesse acontecer.

A Prof. Dra. Vanessa Andaló, pela colaboração e ajuda.

Aos meus parceiros do LECOM, por toda ajuda e ensinamento.

E a todos que de alguma forma puderam contribuir para a realização deste trabalho.

A CAPES pela concessão de bolsa.

Epígrafe

“Só sabe ensinar quem sabe aprender.”

Mario Sergio Cortella

MACEDO, MARIANA. F. **Identificação molecular e caracterização morfológica do isolado de nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis* sp. UENPn-01 obtido em área de pastagem no município de Ribeirão Claro, Paraná.** 2020. Defesa de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2020.

RESUMO

Nematoides são vermes pertencentes ao Filo Nematoda, que possuem hábitos diversificados, com grupos parasitas de plantas, parasitas humanos e há também os nematoides parasitas de insetos, conhecidos como nematoides entomopatogênicos (NEPs). Os NEPs podem ser encontrados em praticamente todo o mundo, sendo isolados de diferentes ecossistemas a partir de amostras de solo, ou de insetos infectados encontrados no campo, e no Brasil, existem aproximadamente 54 isolados registrados. No estado do Paraná, há registro de apenas uma espécie de nematoide entomopatogênico, *Heterorhabditis amazonensis*, demonstrando a importância e a necessidade de conhecer melhor este grupo de entomopatógenos em nosso estado. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a identificação e caracterização de um isolado de nematoide pertencente ao gênero *Heterorhabditis* sp., isolado no Município de Ribeirão Claro, PR. A obtenção do isolado foi realizada através de coletas de solo, e utilizou-se a técnica de “iscas-vivas” com lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). A identificação molecular do isolado de NEP foi realizada a partir da amplificação da região ITS e também da região D2D3, bem como, por meio de medição de estruturas para identificação morfológica. Realizaram-se também fotos de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para análise de estruturas morfológicas. Além disso, foi avaliada a patogenicidade sobre lagartas de *G. mellonella* e observação do ciclo de vida. No processo de identificação molecular a partir da região ITS, observou-se similaridade de 98,64% com *Heterorhabditis mexicana* e 98,57% com *Heterorhabditis taysearae*, e na região D2D3 uma similaridade de 96,94% com *H. mexicana*. Com relação a identificação morfológica, observou-se que o isolado apresenta diferenças nas medições quando comparado a *H. mexicana*, porém apresenta uma característica similar nos machos no qual, o poro excretor é localizado posteriormente ao bulbo basal. Nas fotos de MEV, pode-se observar estruturas das fêmeas hermafroditas, fêmeas de segunda geração e machos, observando-se na região anterior, a presença das papilas labiais em todos os NEPs. Nas fêmeas, observa-se a vulva na região mediana do corpo, bem como a cauda e o ânus na região posterior. Nos machos, na parte posterior, nota-se a cauda e a espícula. No teste de patogenicidade, o isolado causou mortalidade de 88% de lagartas de *G. mellonella*, e quanto ao ciclo de vida o isolado UENPn-01 apresentou ciclo característico do gênero *Heterorhabditis*, com a primeira geração apenas de fêmeas hermafroditas, seguido de três gerações com a presença de machos e fêmeas, totalizando quatro gerações completas dentro do hospedeiro.

Palavras-chave: Controle Biológico; Entomopatógeno; Análise Molecular.

MACEDO, MARIANA. F. **Molecular identification and morphological characterization of the entomopatogenic nematode isolate *Heterorhabditis* sp. UENPn-01 obtained in a grazing area in the municipality of Ribeirão Claro, Paraná.** 2020. Defesa de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2020.

ABSTRACT

Nematodes are worms belonging to the Phylum Nematoda, which have diversified habits, with parasitic groups of plants, human parasites and also insect parasitic nematodes, known as entomopathogenic nematodes (NEPs). NEPs can be found practically all over the world, being isolated from different ecosystems from soil samples, or from infected insects found in the field, and in Brazil, there are approximately 54 registered isolates. In the state of Paraná, there is only one species of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis amazonensis*, showing the importance and the need to better understand this group of entomopathogens in our state. Thus, the objective of this work was to identify and characterize a nematode isolate belonging to the genus *Heterorhabditis* sp., Isolated in the city of Ribeirão Claro, PR. The isolation was obtained by collecting soil, and the technique of "live baits" with caterpillars of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) was used. The molecular identification of the NEP isolate was carried out by amplifying the ITS region and also the D2D3 region, as well as by measuring structures for morphological identification. Scanning Electron Microscopy (SEM) photos were also taken to analyze morphological structures. In addition, the pathogenicity of *G. mellonella* caterpillars and observation of the life cycle were evaluated. In the molecular identification process from the ITS region, 98.64% similarity was observed with *Heterorhabditis mexicana* and 98.57% with *Heterorhabditis taysearae*, and in the D2D3 region, 96.94% similarity with *H. mexicana*. Regarding the morphological identification, it was observed that the isolate presents differences in measurements when compared to *H. mexicana*, however it has a similar characteristic in males in which the excretory pore is located posteriorly to the basal bulb. In the SEM photos, it is possible to observe structures of the hermaphroditic females, second generation females and males, observing the presence of the labial papillae in all NEPs in the anterior region. In females, the vulva is observed in the median region of the body, as well as the tail and anus in the posterior region. In males, in the posterior part, the tail and spike can be noticed. In the pathogenicity test, the isolate caused 88% mortality of *G. mellonella* caterpillars, and as for the life cycle, the UENPn-01 isolate presented a cycle characteristic of the genus *Heterorhabditis*, with the first generation of hermaphrodite females only, followed by three generations with the presence of males and females, totaling four complete generations within the host.

Key-words: Biological Control. Entomopathogen. Molecular Analysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	3
2.1 NEMATOIDES ENTOMOPATOGENÉTICOS.....	3
2.2 BIOLOGIA: CICLO DE VIDA.....	5
2.2.1. Gêneros <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i>	5
2.4 ECOLOGIA E COMPORTAMENTO DOS NEMATOIDES ENTOMOPATOGENÉTICOS.....	7
2.5 DISTRIBUIÇÕES GEOGRÁFICAS.....	9
2.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA.....	12
3. ARTIGO A: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO DE NEMATOIDE ENTOMOPATOGENÉTICO <i>Heterorhabditis</i> sp. UENPn-01	15
3.1 RESUMO.....	15
3.2 INTRODUÇÃO.....	16
3.3 MATERIAL E MÉTODO	17
3.3.1 Obtenção e manutenção do isolado	17
3.3.2 Identificação molecular.....	18
3.3.2.1 Extração de DNA.....	18
3.3.2.2 Quantificação de DNA.....	19
3.3.2.3 Amplificação das regiões ITS via PCR	19
3.3.2.4 Confirmação da Amplificação em Gel de Agarose 1%.....	20
3.3.2.5 Sequenciamento	21
3.3.2.6 Árvore filogenética e tabela de similaridade	21
3.3.3 Identificação morfológica e morfométrica.....	22

3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	22
3.3.5 Teste de patogenicidade e virulência	23
3.3.6 Ciclo de vida	23
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.4.1 Isolado UENPn-01	25
3.4.2 Identificação molecular.....	26
3.4.3 Identificação morfológica e morfométrica.....	30
3.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	35
3.4.5 Teste de patogenicidade e virulência	36
3.4.6 Ciclo de vida	37
3.5 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 Isolados identificados no Brasil	11
TABELA 3. 1 Locais de coleta de solo e número de amostras coletadas visando o isolamento de nematoides entomopatogênicos na região Norte do Estado do Paraná.....	17
TABELA 3.2 Locais de coletas de solo e número de amostras positivas.....	25
TABELA 3.3 Distâncias em pares das regiões ITS do rDNA entre espécies de <i>Heterorhabditis</i>	29
TABELA 3.4 Morfometria de <i>Heterorhabditis</i> sp. UENPn-01. As medidas são em μM na forma: média $\pm$ dp (variação) (N=25).	31
TABELA 3.5 Comparação morfométrica em μm de machos de <i>Heterorhabditis</i> sp. UENPn-01 com outras espécies do gênero <i>Heterorhabditis</i>	33
TABELA 3.6 Comparação morfométrica em μm de Juvenil Infectante de <i>Heterorhabditis</i> sp. UENPn-01 com outras espécies do gênero <i>Heterorhabditis</i>	34
TABELA 3.7 Taxa de mortalidade confirmada (%) de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com isolado UENPn-01 após cinco dias.	37
TABELA 3.8 Ciclo curto: duração dos estágios de desenvolvimento do isolado UENPn-01 em lagartas de <i>Galleria mellonella</i> (concentração de nematoide usada para inoculação foi de 400 JIs/lagarta).	38

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 Ciclo de vida de Steinernematidae e Heterorhabditidae	6
FIGURA 2.2 Diagrama do DNAr.....	13
FIGURA 3.1 Confirmação de amostras de DNA no gel de agarose	21
FIGURA 3.2 Sintomas do isolado <i>Heterorhabditis</i> sp. UENPn-01 em lagartas de <i>Galleria mellonella</i>	26
FIGURA 3.3 Relações filogenéticas de juvenis infectantes de <i>Heterorhabditis</i> sp. (UENPn-01) baseadas na análise de regiões ITS do rDNA inferidas pela análise de máxima parcimônia (MP). <i>Oscheius chongmingensis</i> , <i>Pellioditis typica</i> e <i>Caenorhabditis elegans</i> foram usados como grupo externo.	27
FIGURA 3.4 Relações filogenéticas de juvenis infectantes de <i>Heterorhabditis</i> sp. (UENPn-01) baseadas na análise de regiões 28S-rDNA- D2/D3 LSU do rDNA inferidas pela análise de máxima parcimônia. <i>Oscheius chongmingensis</i> e <i>Caenorhabditis elegans</i> foram usados como grupo externo.....	29
FIGURA 3.5 fotos de microscopia eletrônica de varredura das fêmeas e macho do isolado <i>Heterorhabditis</i> sp. UENPn-01	35

1. INTRODUÇÃO

Nematoides são vermes pertencentes ao Filo Nematoda, em sua maioria pequenos, com corpo cilíndrico e alongado, sendo possivelmente o maior grupo pluricelular do planeta (HOLTERMAN, 2008). Possuem hábitos diversificados, com grupos parasitas de plantas, como as espécies do gênero *Meloidogyne* Goeldi (1887), que atacam raízes. Espécies parasitas humanos como *Ascaris lumbricoides* Lineu (1758) e há também os nematoides parasitas de insetos, conhecidos como nematoides entomopatogênicos (NEPs), que são agentes promissores para o controle biológico de pragas (VOSS et al., 2009).

Os NEPs pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda: Secernentea), e estão distribuídos dentro de duas famílias: Steinernematidae que contém os gêneros *Neosteinerinema* e *Steinerinema* e Heterorhabditidae, que contém apenas o gênero *Heterorhabditis* (DOLINSKI; MOINO JR, 2006).

Estes organismos podem ser encontrados em praticamente todo o mundo, e em diferentes ecossistemas (STOCK, 2015). Eles podem ser isolados a partir de amostras de solo ou de insetos infectados encontrados no campo. No Brasil, segundo Dolinski et al. (2017) existem aproximadamente 54 isolados, pertencentes a diferentes espécies de ambos os gêneros citados. Entre esses isolados, dois são espécies nativas, sendo *Heterorhabditis amazonensis* (ANDALÓ et al., 2006) encontrado no estado do Amazonas e *Steinerinema brasiliense* (NGUYEN et al., 2010) isolado no estado do Mato Grosso (DOLINSKI et al., 2017).

No estado do Paraná, há registro de apenas três isolados (UEL 01, UEL 07 e UEL 08) de NEPs, que foram identificados como *Heterorhabditis amazonensis* (GUIDE, 2019).

Por outro lado, há que se ressaltar que o conhecimento de espécies endêmicas é de suma importância principalmente quando se busca o controle de insetos pragas também endêmicos. Neste sentido, alguns estudos estão sendo desenvolvidos com o intuito de isolar espécies de NEPs na região do Norte Pioneiro do estado do Paraná, a fim de conhecer as espécies que aqui ocorrem, bem como poder utilizá-las em programas de controle de pragas locais.

Nesse sentido, o Laboratório de Entomologia e Controle Microbiano (LECOM) da UENP, vem desenvolvendo trabalhos de isolamento de NEPs a partir de amostras

de solo, e conta atualmente com sete isolados, dos quais ainda não se sabe a respeito de aspectos biológicos e a qual ou quais s espécies pertencem.

Assim, este trabalho teve como objetivo realizar a identificação molecular e a caracterização morfológica do isolado de nematoide *Heterorhabditis* sp. UENPn-01, coletado em área de pastagem no Município de Ribeirão Claro, PR.

2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 NEMATOIDES ENTOMOPATOGENICOS

São considerados nematoides entomopatogênicos (NEPs) todos aqueles que são capazes de infectar os insetos e causar sua morte. Os principais representantes estão distribuídos entre as famílias Mermithidae, Sphaerulariidae, Steinernematidae e Heterorhabditidae (POPIEL; HOMINICK, 1992).

Entre os nematoides capazes de infectar insetos, há grupos que podem ser parasitos facultativos ou obrigatórios. No caso de parasitos facultativos, estes se alimentam de fungos e bactérias presentes no ambiente, mas também podem parasitar insetos (POPIEL; HOMINICK, 1992). No entanto, estes grupos não são muito específicos quanto ao parasitismo, e por isso não são muito utilizados em programas de controle biológico. Uma exceção a essa afirmação, é o caso da espécie *Deladenus siricidicola* Bedding, 1968, da família Sphaerulariidae, que é utilizada no controle da vespa da madeira, *Sirex noctilio* Fabricius, 1793 (ALMENARA et al., 2012). O parasitismo facultativo do nematoide *D. siricidicola* apresenta-se como uma vantagem, pois, na ausência do inseto, o nematoide se alimenta de um fungo (*Amylostereum areolatum* (Chaillet) Boidin 1958), que é disseminado pela própria vespa-da-madeira, pois suas larvas também se alimentam desse fungo. Deste modo, na ausência do inseto, *D. siricidicola* pode completar seu ciclo, alimentando-se apenas do fungo, mas quando o inseto está presente, pode parasitá-lo e o usa como veículo de dispersão para outras árvores (POPIEL; HOMINICK, 1992).

Os nematoides que são parasitos obrigatórios, são aqueles que se desenvolvem parcialmente ou totalmente dentro de um hospedeiro, como por exemplo, os nematoides da família Mermithidae, que quando estão na última fase juvenil (J4), saem do corpo do hospedeiro e vão para o solo para passar à fase adulta e se reproduzir (POPIEL; HOMINICK, 1992; FERRAZ, 1998). No entanto, embora os mermitídeos sejam parasitos obrigatórios, sua utilização no controle de insetos não é viável em larga escala, pois são difíceis de serem multiplicados em laboratório, visto que necessitam de hospedeiros e não podem ser multiplicados *in vitro* (POPIEL; HOMINICK, 1992).

Há ainda, as espécies do gênero *Heterorhabditis* e *Steinernema* que são parasitos obrigatórios e possuem relação com o hospedeiro de forma nutricional. Quando

entram no interior do hospedeiro, eles liberam uma bactéria simbiote, que é a principal responsável pela morte do inseto por septicemia (FERRAZ, 1998). Assim, os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, pertencentes respectivamente às famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae, compreendem as espécies mais utilizadas no controle biológico, pois a simbiose com bactérias associada a capacidade de localizar e invadir o interior dos hospedeiros, torna-os agentes bastante eficientes, capazes de causar a morte do hospedeiro em um período de 24 a 48 horas (FERRAZ, 1998; CHASTON; GOODRIH-BLAIR, 2010). Além disso, estes dois gêneros de NEPs, podem ser multiplicados *in vitro*, o que viabiliza seu uso em programas de controle biológico.

A simbiose dos NEPs com as bactérias é muito importante. Além de matar o hospedeiro rapidamente, a bactéria metaboliza os tecidos internos do mesmo o que facilita a alimentação do nematoide. As bactérias também controlam o microecossistema (interior do cadáver) para que não ocorra infecção por outros agentes microbianos que estão presentes no ambiente, através da síntese de vários metabólitos secundários, que, entre outras funções, podem ter ação antibiótica sobre outros micro-organismos (ALMENARA et al., 2012).

Cada espécie de NEP possui particularidades em relação a bactéria simbiote. Em geral bactérias simbiotes que são do gênero *Xenorhabdus* (Poinar e Thomas, 1979) e *Photorhabdus* (Thomas e Poinar, 1979) e associam-se com nematoides dos gêneros *Steinernema* (Travassos, 1927) e *Heterorhabditis* (Poinar, 1975) respectivamente (ANDALÓ et al., 2009a).

Estas bactérias são pertencentes a família Enterobacteriaceae, Gram-negativas, com forma de bastonetes, anaeróbias facultativas (FORST et al., 1997; FORST; CLARKE, 2002) que produzem metabólitos secundários e podem ser produzidas em larga escala (BOEMARE, 2002). As bactérias do gênero *Xenorhabdus* encontram-se em uma vesícula no interior do intestino dos juvenis infectantes (JIs), que ao entrarem no hospedeiro as defecam; já as bactérias do gênero *Photorhabdus* ficam espalhadas na parte anterior do intestino dos JIs, e uma vez no interior do hospedeiro, eles regurgitam as bactérias (FERRAZ et al., 2008).

As bactérias, quando liberadas na hemolinfa do inseto, se proliferam e produzem toxinas e exoenzimas que são responsáveis pela morte do inseto. Além disso, elas fazem com que o interior do inseto se torne um caldo nutritivo, propício para o nematoide se desenvolver no seu interior. As bactérias também fornecem a base de nutrientes para o

crescimento e desenvolvimento do nematoide, sintetizando metabólitos e vitaminas importantes para sua nutrição. (FORST; CLARKE, 2002).

Em função da produção destes metabólitos, o inseto morto pelo complexo nematoide-bactéria apresenta características que indicam se a morte foi por infecção por nematoides, bem como de qual gênero. Assim, insetos mortos por nematoides do gênero *Steinernema*, apresentam coloração amarelada, característica das bactérias *Xenorhabdus*. Por outro lado, se a morte se deu por infecção de nematoides do gênero *Heterorhabditis*, o cadáver apresenta coloração marrom escuro, característica das bactérias *Photorhabdus*, que além da pigmentação, apresentam também bioluminescência (VOSS et al., 2009; ALMENARA et al., 2012). No entanto, cabe ressaltar, que estas características sintomatológicas podem apresentar variações.

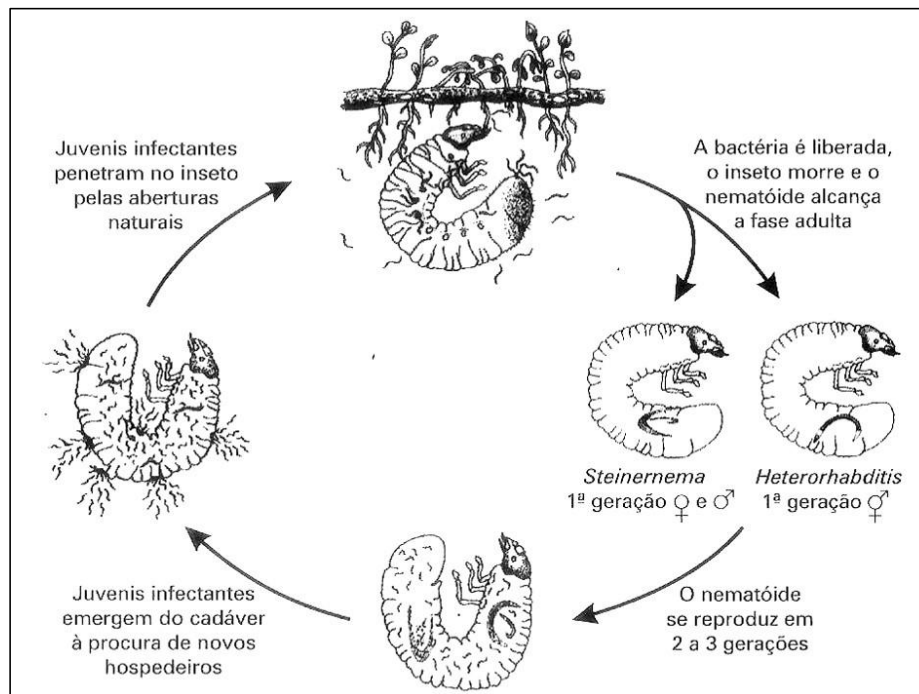
2.2 BIOLOGIA: CICLO DE VIDA

2.2.1. Gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*

O ciclo de vida dos NEPs, a patogenicidade e a virulência podem variar de acordo com o gênero, espécie e população (ANDALÓ et al., 2004). Para a grande maioria das espécies, as fases de desenvolvimento são ovos, juvenis e adultos. A fase juvenil se subdivide em quatro instares J1, J2, J3 (também chamado de Juvenil Infectante = JI) e J4 (ANDALÓ et al., 2009).

O ciclo de vida de ambos os gêneros de NEPs são muito parecidos. O processo de infecção inicia quando os JIs penetram no hospedeiro através de aberturas naturais, como boca, espiráculos ou ânus (FERRAZ et al., 2008). Os JIs de terceiro estágio se alimentam desse interior, passando para o último estágio juvenil (J4), e em seguida dão origem a machos e fêmeas (adultos) de primeira geração. Após o acasalamento, as fêmeas de primeira geração colocam ovos, que ao eclodirem, dão origem aos juvenis de primeiro estágio (segunda geração) (ADAMS; NGUYEN, 2002) (Figura 2.1).

Figura 2.1 Ciclo de vida de nematoides das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae.



Fonte: Ferraz et al., 2008, p. 175

No gênero *Heterorhabditis*, o ciclo de vida é parecido com o *Steinernema*, com a diferença que, na primeira geração, são produzidos apenas adultos hermafroditas com morfologia de fêmeas, cujos ovos são produzidos por autofecundação. Destes ovos, eclodem juvenis de primeiro estágio, que vão se diferenciar em machos e fêmeas de segunda geração (ADAMS; NGUYEN, 2002). Outra diferença importante, é que os JIs do gênero *Heterorhabditis* possuem um dente quitinoso, que permite que perfurem o exoesqueleto do inseto, em regiões mais articuladas (FORST; CLARKE, 2002).

Em ambos os gêneros, após a formação da segunda geração, os ciclos continuam até que se esgotem as fontes de alimento, ou seja, quando o inseto já se encontra em estado de decomposição. A falta de alimento faz com que o nematóide pare seu desenvolvimento na fase de J3 (JI), quando estes saem do inseto para o solo em busca de um novo hospedeiro (ADAMS; NGUYEN, 2002; FERRAZ et al., 2008).

Os nematoides também podem apresentar variação na duração do ciclo de vida e isto pode estar relacionado à oferta de alimento no interior do inseto. Portanto, se houver

pouca fonte de alimento no interior do hospedeiro, os ovos da primeira geração dão origem aos J1, que em seguida se transformam em J2, e como a fonte de alimento está se esgotando, estes não se alimentam, ingerem uma quantidade de bactérias e mudam para estágio pré-infecciosos ou infecciosos (J3), retendo a cutícula do segundo estágio. Deste modo, eles deixam o cadáver e saem a procura de um novo hospedeiro. Caso não encontrem, eles podem sobreviver no solo por vários meses (ADAMS; NGUYEN, 2002).

2.4 ECOLOGIA E COMPORTAMENTO DOS NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

Nematoides podem ocorrer em diferentes habitats, tais como solos áridos e até em regiões aquáticas (DE LEY, 2006), e os potenciais de controle usando NEPs podem ser destacados pelo seu comportamento e sua ecologia.

Os juvenis infectantes possuem estratégias para procurar e reconhecer seu hospedeiro, que são evidenciadas quanto as diferenças entre os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*. Estas estratégias variam entre as espécies, podendo ser de emboscada “*ambusher*”, de busca direta “*cruiser*” ou “intermediário” (LEWIS, 2002).

O mecanismo de comportamento apresentado por espécies “*ambusher*” é através da nictação, isto é, eles ficam apoiados em sua cauda aguardando para “saltar” sobre o hospedeiro quando este se aproximar. Já os nematoides que possuem a estratégia “*cruiser*”, se movimentam ativamente no solo a procura de um hospedeiro (COSTA, 2006). Há também NEPs considerados “intermediários”, que são os que elevam parte do corpo no solo somente por poucos segundos e depois seguem movimentando-se em busca do hospedeiro (LEWIS, 2002).

Campbell e Gaugler (1993) observaram que os nematoides que fazem nictação como *Steinernema carpocapsae* são mais eficientes em localizar hospedeiros móveis do que *Heterorhabditis bacteriophora*, que é não-nictante.

Por outro lado, nematoides que conseguem se movimentar tem chances maiores de encontrar hospedeiros sedentários do que os de emboscada (FUGA et al., 2012). Para os nematoides com hábito “*cruiser*” a movimentação no solo se dá em resposta à alguns sinais do hospedeiro, que podem ser sinais voláteis ou não. Em geral, o nematoide pode se

orientar pela detecção de CO₂, liberado pela respiração do hospedeiro ou por excrementos como fezes (LEWIS, 2002).

Os NEPs que são considerados “*ambusher*” respondem aos compostos voláteis, mas de maneira diferente (LEWIS et al., 2006). Primeiramente, eles precisam ficar em contato com a cutícula do hospedeiro, para, posteriormente poder entrar pelos espiráculos, que é por onde sai o CO₂ (LEWIS, 2002; LEWIS et al., 2006).

Os NEPs intermediários possuem estratégias para a procura do hospedeiro, que vão de detecção de compostos voláteis como os “*cruisers*” à contato direto com o hospedeiro, como os “*ambushers*”, podendo ficar de pé e pular se prendendo no hospedeiro quando em movimento (LEWIS et al., 2006).

Outros estímulos além de CO₂ e das fezes liberados pelos insetos podem atrair estes organismos. Eles podem também se orientar detectando substâncias exaladas por plantas, que indicam o ataque de insetos pragas. Essas substâncias agem como caimônios, atraindo os NEPs e protegendo a planta do ataque de pragas. Trabalho realizado por van Tol et al. (2001) demonstrou que o nematoide *Heterorhabditis megidis* foi atraído pelas raízes de planta, popularmente conhecida por Tuia, quando atacada por um inseto. Outro exemplo são as raízes de cultivares de milho, que, quando atacadas por *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte (1868), liberam um composto chamado β -Cariofileno, que atraem inimigos naturais que estão no solo, como os NEPs (LEWIS et al., 2006; RIFFEL; COSTA, 2015).

Os NEPs são capazes responder a estímulos químicos, de contato, temperatura e a luminosidade, subdividido em dois órgãos sensitivos, cuticulares e internos. (JONES, 2002; TONELLI, 2014). O órgão presente na cutícula é capaz de identificar o composto químico, mecânico e temperatura; já o órgão interno intercepta melhor estímulos mecânicos, bem como fotorreceptores, também considerados internos (JONES, 2002).

Estudo desenvolvido por Shapiro- Ilan et al (2014), independentemente do hábito do NEP (*cruiser*, *ambusher* ou intermediário) os NEPs se movimentam em grupos no solo, possivelmente orientados por hormônios de agregação, ou por comportamentos de “seguir o líder”, o que aumenta as chances de infecção do hospedeiro com êxito, do que somente quando apenas um JI. Tal comportamento favorece a infecção e sucesso na morte do hospedeiro, além de possibilitar maiores chances de cruzamento e variabilidade genética entre a espécie de NEP (SHAPIRO-ILAN et al., 2014).

2.5 DISTRIBUIÇÕES GEOGRÁFICAS

Como dito anteriormente, os NEPs estão distribuídos em todo mundo, em diferentes solos e ecossistemas, podendo ser isolados por meio de amostras de solo ou de insetos já infectados (HOMINICK, 2002; DOLINSKI et al., 2017).

Os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* são considerados cosmopolitas geograficamente. Por exemplo, a espécie, *H. bacteriophora*, é encontrada na Europa, Américas, Ásia e entre outros lugares, assim como *S. carpocapse*. No entanto, há exceções entre os gêneros, pois há espécies que são mais restritas, como no caso de *S. kushidai*, encontrado até o momento somente no Japão (DOLINSKI; MOINO JUNIOR, 2006).

Há vários fatores que interferem na dispersão dos NEPs, tais como, aspectos geográficos, tipos de solo, clima e a disponibilidade de hospedeiro (STUART et al., 2015). Algumas espécies de nematoides possuem preferências em relação ao seu habitat, bem como para profundidade do solo (HOMINICK, 2002). Outros NEPs são mais encontrados em determinados tipos de solo, como por exemplo *H. indica* e *H. bacteriophora*, que foram isolados de solos mais arenosos da região costal das ilhas de Guadalupe (CONSTANT et al., 1998).

Segundo Poinar (1993), os heterorhabditídeos possuem ancestrais marinhos, enquanto o steinernematídeos, ancestrais terrestres. Assim, pode-se observar que há uma relação dos nematoides do gênero *Heterorhabditis* serem encontrados em solos mais arenosos (HOMINICK, 2002). Outros trabalhos relatam que espécies do gênero *Steinernema* tem outras preferências, como pastagens e matas (HOMINICK, 2002; STUART et al, 2015). Tarasco et al. (2015) fizeram coletas de solos em 11 habitats diferentes de várias regiões da Itália, obtendo 133 amostras de solos com a presença de 12 espécies diferentes de NEPs. Destas, as espécies *S. feltiae* e *H. bacteriophora* foram as mais abundantes em todas as áreas, e do total das amostras, 68% foram isoladas de solos arenosos, 24% de solos argilosos sedimentados e siltosos e apenas 8% foram isoladas em solo argiloso. A estrutura do solo, como as partículas, densidade e porosidade, pode afetar o movimento da água, do ar e dos micro-organismos ali presentes, sendo que, o solo que contém maior densidade e menos porosidade, dificulta a movimentação dos NEPs (STUART et al., 2015).

Em trabalho desenvolvido por Barbosa-Negrisoli et al. (2010) no estado do Rio Grande do Sul, os autores coletaram solos de diversas regiões do estado e observaram que

a maioria dos nematoides estavam em áreas de floresta e áreas cultivadas com soja e tabaco, e, a menor parte estava entre áreas de vegetação simples, floretas nativas, árvores frutíferas e plantações de milho. Nas áreas que são agricultáveis, a ocorrência de nematoides foi menor que 50%. Segundo estes autores, os tipos de solos podem influenciar na ocorrência de nematoides, pois os vertissolos (argilosos, pouco permeável) e alissolos (ácidos, alta concentração de alumínio, com presença de argila em maiores profundidades) apresentaram uma alta incidência de nematoides entomopatogênicos, seguidos de nitossolos (solos com argila) e latossolos (profundos, bem drenados e mais ácidos), onde a ocorrência foi menor.

Até 2002, o levantamento de nematoides entomopatogênicos em todo o mundo foi de 36 ocorrências nos países europeus, oito na América do Norte e Caribe, quatro na América do Sul, 12 na Ásia, um na África e dois na Austrália – Oceano Pacífico (HOMINICK, 2002).

Na América do Sul, mais especificamente na Argentina, foi registrada a presença do nematoide entomopatogênico *Steinernema scapterisci*, em Buenos Aires, atacando *Scapteriscus borelli* Giglio-Tos, também conhecido como paquinha, observando-se que pode ser distinguido do isolado *S. scapterisci* identificado por Nguyen e Smart (1990) uruguaio por apresentar características taxonômicas diferentes, como tamanho menor dos adultos e dos JIs. (STOCK, 1992). Há registros de outras espécies do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis* na Argentina em solos na região dos Pampas, como por exemplo, *Steirnenema rarum* e *Steirnenema ritteri* (FERRAZ et al., 2008; SAN BLASS et al., 2019).

No Brasil, os estudos de levantamento de isolados nativos é recente. Ao todo, conhecem-se 54 isolados nativos brasileiros (TABELA 2.1), dos quais, apenas dois foram identificados como novas espécies, indicando o grande potencial de ocorrência desses agentes no nosso país (DOLINSKI et al., 2017).

A primeira espécie nova de nematoide entomopatogênico foi isolada a partir de uma coleta de solo realizada na cidade de Benjamin Constant, no estado do Amazonas, e de acordo com Andaló et al. (2006) após análises morfológicas, morfométricas e moleculares, identificaram a nova espécie como *Heterorhabditis amazonensis*. A partir de coleta de solos no estado do Mato Grosso, foi identificada uma nova espécie do gênero *Steinernema*, descrita como *Steinernema brasilense* (NGUYEN et al., 2010). No entanto, os autores não descrevem os tipos de solos onde as amostras foram isoladas.

Tabela 2. 1 Isolados de nematoides entomopatogênicos identificados no Brasil até o ano de 2017.

Espécies e isolados	Fonte
<i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7, LPP5, LPP8, LPP10	Dolinski et al. (2008)
<i>Heterorhabditis indica</i> LPP1, LPP2, LPP3, LPP4, LPP9	Dolinski et al. (2008)
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> RS33, RS56, RS 57, RS58, RS88, RS107	Barbosa-Negrisoni et al. (2009)
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> RS72	Barbosa-Negrisoni et al. (2009)
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> JPM4	Molina et al. (2005)
<i>H. amazonensis</i> n. sp.	Moino et al. (2006)
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> IBCB n10, IBCB n24, IBCB n40, IBCB n44, IBCB n46	Dell'Acqua et al. (2013)
<i>Heterorhabditis indica</i> IBCB n5	Dell'Acqua et al. (2013)
<i>Heterorhabditis indica</i> LPP30	Minas (2012)
<i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP22	Matos (2014)
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> FCA07	Brida et al. (2017)
<i>Steinernema rarum</i> RS4, RS55, RS70, RS89, RS90, RS102, RS106	Barbosa-Negrisoni et al. (2009)
<i>Steinernema feltiae</i> RS76	Barbosa-Negrisoni et al. (2009)
<i>Steinernema glaseri</i> RS38	Barbosa-Negrisoni et al. (2009)
<i>Steinernema riobrave</i> RS59	Barbosa-Negrisoni et al. (2009)
<i>Steinernema</i> sp. RS69, RS92	Barbosa-Negrisoni et al. (2009)
<i>Steinernema brazilense</i> n. sp.	Nguyen et al. (2010)
<i>Steinernema glaseri</i> IBCB n1	Dell'Acqua et al. (2013)
<i>Steinernema brazilense</i> IBCB n9	Dell'Acqua et al. (2013)
<i>Steinernema puertoricense</i> IBCB n48, IBCB n27, IBCB n36, IBCB n38	Dell'Acqua et al. (2013)
<i>Steinernema australe</i> IBCB n25, IBCB n28	Dell'Acqua et al. (2013)
<i>Steinernema riobrave</i> IBCB n49	Dell'Acqua et al. (2013)
<i>Steinernema rarum</i> FCA09, FCA10, FCA11, FCA12, FCA13, FCA14	Brida et al. (2017)

Fonte: Dolinski et al., 2017.

Recentemente no Norte do Paraná, foram encontradas mais 10 espécies que estão sendo identificados molecular e morfológicamente, que foram denominados de UENPn-01, 02, 03, 04, 05, 06 e 07; e UEL 01, 07 e 08. Os isolados UENP foram obtidos em amostras de solo de áreas com prática de agricultura orgânica e pastagem.

Os isolados UEL 01, 07 e 08 foram identificados em trabalho de Guide (2019) como pertencentes a espécie *Heterorhabditis amazonensis*, sendo o primeiro registro de NEPs, e conseqüentemente desta espécie no estado do Paraná. Quanto aos isolados UENP, três deles foram identificados (UENPn-02, 05 e 06) e também pertencem a espécie *H. amazonensis* (Doneze, 2019).

A identificação e o registro de ocorrência são passos primordiais para o uso desses agentes no Manejo Integrado de Pragas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a identificação molecular e a caracterização morfológica do isolado UENPn-01.

2.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA

A maneira mais clássica no processo de identificação de novos isolados de NEPs é por meio da taxonomia. No entanto, a morfometria é muito complexa devido as similaridades das estruturas entre espécies (NGUYEN et al., 2001) tais como medições das regiões genitais, espícula, papilas e outras partes do corpo do corpo do isolado a ser identificado (NASMITH et al., 1996) exigindo muito conhecimento, além de consumir muito tempo (FLOYD et al., 2002).

Desta forma, foram desenvolvidos outros métodos de identificação, incluindo a análise de sequência de DNA. Esta técnica possui vantagens em relação morfometria, tais como, agilidade no processo, maior sensibilidade na análise, além de não haver a interferência do ambiente nas características do NEP (DELL'ACQUA, 2011).

No entanto, técnicas de biologia molecular também podem ser utilizadas para observar as diferentes variabilidades genéticas apresentadas entre as espécies de NEPs (LIU et al., 2000). Sabe-se que qualquer parte do genoma de um nematoide pode ser utilizada para identificação de uma nova espécie, porém, nem toda região serve como marcador molecular, sendo utilizado aqueles marcadores que já estão presentes nos bancos de dados para comparar e identificar a espécie (ADAMS; NGUYEN, 2002).

Em eucariotos, o gene do DNAr consiste em uma cópia única com sequências repetidas, o que leva a ter informações essenciais para investigação molecular (GRENIER et al., 1997; LIU et al., 2000) tornando-os adequados para a realização de amplificação através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (KAMITANI, 2010). Há regiões pertencentes ao

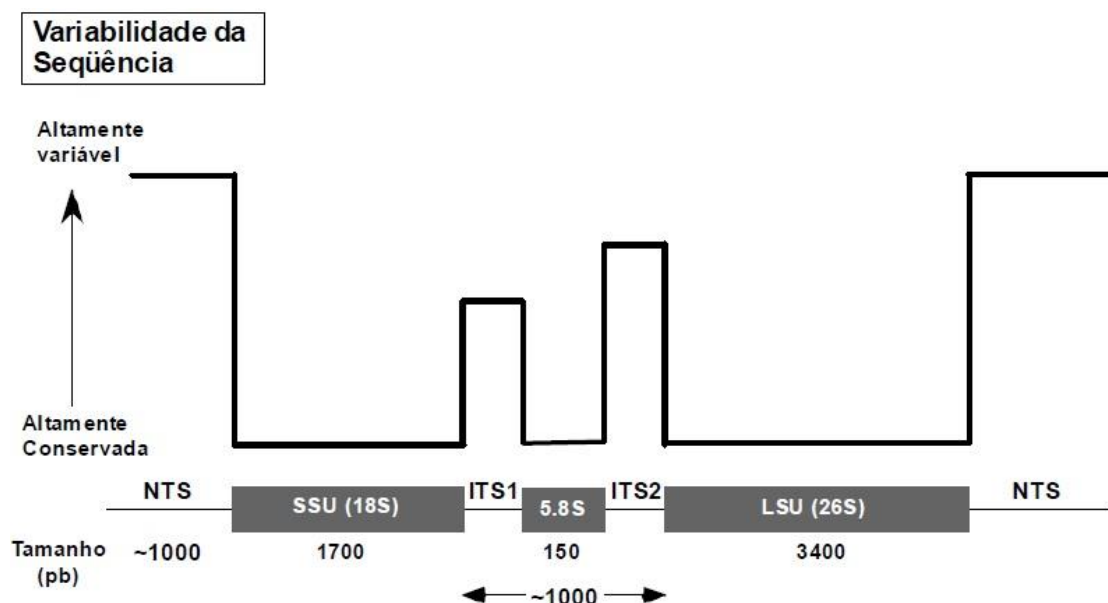
gene do DNAr que são mais conservadas (18S e 5.8S) e um pouco menos conservadas (26S) com regiões espaçadoras entre elas, chamados de ITS (*Internal Transcribed Spacer*) 1 e 2, que são mais variáveis e utilizadas para analisar e comparar com espécies mais distantes (NASMITH et al., 1996).

Algumas partes da região 18S do DNAr mostram que há diferenças entre espécies de *Steinernema* e *Heterorhabditis*, onde as sequências são mais divergentes em *Steinernema* (LIU et al., 1997). Ao mesmo tempo, a região ITS pode ser uma ferramenta confiável que apresenta características homólogas para resolver a diversidade entre espécies (LIU et al., 2000).

Segundo Adams et al. (1998) a região ITS 1 apresenta um bom desempenho para estabelecer relações entre espécies próximas dentro do gênero *Heterorhabditis*, mas, para análises de linhagens que são mais divergentes, a região não é tão confiável. Por mais que a região ITS contém táxons conservados, FLOYD et al. (2002) também salientam que é uma região que varia muito entre as espécies de nematoides.

A região LSU também é utilizada para a identificação de NEPs, pois, é considerada uma região universal, a qual, aliada a região ITS, apresenta eficiência para identificação de espécies (Figura 2.2) (KAMITANI, 2010; SPIRIDONOV e SUBBOTIN, 2016).

Figura 3.2 Diagrama do DNAr.



Fonte: Kamitani, 2010.

Os genes de espécies pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* são menores e taxonomicamente são da mesma família que *Caenorhabditis elegans*, tornando-o um dos principais organismos usado para comparações moleculares, desta forma, é importante a utilização da região mais conhecida e conservada de *C. elegans* (LIU et al., 2000; ADAMS, NGUYEN, 2002).

A utilização de características tanto moleculares, quanto morfológicas, são fundamentais no processo de identificação de novas espécies NEPs, visto que ambas se complementam, fornecendo maior segurança na identificação.

3. ARTIGO A: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO DE NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis* sp. UENPn-01

3.1 RESUMO: Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são parasitos de insetos e apresentam potencial para utilização no controle biológico de pragas. O objetivo do trabalho foi realizar a identificação molecular e morfológica, teste de patogenicidade e virulência e observar o ciclo de vida do isolado *Heterorhabditis* sp. UENPn-01. Por meio da identificação molecular a partir da região ITS, observou-se similaridade de 98,64% com *Heterorhabditis mexicana* e 98,57% com *Heterorhabditis taysearae*. Na análise da região D2D3, UENPn-01 apresentou 96,94% de similaridade com *H. mexicana*. Com relação a identificação morfológica, observou-se que o isolado apresenta diferenças em relação ao tamanho do *H. mexicana*, porém, os machos apresentam o poro excretor posterior ao bulbo basal, semelhante a essa espécie. Nas fotos de microscopia eletrônica de varredura (MEV), pôde-se observar estruturas da região anterior das fêmeas hermafroditas e fêmeas de segunda geração e machos, com a presença das papilas labiais. Nas fêmeas, há a presença da vulva na região mediana do corpo, bem como, na região posterior, com a cauda e o ânus. Nos machos, observa-se na região caudal e a espícula. No teste de patogenicidade e virulência, UENPn-01 causou mortalidade de 88% em lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Quanto ao ciclo de vida, observou-se um ciclo característico do gênero *Heterorhabditis*, com a primeira geração apenas de fêmeas hermafroditas, seguido de três gerações com a presença de machos e fêmeas, totalizando quatro gerações completas dentro do hospedeiro.

Palavras-chave: Entomopatógeno. Taxonomia. Análise Molecular. Controle Biológico

ABSTRACT: Entomopathogenic nematodes (NEPs) are insect parasites and have potential for use in biological pest control. The objective of the work was to carry out a molecular and morphological identification, test of pathogenicity and virulence and observe the isolated life cycle *Heterorhabditis* sp. UENPn-01. Through molecular identification from the ITS region, the similarity of 98.64% with *Heterorhabditis mexicana* and 98.57% with *Heterorhabditis taysearae* is reduced. In the analysis of the D2D3 region, UENPn-01, it showed 96.94% similarity with *H. mexicana*. Regarding the morphological identification, if it shows the differences in relation to the size of *H. mexicana*, however, the males present the posterior excretory for the basal bulb, being this the same species. In the scanning electron microscopy (SEM) photos, they can observe structures from the anterior region of hermaphrodites and second-generation females and males, with the presence of the labial papillae. In females, the vulva is present in the median region of the body, as well as, in the posterior region, with tail and anus. In males, observe the caudal region and a foam. Without a pathogenicity and virulence test, UENPn-01 caused 88% mortality in *Galleria mellonella* caterpillars (Lepidoptera: Pyralidae). Regarding the life cycle time, it can be a characteristic cycle of the *Heterorhabditis* genus, with the first generation of hermaphroditic females only, followed by three years with the presence of males and females, totaling four full years within the host.

Keywords: Entomopathogen. Taxonomy. Molecular Analysis. Biological control

3.2 INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) pertencentes as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae são parasitos de insetos e apresentam potencial para utilização no controle biológico de pragas (DOLINSKI et al., 2008) pois, possuem a capacidade de se deslocar em busca do hospedeiro e carregam no seu interior bactérias simbióticas (POINAR, 1993) que são liberadas na hemocele do inseto, assim que os NEPs penetram no interior do corpo do mesmo, levando-o a morte por septicemia entre 48-72 horas.

Estes nematoides estão presentes em várias regiões do globo terrestre (DOLINSKI et al., 2008) e segundo Poinar (1993) os heterorhabditídeos e os steinernematídeos possuem ancestrais diferentes, sendo que os heterorhabditídeos se originaram de regiões costeiras a partir de rhabditídeos marinhos e de vida livre, enquanto que os steinernematídeos, possuem uma linhagem terrestre. No entanto, pesquisas de identificação de espécies de NEPs por meio de isolamento de amostras de solos, mostraram que espécies do gênero *Heterorhabditis* já foram encontradas em regiões que não são costeiras (DOLINSKI et al., 2008) tais como, *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (STOCK et al. 1996), *Heterorhabditis mexicana* Nguyen, Shapiro-Ilan, Stuart, McCoy, James e Adams (NGUYEN et al., 2004), *Heterorhabditis amazonensis* (ANDALÓ et al., 2006) e recentemente na cidade de Londrina, (norte do Paraná) o primeiro isolado *H. amazonensis* UEL 08 (GUIDE, 2019).

Para que o uso de NEPs se torne uma ferramenta para integrar o controle de pragas é importante o conhecimento de espécies ou populações nativas, pois, isso permite que estas sejam mais adaptadas as condições climáticas e também a população de insetos pragas (ANDALÓ et al., 2009).

Assim, o objetivo deste estudo foi realizar a identificação molecular e a caracterização morfológica, além de avaliar a patogenicidade e virulência e observar o ciclo de vida de *Heterorhabditis* sp. UENPn-01 coletado em área de pastagem no município de Ribeirão Claro, Paraná, Brasil.

3.3 MATERIAL E MÉTODO

3.3.1 Obtenção e manutenção do isolado

Foram realizadas coletas de solo em diferentes propriedades na região norte do Paraná (Tabela 3.1), no qual sete amostras foram positivas para NEPs, todas provenientes do município de Ribeirão Claro – Paraná (23° 9'44"S e 49° 45' 42"W).

Tabela 3. 1 Locais de coleta de solo e número de amostras coletadas visando o isolamento de nematoides entomopatogênicos na região Norte do Estado do Paraná.

Cultivo	Número de amostras
Pastagem	5
Milho	8
Área cultivo Orgânico	39
Mata de Reflorestamento	28

Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

As amostras de solo foram extraídas a uma profundidade entre 0 a 10 cm, com auxílio de trado, num raio de 5 m, sendo cada ponto da amostra constituído de 4 sub-amostras de solo com cerca de 100 gramas cada. As sub-amostras foram misturadas em baldes, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas ao laboratório (modificado de KAYA e STOCK, 1997 por VOSS et al., 2009). Em seguida, o solo foi devidamente identificado para possibilitar a recuperação do ponto de amostragem e permitir conotações com o habitat associado (altitude, temperatura predominante e tipo de vegetação).

As amostras foram transportadas até o Laboratório de Entomologia e Controle Microbiano (LECOM) da UENP – *campus* Cornélio Procópio, onde o solo de cada amostra foi umedecido com água destilada para atingir umidade próxima a 20%. O solo foi colocado em potes plásticos e cada pote recebeu 10 lagartas de último instar de *G. mellonella* de acordo com a metodologia de Bedding e Akhurst (1975) modificada por Voss et al. (2009). Os potes foram mantidos em temperatura ambiente. Após cinco a sete dias, os insetos mortos e com sintomas de infecção por NEPs, tais como cutícula íntegra, mudança de coloração das lagartas, e estas

foram desinfestados superficialmente com solução de hipoclorito de sódio a 0,1%, colocados em câmara seca (placa de Petri de 9 cm de diâmetro com papel de filtro) e incubados em câmara climatizada a $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Após três dias, os cadáveres foram transferidos para armadilhas de White (WHITE, 1927) para a coleta dos JIs.

Os isolados obtidos foram multiplicados *in vivo*, de acordo com a metodologia de Molina e Lopes (2001). Para tanto, foram utilizadas 10 lagartas de último instar de *G. mellonella*, dispostas em placa de Petri contendo também dois papéis filtro. Em seguida, o nematoide foi aplicado em suspensão aquosa (água destilada+Juvenis Infectantes) na quantidade de 2 mL/placa. As placas foram armazenadas em câmara climática a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e no escuro por dois dias. Após esse período, foi confirmada a infecção das lagartas pelos nematoides através da sintomatologia e estas foram transferidas para câmara seca e mantidas sob as mesmas condições mencionadas por cinco dias. As lagartas foram então colocadas em armadilhas de White (WHITE, 1927) para coleta dos JIs.

Os JIs em suspensão aquosa foram coletados diariamente, armazenados em Erlenmeyer com aeração por um período máximo de sete dias após a produção para, posteriormente, serem utilizados nos bioensaios.

3.3.2 Identificação molecular

3.3.2.1 Extração de DNA

Para a identificação molecular do isolado UENPn-01, o DNA foi extraído de JIs, utilizando o Kit comercial Pure Link da Invitrogen®, seguindo o protocolo do fabricante.

Os JIs foram transferidos para um microtubo de 1,5mL junto com água destilada, totalizando 500µL para cada isolado. Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas por dois minutos a 5000rpm, para que os JIs se acumulassem no fundo do tubo, facilitando a retirada desses. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, os JIs foram transferidos para outro microtubo, no qual foi adicionado o tampão de lise do kit (TB5). Posteriormente, a amostra foi agitada em vortex por três segundos, a fim de homogeneizar a suspensão e depois recebeu 20µL da enzima proteinase K. Após isto, a amostra foi novamente agitada em vortex por três segundos. Visando remover eventuais RNAs, também foi adicionado 20µL da enzima RNase, seguida por homogeneização em vortex. A amostra foi então incubada

em temperatura ambiente por dois minutos e depois recebeu 200µL do tampão *Pure Link Genomic Lysis/Binding Buffer* e foi novamente agitada em vortex por três segundos.

O microtubo com a suspensão foi incubado a 55 °C por 10 minutos, para promover a digestão das células. Após esse período, foi adicionado 200µL de álcool 100% e agitado no vortex por cinco segundos. Um total de 640µL do conteúdo do microtubo foi então transferido para colunas *Pure Link Spin*, visando separar o DNA dos restos celulares. Para isso, cada coluna foi centrifugada a 10.000rpm por um minuto em temperatura ambiente, sendo posteriormente transferida para um novo microtubo estéril, onde foi realizada a lavagem do DNA. Para este processo, foi adicionado 500µL da mistura *Wash Buffer 1* (preparado em etanol de acordo com as especificações do fabricante) a amostra, a qual foi submetida a centrifugação de 10.000rpm em temperatura ambiente por 1 minuto. Posteriormente, a coluna foi novamente transferida para novo microtubo estéril, onde a coluna recebeu 500µL de *Wash Buffer 2* (preparado em etanol de acordo com as especificações do fabricante) sendo posteriormente centrifugada por três minutos em temperatura ambiente.

Na última etapa, a coluna foi transferida para um microtubo estéril de 1,5mL, foi realizada a eluição do DNA da coluna. Para isso, foi acrescentado 100µL de *Genomic Elution Buffer*, seguido por uma centrifugação de 10.000rpm por um minuto. Visando obter o máximo de DNA, este processo foi repetido e a coluna recebeu mais 100µL de *Genomic Elution Buffer*, sendo novamente centrifugada a 10.000rpm por um minuto. A coluna foi então descartada e a suspensão do tubo (contendo DNA) foi estocada em freezer.

3.3.2.2 Quantificação de DNA

A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria usando o equipamento Qubit Fluorometer e posteriormente a amostra foi diluída para 5ng/µL.

3.3.2.3 Amplificação das regiões ITS via PCR

O trecho de DNA analisado no presente estudo foi amplificado via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando o par de *primers* (iniciadores): Forward 5'-GGGCAAAGTCGTAACAAGG-3' e Reverse 5'-GCGGGTAGTCACGACTGAG-3', identificado e construído pelo próprio grupo de pesquisa para os isolados UENP. Utilizou-se o *primer* para a região 28S-rDNA- D2/D3 LSU (Large Subunit) relatado por Nguyen et al. (2007): 502'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGC-3' e 503-5'-CCTTGGTCCGTGTTTCAAGACG-3'.

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

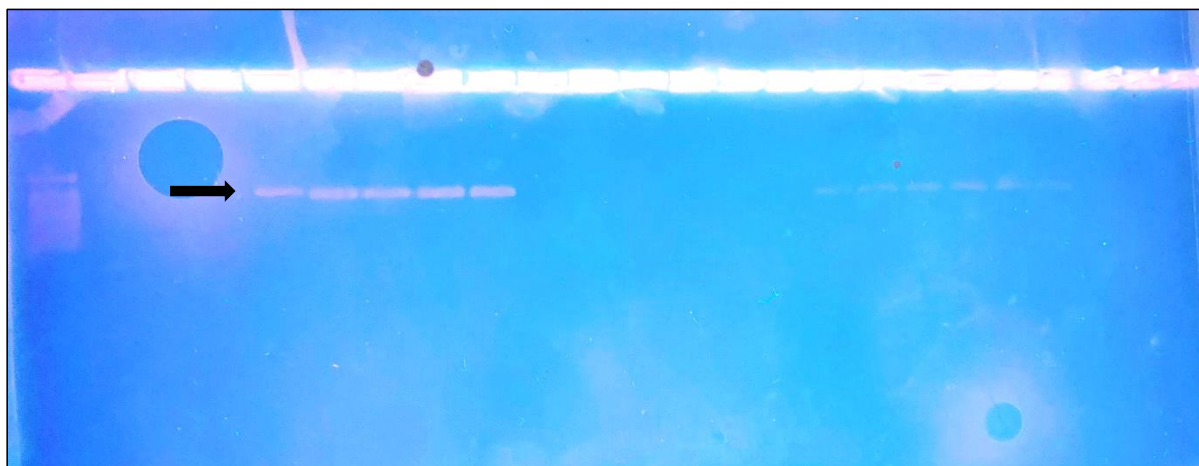
3.3.2.4 Confirmação da Amplificação em Gel de Agarose 1%

Após cerca de 3 horas no termociclador, uma alíquota da amostra foi retirada e submetida a eletroforese em gel de agarose, para confirmar a replicação do DNA alvo.

O gel foi preparado de acordo com a indicação do fabricante (250mL de TEB 0,5x e 2,5g de agarose) e após a solidificação o gel foi conduzido para a cuba de eletroforese. Cada amostra (5µL do produto de PCR) foi então posicionada em um poço, e um dos poços recebeu uma amostra de marcador de peso molecular 100pb. Posteriormente, a cuba foi fechada e submetida a uma corrente elétrica de 100V por 40 minutos possibilitando que os fragmentos de DNA adentrassem o gel de agarose.

Após a eletroforese, a posição dos fragmentos de DNA no gel foi visualizada a partir da coloração com Brometo de Etídio. Para isso, o gel foi retirado da cuba, colocado em uma solução contendo Brometo de Etídio por 15 minutos para permitir a ligação deste reagente ao DNA no gel. Posteriormente, o gel foi conduzido a um transluminador UV, para que luz UV faça os pontos onde o DNA está concentrado brilharem mais intensamente.

Figura 4.1 Confirmação de amostras de DNA no gel de agarose.



Fonte: Macedo, 2019

3.3.2.5 Sequenciamento

Após a confirmação da presença do DNA em gel de agarose, uma alíquota da amostra de UENPn-01 foi usada para fazer a reação de sequenciamento. A reação de sequenciamento foi montada usando o kit Big Dye Terminator seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento foi conduzido em termociclador, usando o programa de Barcode, a uma temperatura de 50 °C por aproximadamente três horas.

Posteriormente, as amostras foram levadas até o laboratório LAGEA da UEL para a utilização do sequenciador automático ABI 3500 XL para obtenção das sequências e assim poder compará-las com outras já depositadas no GenBank.

3.3.2.6 Árvore filogenética e tabela de similaridade

Após obtenção das sequências, estas foram comparadas a outras através do programa Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), e em seguida foi alinhada com outras sequências do mesmo trecho disponíveis para *Heterorhabditis* no Genbank (números de acessos disponíveis na árvore filogenética) com auxílio do programa BioEdit 7.2. O software MEGA X (TAMURA et al., 2011) foi utilizado para calcular as distâncias em pares (Pairwise Distances) e conduzir as seguintes análises: *i* – Sinal filogenético dos dados, o qual foi testado a partir de método de máxima parcimônia (MP), usando os seguintes parâmetros: Árvore de MP inferida

a partir de 1000 repetições, usando o algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR) com o nível de pesquisa 1, no qual as árvores iniciais foram obtidas pela adição aleatória de sequências (10 réplicas); *ii* – Relações filogenéticas a partir do método de *maximum likelihood* (ML). A árvore de ML foi inferida usando uma árvore inicial *neighbour-joining*, incluindo pesquisa heurística do espaço da árvore a cada troca de ramo TBR (tree bisection-reconnection). Todas as análises foram conduzidas com 1000 repetições de *bootstrap*.

3.3.3 Identificação morfológica e morfométrica

Para estudos morfológicos do isolado UENPn-01, dez lagartas de *G. mellonella* foram expostas a cerca de 500 JIs em placa de Petri (9 cm de diâmetro) com duas folhas de papel filtro umedecidas. As fêmeas de primeira geração (hermafroditas), as fêmeas de segunda geração e os machos foram obtidos por meio da dissecação dos insetos infectados após dois dias para as fêmeas hermafroditas e quatro dias para os outros estágios. Os JIs de terceiro estágio foram obtidos durante os dois primeiros dias após a emergência destes dos cadáveres dos insetos.

Para microscopia de luz, 25 fêmeas hermafroditas, 25 machos e fêmeas (20 para cada estágio) e 25 JIs foram examinados. Os nematoides foram mortos e fixados em TAF (trietanomalina e formalina) como sugerido por Courteny et al. (1955) e adicionais espécimes foram transferidos para lactofenol (FRANKLIN; GOODEY, 1949), a fim de que estruturas morfológicas fossem melhor observadas, como esôfago, anel nervoso e poro excretor das fêmeas. Os nematoides fixados em TAF foram colocados em glicerina utilizando o método de Seinhorst (SEINHORST, 1959). Espécies tipo foram montadas em glicerina, sendo utilizado suporte para lamínula em todos os casos para evitar achatamento das espécies.

3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

Para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), lagartas de *G. mellonella* foram previamente inoculadas com o isolado UENPn-01 para a obtenção de fêmeas hermafroditas, machos e fêmeas de segunda geração e JIs. As diferentes fases do nematoide foram coletadas e fixadas em 3% glutaraldeído com 0,1 M de cacodilato de sódio em pH 7,2

por 10 horas em geladeira. Esse material, foi então transportado até o Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual de Londrina, onde foram submetidos ao processo de preparo para a realização da captura de imagem. Para tanto, estes foram lavados em três banhos de cacodilato a 0,1M por 10 minutos cada. Logo após, foram fixados em 2% de solução de tetróxido de ósmio por uma hora a 25°C, seguidos de três banhos de solução tampão de cacodilato por 10 minutos cada banho. Em seguida, os NEPs foram desidratados em uma sequência de álcool a 30, 50, 70 e 90% por 10 minutos cada banho, seguidos de mais três banhos em álcool absoluto (100%) de 10 minutos cada. Após o processo de desidratação, as amostras foram submetidas ao processo para obtenção do ponto crítico sem CO₂ líquido e por fim montadas stubs e cobertos com ouro.

3.3.5 Teste de patogenicidade e virulência

A patogenicidade e virulência do isolado UENPn-01 foi avaliada em lagartas de *G. mellonella*.

Foram realizadas cinco repetições e cada repetição constituiu de uma placa de Petri de vidro (9 cm Ø) contendo dois papéis filtro na parte inferior e 10 lagartas de último ínstar. Em seguida, foram aplicados com auxílio de micropipeta, os isolados na concentração de 100 JIs/cm² (6361JIs/placa). No tratamento testemunha aplicou-se 2 mL de água destilada. As placas foram mantidas em câmara climatizada a 25±1°C e sem fotoperíodo.

Para a avaliação, a mortalidade foi verificada após cinco dias e os insetos mortos e com sintomas de infecção (coloração marrom-escuro) foram dissecados para a confirmação da morte por nematoide. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste F ($p \leq 0,05$).

3.3.6 Ciclo de vida

A avaliação do ciclo de vida do nematoide foi conduzida segundo a metodologia de Andaló (2009a). O ensaio foi realizado na concentração de 400 JIs/ largarta para avaliação do ciclo curto, com 20 repetições, que consistiram de uma placa de Petri de 9cm

de diâmetro com 10 lagartas de último instar de *G. mellonella*. Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara climática a $24^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 48 horas. Após este período, a avaliação foi realizada a cada 24 horas dissecando 10 lagartas por dia sob auxílio de microscópio estereoscópio, para observação das fases de vida do nematoide. O experimento foi realizado até os nematoides completarem seu ciclo.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Isolado UENPn-01

A partir das 80 amostras de coletas de solo realizadas no norte do Paraná, sete foram positivas para nematoides entomopatogênicos e estas estavam presentes município de Ribeirão Claro. O UENPn-01 foi proveniente de uma área de pastagem e as demais em área de cultivo orgânico (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Locais de coletas de solo e número de amostras positivas para nematoides entomopatogênicos.

Cultivo	Positivo para NEPs
Pastagem	1
Milho	0
Cultivo orgânico	6
Mata de Reflorestamento	0

Das duas espécies nativas brasileiras, Andaló et al. (2006) isolaram *H. amazonensis* de áreas de floresta na região norte do estado do Amazonas, próximo a Benjamin Constant. Ainda, o isolado *S. braziliense* foi isolado próximo a floresta natural no estado do Mato Grosso (NGUYEN et al., 2010).

Na República Tcheca, Mráček et al. (2005) obtiveram 11 espécies, nove pertencentes ao gênero *Steinernema* e dois ao gênero *Heterorhabditis*, provenientes de diferentes habitats, como áreas de pastagens, florestas e campos com cultivos de frutas.

Observou-se que as lagartas infectadas na amostra de solo de onde foi obtido o isolado UENPn-01, apresentaram coloração amarelada como primeiro sintoma, e posteriormente ficaram mais avermelhadas com a presença de manchas (Figura 3.2). Outras características foram observadas, tais como a ausência de mal cheiro e cutícula íntegra, característicos da infecção por nematoides.

Figura 3.2 Sintomas do isolado *Heterorhabditis* UENPn-01 em lagartas de *Galleria mellonella*.



Fonte: Macedo, 2019.

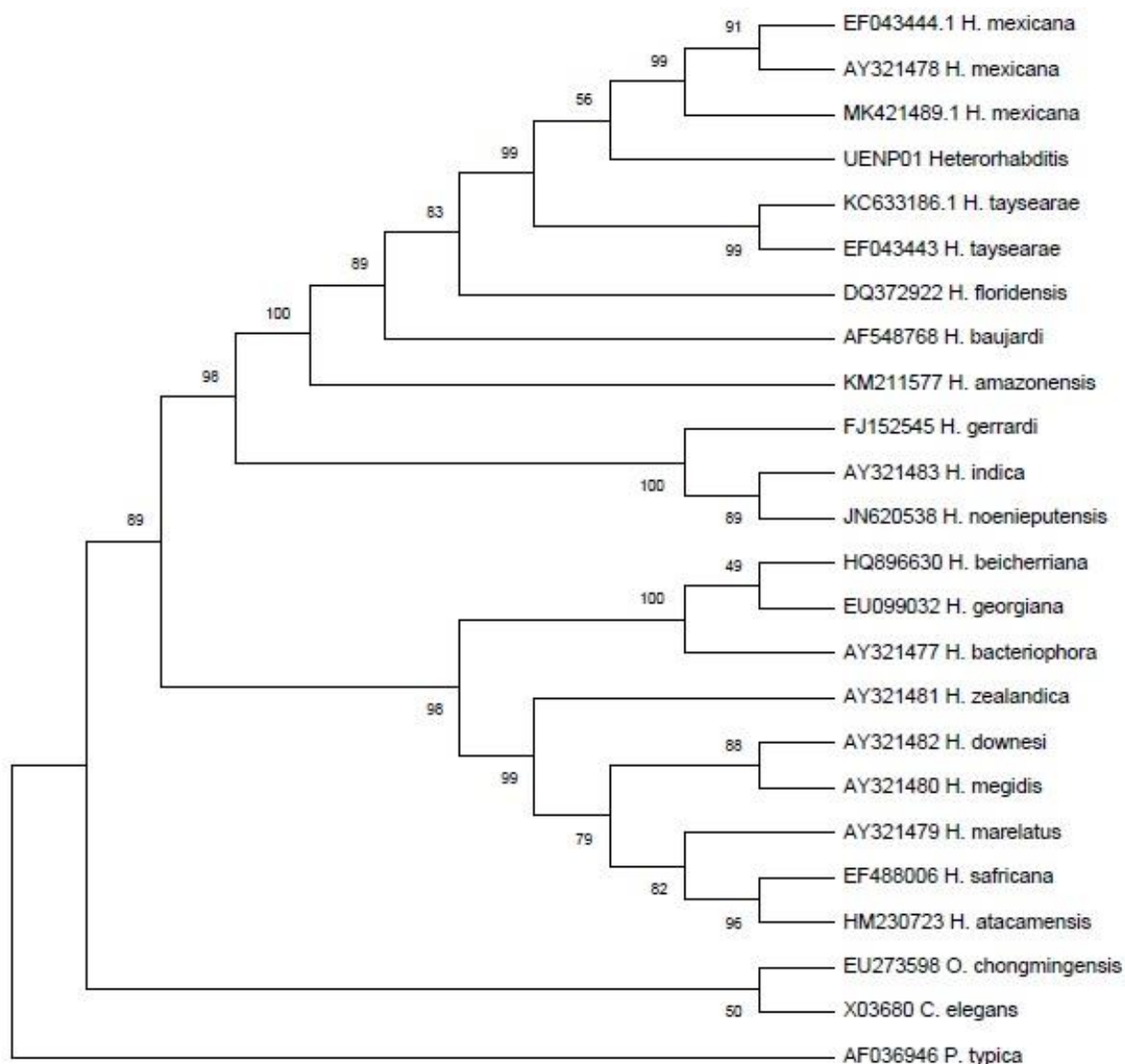
3.4.2 Identificação molecular

A partir da análise molecular da região ITS foi obtida uma sequência de 840 pares de base (pb) de um trecho do gene do DNA ribossomal, incluindo parte do RNAr 28S, ITS1, 5.8S, ITS2 e parte do 18S.

A sequência obtida para o isolado UENPn-01 não foi idêntica a nenhuma sequência para os NEPs disponível no GenBank, ficando mais próxima das espécies *Heterorhabditis mexicana* (EF043444) (98,64%) e *Heterorhabditis taysearae* (EF043443) (98,57%) (Tabela 3.3).

. Na árvore filogenética, a topologia representada em Máxima Parcimônia, mostrou um grupo monofilético suportado com 98% pela análise de *bootstrap*, formado pelas espécies *H. mexicana*, *H. taysearae*, *H. floridensis*, *H. baujardi* e *H. amazonensis* (Figura 3.3).

Figura 3.3 Relações filogenéticas do isolado UENPn-01 *Heterorhabditis* sp. baseadas na análise de regiões ITS do rDNA inferidas pela análise de Máxima Parcimônia (MP). *Oscheius chongmingensis*, *Pellioiditis typica* e *Caenorhabditis elegans* foram usados como grupo externo.



Sabe-se que *H. mexicana* apresenta proximidade genética maior com as espécies de *Heterorhabditis* que formam o “grupo indica”, no qual se encontram *H. mexicana*, *H. amazonensis*, *H. floridensis*, *H. baujardi*, *H. taysearae* e *H. indica* (ANDALÓ et al., 2006).

Também na região Norte do Paraná, pesquisas realizadas de levantamento de espécies de NEPs, obtiveram o isolado UEL 08 e por meio da análise da região ITS foi identificado como *H. amazonensis* apresentando 100% de similaridade com as demais sequências de *H. amazonensis* depositados no GenBank (GUIDE, 2019).

Na análise da região 28S-rDNA- D2D3 LSU, a sequência apresentou 330 pb de um trecho do gene do DNA ribossomal da região 28S, e apresentou 96,64% com os isolado da espécie *H. mexicana* MK421470 e EU100414.

Observando a árvore filogenética, a topologia representada em Máxima Parcimônia, mostrou um grupo monofilético formado pelos isolados das espécies *H. mexicana* (MK421470 e EU100414) suportado em 74% pela análise de *boodstrap* (Figura 3.4).

Os dados moleculares do presente estudo revelam claramente que o isolado é pertencente ao gênero *Heterorhabditis*. Contudo, a sequência obtida não apresentou 100% de similaridade com nenhuma outra espécie, *H. mexicana* e *H. taysearae*, e nenhuma delas foram ainda descrita no Brasil e ambas são conhecidamente próximas filogeneticamente. Assim, faz-se necessárias análises adicionais, que incluam outros trechos do gene de RNA ribossomal com outros *primers* e que avaliem outras regiões do DNA para que se tenha a confirmação da espécie a qual pertence o isolado UENPn-01.

Figura 3.4 Relações filogenéticas de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. UENPn-01 baseadas na análise de regiões 28S-rDNA- D2/D3 LSU do rDNA inferidas pela análise de Máxima Parcimônia. *Oscheius chongmingensis* e *Caenorhabditis elegans* foram usados como grupo externo.

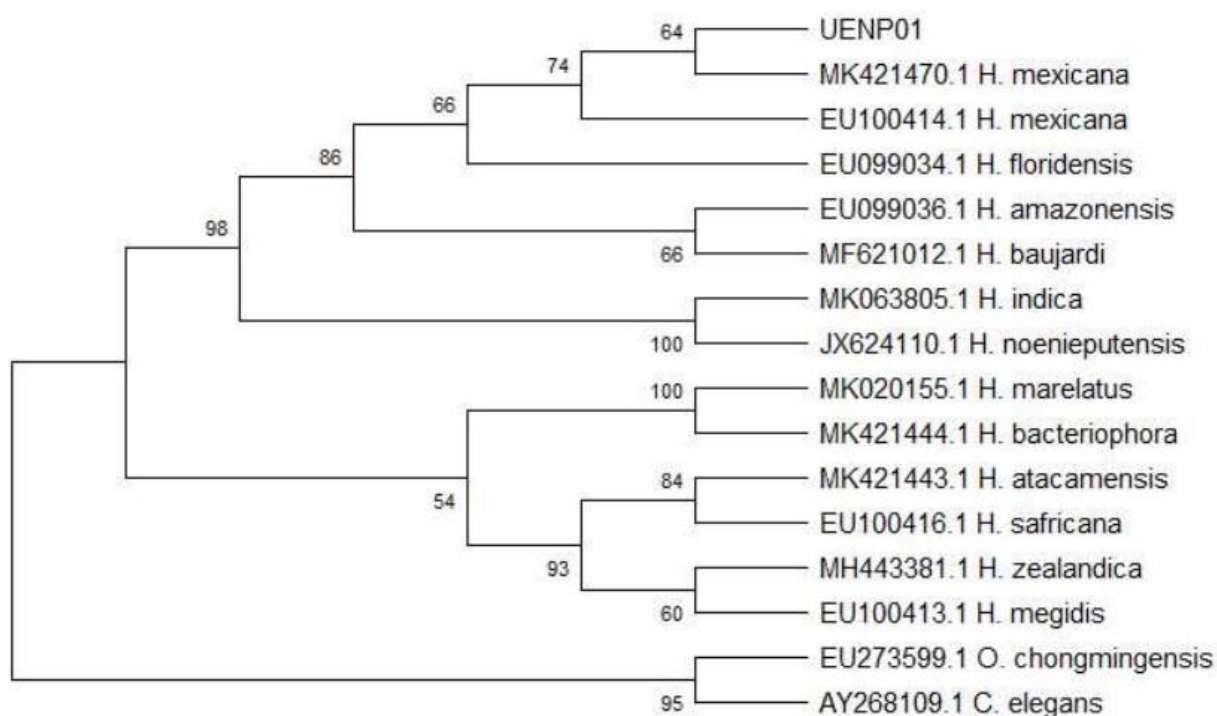


Tabela 3.3 Distâncias em pares de base das regiões ITS do rDNA entre espécies de *Heterorhabditis*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
UENP01_ <i>Heterorhabditis</i>		11	11	11	13	14	12	19	171	158	171	172	183	192	173	178	173	81	77	84	17	24	269	160	277
EF043444.1_ <i>H._mexicana</i>	98,69		0	0	11	37	11	16	174	155	172	172	185	195	173	179	173	79	76	82	14	22	283	173	298
MK421489.1_ <i>H._mexicana</i>	98,69	100,00		0	11	12	10	16	172	155	170	170	183	192	170	176	170	79	75	82	14	22	278	166	288
AY321478_ <i>H._mexicana</i>	98,69	100,00	100,00		11	18	11	16	174	155	172	172	185	194	173	179	173	79	76	82	14	22	283	173	298
MK421480.1_ <i>H._mexicana</i>	98,45	98,78	98,78	98,78		11	9	11	171	155	169	169	182	192	167	172	167	76	71	78	6	13	277	168	290
KC633186.1_ <i>H._taysearae</i>	98,33	96,30	98,67	98,15	98,78		9	17	180	155	180	178	188	204	184	185	182	87	78	89	23	24	288	181	301
EF043443_ <i>H._taysearae</i>	98,57	98,90	98,89	98,88	99,01	99,08		15	173	153	173	171	183	197	177	179	175	80	77	83	16	22	282	175	295
KM211577_ <i>H._amazonensis</i>	97,51	97,90	97,90	97,90	98,56	97,77	98,03		164	153	162	163	177	184	161	165	161	69	65	71	13	15	264	155	272
EF488006_ <i>H._safricana</i>	78,84	82,10	80,25	81,68	80,41	80,89	82,20	77,75		13	25	31	55	77	121	125	127	163	157	167	175	169	273	194	310
HM230723_ <i>H._atacamensis</i>	77,84	78,29	78,26	78,26	78,29	78,23	78,57	78,57	98,22		22	26	47	67	107	111	115	145	141	148	156	155	242	167	258
AY321479_ <i>H._marelatus</i>	78,84	81,91	80,48	81,89	80,64	80,89	81,81	78,02	97,42	96,99		36	59	73	120	125	127	165	159	169	173	167	263	195	306
AY321482_ <i>H._downesi</i>	78,55	81,80	80,35	81,78	80,51	80,98	81,90	77,70	96,78	96,41	96,26		39	69	121	123	127	165	160	168	173	168	270	195	306
AY321480_ <i>H._megidis</i>	77,24	80,38	78,89	80,36	79,06	79,91	80,59	75,85	94,22	93,46	93,80	95,91		90	132	139	138	178	171	179	188	182	280	203	315
AY321481_ <i>H._zealandica</i>	76,06	79,37	77,80	79,45	77,85	78,21	79,15	74,83	92,00	90,75	92,41	92,80	90,51		153	156	159	187	178	190	196	189	281	201	311
AY321477_ <i>H._bacteriophora</i>	78,64	81,85	80,53	81,83	80,91	80,51	81,43	78,21	87,28	85,03	87,38	87,20	85,96	83,81		21	20	147	145	149	169	165	284	196	327
HQ896630_ <i>H._beicherriana</i>	78,08	80,67	79,89	80,65	80,39	79,91	80,67	77,73	86,47	84,52	86,47	86,60	84,84	83,01	97,82		21	145	143	148	175	170	289	194	327
EU099032_ <i>H._georgiana</i>	78,62	81,83	80,50	81,81	80,89	80,70	81,62	78,18	86,63	83,89	86,63	86,55	85,30	83,16	97,98	97,82		141	140	144	169	165	287	192	329
AY321483_ <i>H._indica</i>	90,00	91,71	90,95	91,70	91,31	90,78	91,61	90,61	82,44	79,08	82,22	82,14	80,69	79,74	84,13	83,87	84,76		9	16	78	76	269	176	301
FJ152545_ <i>H._gerrardi</i>	90,25	91,03	90,75	91,02	91,27	90,75	90,91	91,14	80,90	79,62	80,66	80,44	79,15	78,21	82,32	82,15	82,91	98,94		13	74	71	253	157	275
JN620538_ <i>H._noenieputensis</i>	89,62	91,57	90,60	91,38	91,08	90,56	91,47	90,33	82,40	78,61	81,79	81,80	80,54	79,39	83,89	83,52	84,42	98,33	98,47		78	78	267	179	308
DQ372922_ <i>H._floridensis</i>	97,98	98,61	98,45	98,57	99,34	97,64	98,41	98,30	82,00	78,15	81,81	81,69	80,06	79,26	82,27	81,10	82,25	91,82	91,26	91,98		15	281	176	301
AF548768_ <i>H._baujardi</i>	96,92	97,21	97,20	97,21	98,35	96,95	97,21	98,03	77,82	78,29	78,08	77,78	75,99	75,00	78,40	77,81	78,37	90,00	90,65	89,74	98,10		272	160	280
EU273598_ <i>O._chongmingensis</i>	65,34	68,42	66,79	68,38	66,98	67,60	68,53	62,39	69,22	64,04	70,35	69,49	68,78	68,21	68,13	67,34	67,79	69,12	67,35	69,31	68,64	62,64		215	403
AF036946_ <i>P._typica</i>	64,13	66,79	65,77	66,73	65,36	64,92	66,41	58,78	62,98	54,62	62,79	62,79	61,33	61,71	62,45	62,84	63,08	65,89	62,62	65,24	66,22	59,18	57,51		226
X03680_ <i>C._elegans</i>	64,76	68,63	66,08	67,92	65,92	67,28	68,95	61,90	66,88	62,00	66,56	66,37	65,38	65,79	64,46	63,38	64,20	66,92	65,80	66,88	68,32	62,11	56,05	54,71	

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

3.4.3 Identificação morfológica e morfométrica

A caracterização morfológica e morfométrica do isolado *Heterorhabditis* sp. UENPn-01 foi feita a partir da média de medidas de 25 machos, 25 fêmeas hermafroditas, 25 fêmeas de segunda geração e 25 juvenis infectantes (Tabela 3.4).

As características morfológicas observadas para o isolado UENPn-01, quando comparadas com outra população de *H. mexicana* e as demais espécies *Heterorhabditis* são diferentes de todas as análises realizadas, tanto para machos quanto para juvenis infectantes (Tabela 3.5 e 3.6).

Com relação ao tamanho dos machos, observou-se que o isolado UENPn-01 é maior que os machos das espécies *H. mexicana*, *H. amazonensis*, *H. indica* e *H. taysearae*, e menor que *H. floridensis* e *H. baujardi*. Por outro lado, o cálculo de SW (medida da espícula/diâmetro anal x 100) foi menor quando comparado a todas as outras espécies analisadas, sendo o mesmo observado por Nguyen et al. (2004) para *H. mexicana*, que apresentou valores de SW menores que as espécies comparadas.

Com relação ao cálculo do GS (gubernáculo/espícula x 100) o isolado UENPn-01 apresentou valor próximo a *H. indica* e *H. baujardi*, sendo maior que *H. taysearae* e menor aos demais, diferindo de *H. mexicana* que teve valor maior que todas as outras espécies comparadas entre machos (Nguyen et al., 2004) (Tabela 3.5).

Por outro lado, foi possível observar durante as medições que o isolado UENPn-01 apresenta o poro excretor dos machos localizado abaixo do bulbo basal, quando comparado com outras espécies de *Heterorhabditis*. No Entanto, Nguyen et al. (2004) observaram que *H. mexicana* também possui essa característica semelhante ao observado nas análises do isolado UENPn-01.

Em relação aos JIs, o isolado UENPn-01 apresentou o tamanho do corpo (L) maior que *H. indica* e menor que os demais isolados comparados (Tabela 3.6). A calda sem cutícula (T) é menor que as demais espécies comparadas, exceto a *H. taysearae*, apresentando diferenças discrepantes entre elas.

As diferenças morfológicas presentes entre espécies ocorrem devido ao clima, a localização geográfica e também devido a interação do NEP com os hospedeiros (STOCK et al., 2000).

Tabela 3.4 Morfometria de *Heterorhabditis* sp. UENPn-01. As medidas são em µm na forma: média ± dp (variação) (N=25).

Character	Macho	Hermaphrodita (1ª geração)	Fêmea (2ª geração)	Juvenis Infectantes
N	25	25	25	25
L	783,44 ± 53,7 (714-889)	4433,8 ± 400,3 (3731-4923)	1817 ± 155,5 (1571-2159)	536,8 ± 19,0 (508-571)
a				24,3 ± 1,9 (22-29)
b				4,9 ± 0,4 (4,2-5,8)
c				5,6 ± 0,6 (4,7-7,1)
V		42,5 ± 2,7 (37-47)	45,9 ± 1,4 (44-48)	
Maior diâmetro do corpo (W)	45,3 ± 2,2 (40-48)	242 ± 24,3 (192-269)	130,2 ± 18,5 (111-159)	22,0 ± 2,0 (20-24)
Comprimento do estoma		13,9 ± 2,0 (12-16)	12,6 ± 1,5 (12-16)	
Largura do estoma		12,3 ± 1,1 (12-16)	12,3 ± 1,1 (12-16)	
EP	143,4 ± 4,4 (136-152)	161,3 ± 15,3 (140-196)	123,4 ± 7,2 (108-132)	90,6 ± 8,3 (76-108)
NR	75,4 ± 3,2 (68-80)	122,4 ± 15,1 (96-148)	91,2 ± 4,8 (80-96)	74,2 ± 8,6 (56-92)
ES	115,2 ± 3,5 (108-124)	190,2 ± 14,2 (160-216)	146,4 ± 5,7 (136-152)	109,9 ± 7,8 (96-120)
Reflexão testicular	107,8 ± 10,7 (84-124)			
Comprimento cauda com cutícula (T)				96,5 ± 10,2 (76-116)
Comprimento cauda sem cutícula (T)	42,4 ± 4,1 (36-52)	110,6 ± 15,4 (88-140)	84,0 ± 5,0 (76-96)	77,4 ± 11,6 (52-100)
Diâmentro anal (ABW)	26,2 ± 2,2 (24-32)	58,9 ± 4,8 (52-68)	34,6 ± 3,2 (28-40)	15,4 ± 2,5 (12-20)
Comprimento da espícula (SP)	34,9 ± 2,5 (32-40)			
Espícula (SW)	4,4 ± 0,8 (4-6)			
Comprimento do gubernáculo (G)	17,3 ± 1,9 (16-20)			
D% = EP/ES x 100	124,5 ± 2,4 (120-129)			82,4 ± 4,2 (76-93)
E% = EP/T x 100				94,6 ± 10,6 (75-114)
SW% = SP/ABD x 100	131,2 ± 11,7 (113-150)			
GS% = G/SP x 100	49,6 ± 4,2 (44-56)			
Hialina/Cauda x 100				80,0 ± 5,4 (68-89)
Parte Anterior até a Vulva		1878 ± 154,9 (1654-2192)	834,8 ± 81,2 (714-984)	

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

Tabela 3.5 Comparação morfométrica em μm de machos de *Heterorhabditis* sp. UENPn-01 com outras espécies do gênero *Heterorhabditis*.

Character	UENPN-01	<i>H. mexicana</i>	<i>H. amazonensis</i>	<i>H. indica</i>	<i>H. floridensis</i>	<i>H. baujardi</i>	<i>H. taysearae</i>
L	783,44 $\pm$ 53,7 (714-889)	686 $\pm$ 38 (614-801)	752 $\pm$ 43 (692-826)	721 $\pm$ 64 (573-788)	862 $\pm$ 44 (785-924)	889 $\pm$ 45 (818-970)	703 $\pm$ 23 (648-736)
Maior diâmetro do corpo (W)	45,3 $\pm$ 2,2 (40-48)	42 $\pm$ 3 (38-47)	41 $\pm$ 2.3 (36-43)	42 $\pm$ 7 (35-46)	47.6 $\pm$ 2.2 (43-50)	49 $\pm$ 2 (43-53)	43 $\pm$ 2.3 (38-48)
EP	143,4 $\pm$ 4,4 (136-152)	124 $\pm$ 10 (108-145)	109 $\pm$ 6 (96-116)	123 $\pm$ 7 (109-138)	117 $\pm$ 6 (104-128)	81 $\pm$ 7 (71-93)	95 $\pm$ 12 (78-120)
NR	75,4 $\pm$ 3,2 (68-80)	71 $\pm$ 6 (61-83)	79 $\pm$ 5 (71-88)	75 $\pm$ 4 (72-85)	80 $\pm$ 5 (73-90)	65 $\pm$ 7 (54-77)	65 $\pm$ 11 (54-88)
ES	115,2 $\pm$ 3,5 (108-124)	96 $\pm$ 5 (89-108)	105 $\pm$ 5 (97-114)	101 $\pm$ 4 (93-109)	105 $\pm$ 4 (97-111)	116 $\pm$ 10 (105-132)	112 $\pm$ 12 (85-123)
Comp. cauda sem cutícula (T)	42,4 $\pm$ 4,1 (36-52)	27 $\pm$ 4 (21-36)	33 $\pm$ 2.7 (29-41)	28 $\pm$ 2 (24-32)	34 $\pm$ 5.8 (29-40)	33 $\pm$ 3 (28-38)	25 $\pm$ 5 (20-29)
Diâmetro anal (ABW)	26,2 $\pm$ 2,2 (24-32)	24 $\pm$ 1,3 (23-27)	27 $\pm$ 2.6 (23-33)	23 $\pm$ 8 (19-24)	26.3 $\pm$ 3 (20-31)	22 $\pm$ 1 (20-24)	25 $\pm$ 2.9 (21-30)
Comp. da espícula (SP)	34,9 $\pm$ 2,5 (32-40)	41 $\pm$ 3,8 (30-47)	41 $\pm$ 2.9 (35-45)	43 $\pm$ 3 (35-48)	42 $\pm$ 3.5 (36-46)	40 $\pm$ 3 (33-45)	39 $\pm$ 4.8 (30-42)
Comp. do gubernáculo (G)	17,3 $\pm$ 1,9 (16-20)	23 $\pm$ 3 (18-32)	21 $\pm$ 1.5 (19-23)	21 $\pm$ 3 (18-23)	23 $\pm$ 3.7 (17-30)	20 $\pm$ 1.5 (18-22)	18 $\pm$ 3.2 (14-21)
D% = EP/ES x 100	124,5 $\pm$ 2,4 (120-129)	129 $\pm$ 9 (114-149)	103 $\pm$ 3.7 (95-109)	122 -	112 $\pm$ 4 (105-119)	70 -	88 -
SW% = SP/ABD x 100	131,2 $\pm$ 11,7 (113-150)	167 $\pm$ 20 (130-196)	152 $\pm$ 20 (120-187)	187 -	157 $\pm$ 25 (133-209)	182 $\pm$ 18 (138-208)	156 -
GS% = G/SP x 100	49,6 $\pm$ 4,2 (44-56)	56 $\pm$ 7 (43-70)	51 $\pm$ 32 (44-56)	50 $\pm$ 10 (40-60)	53.8 (47-65)	50 $\pm$ 5 (44-61)	46 -

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

Tabela 3.6 Comparação morfométrica em μm de Juvenil Infectante de *Heterorhabditis* sp. UENPn-01 com outras espécies do gênero *Heterorhabditis*.

Character	UENP01	<i>H. mexicana</i>	<i>H. amazonensis</i>	<i>H. indica</i>	<i>H. floridensis</i>	<i>H. baujardi</i>	<i>H. taysearae</i>
L	536,8 $\pm$ 19,0 (508-571)	578 $\pm$ 23 (530-620)	589 $\pm$ 12 (567-612)	528 $\pm$ 26 (479-573)	562 $\pm$ 24 (554-609)	551 $\pm$ 27 (497-595)	418 $\pm$ 38 (332-499)
a	24,3 $\pm$ 1,9 (22-29)	25,8 (23,6-28,4)	26 $\pm$ 1.3 (24-29)	26 $\pm$ 4 (25-27)	27.6 $\pm$ 5.2 (25-32)	28 $\pm$ 1 (26-30)	21 $\pm$ 2.2 (18-27)
b	4,9 $\pm$ 0,4 (4,2-5,8)	4,6 (4,2-5,1)	4.9 $\pm$ 0.3 (4.4-5.5)	4.5 $\pm$ 0.34 (4.3-4.8)	4.3 $\pm$ 2.1 (3.9-4.9)	4.8 $\pm$ 0.2 (4.5-5.1)	3.8 $\pm$ 0.2 (3.4-4.2)
c	5,6 $\pm$ 0,6 (4,7-7,1)	5,9 (5,5-6,3)	5.5 $\pm$ 0.2 (5.1-6.1)	5.3 $\pm$ 0.5 (4.5-5.6)	5.6 $\pm$ 2.4 (5.3-6.6)	6 $\pm$ 0.3 (6-6.7)	7.7 $\pm$ 0.7 (6.5-8.7)
Maior diâmetro do corpo (W)	22,0 $\pm$ 2,0 (20-24)	23 $\pm$ 0,8 (20-24)	23 $\pm$ 1.2 (20-24)	20 $\pm$ 6 (19-22)	21.2 $\pm$ 4.6 (19-23)	20 $\pm$ 2 (18-22)	20 $\pm$ 1.9 (17-23)
EP	90,6 $\pm$ 8,3 (76-108)	102 $\pm$ 5,2 (83-109)	107 $\pm$ 6.1 (89-115)	98 $\pm$ 7 (88-107)	109 $\pm$ 10.4 (101-122)	97 $\pm$ 3 (91-103)	90 $\pm$ 9.1 (74-113)
NR	74,2 $\pm$ 8,6 (56-92)	81 $\pm$ 4,2 (74-88)	85 $\pm$ 4.9 (76-93)	82 $\pm$ 4 (72-85)	86 $\pm$ 9.2 (68-107)	81 $\pm$ 3 (75-86)	64 $\pm$ 6.8 (58-87)
ES	109,9 $\pm$ 7,8 (96-120)	122 $\pm$ 27 (104-142)	121 $\pm$ 6.6 (107-132)	117 $\pm$ 3 (109-123)	135 $\pm$ 11.6 (123-142)	115 $\pm$ 3 (107-120)	110 $\pm$ 8.4 (96-130)
Comp. cauda com cutícula (T)	77,4 $\pm$ 11,6 (100-52)	99 $\pm$ 4,2 (91-106)	107 $\pm$ 4.7 (98-115)	101 $\pm$ 6 (93-109)	103 $\pm$ 10.1 (91-113)	90 $\pm$ 4 (83-97)	55 $\pm$ 6.6 (44-70)
Comp. cauda sem cutícula (T)	80,0 $\pm$ 5,4 (68-89)	66 $\pm$ 3 (59-73)	69 $\pm$ 4.4 (59-74)	- (48-68)	63 $\pm$ 7.9 (48-68)	- (11-14)	- (11-14)
Diâmentro anal (ABW)	15,4 $\pm$ 2,5 (12-20)	15 $\pm$ 1,2 (12-17)	14 $\pm$ 1.4 (13-17)	- (12-16)	14 $\pm$ 3.7 (12-16)	13 $\pm$ 0.7 (11-14)	- (11-14)
D% = EP/ES x 100	82,4 $\pm$ 4,2 (76-93)	81 $\pm$ 3 (72-86)	88 $\pm$ 2.7 (83-92)	84 $\pm$ 5 (79-90)	81 $\pm$ 8.9 (71-90)	84 $\pm$ 3 (78-88)	83 $\pm$ 6 (71-96)
E% = EP/T x 100	94,6 $\pm$ 10,6 (75-114)	104 $\pm$ 5,2 (87-111)	100 $\pm$ 6.0 (89-109)	94 $\pm$ 7 (83-103)	105 $\pm$ 10.2 (95-134)	108 $\pm$ 4 (98-114)	180 $\pm$ 27 (110-230)

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

3.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

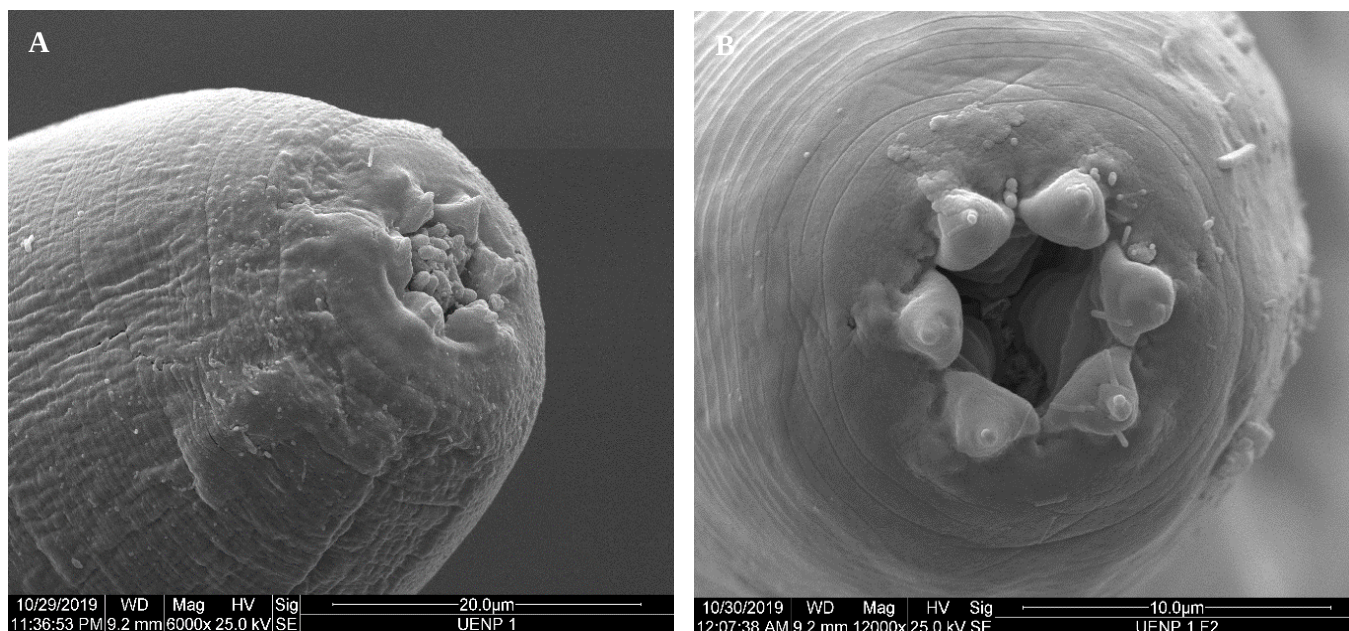
Após o preparo das amostras para MEV, apenas as fases de fêmea hermafrodita, machos e fêmea de segunda geração ficaram adequadas para a captura de imagens. Foi possível observar as regiões parte anterior, com a presença das seis papilas labiais, e posterior, com a presença do ânus na região caudal.

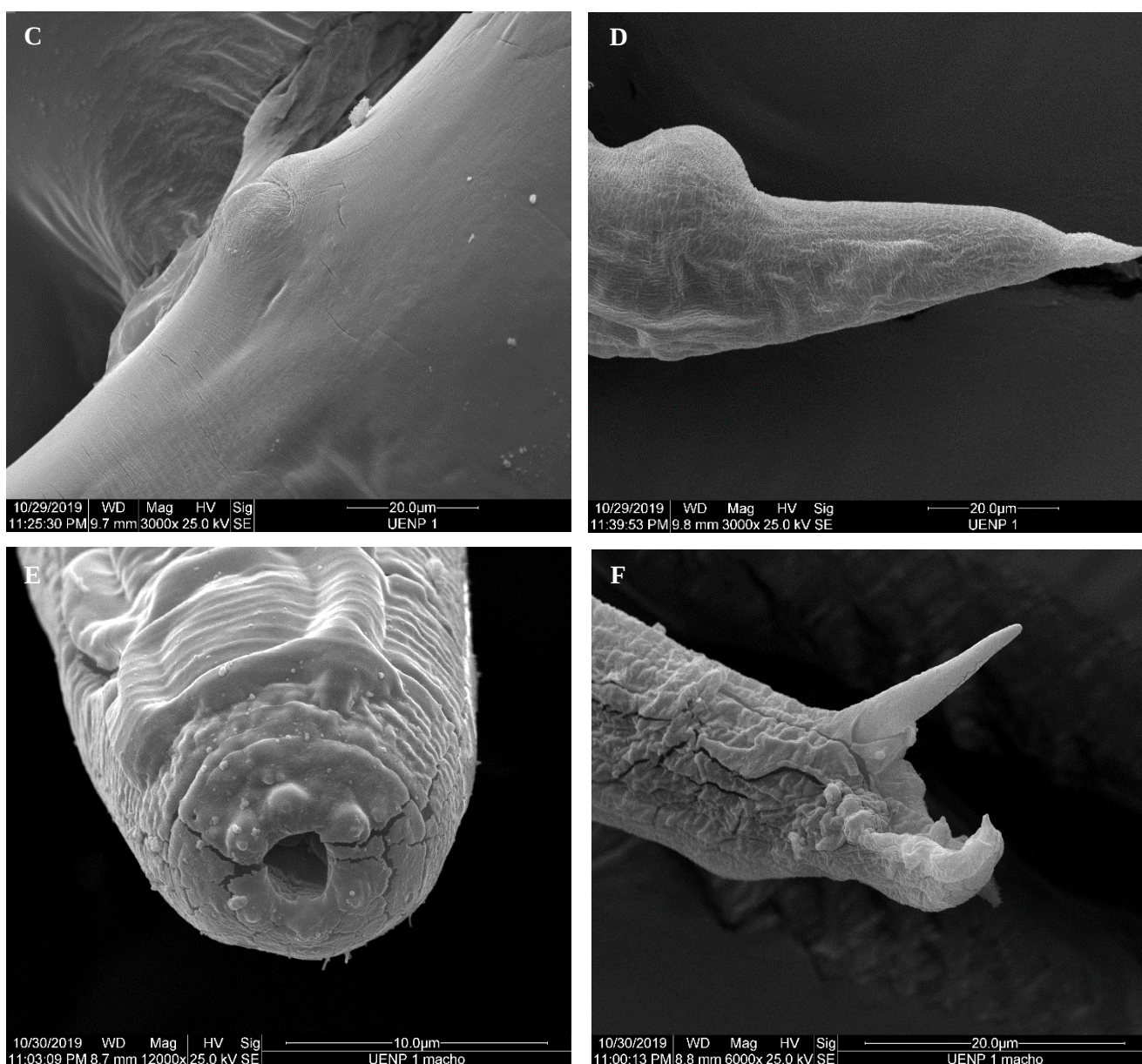
De acordo com Nguyen et al. (2004), que realizaram a descrição da espécie *H. mexicana*, as fêmeas hermafroditas apresentam características semelhantes as observadas neste trabalho, como região anterior com seis papilas labiais proeminentes, sendo que cada lábio apresenta uma papila labial terminal (Figura 3.5, A e B).

Além disso, a vulva tem forma protuberante localizada na região mediana mais próxima à região anterior e com abertura em forma transversal, o que foi igualmente observado para as fêmeas do isolado UENPn-01 (Figura 3.5 C). Observou-se a região caudal onde está localizado o ânus (Figura 3.5 D). Ainda de acordo com Nguyen et al. (2004) as fêmeas de segunda geração apresentam estruturas semelhantes as fêmeas da mesma geração do isolado UENPn-01, porém menores, o que também foi observado neste trabalho.

No caso dos machos, foi possível observar a região anterior, a presença das seis papilas labiais (Figura 3.5 E), e na região posterior, a cauda e a espícula (Figura 3.5 F).

Figura 3.5 Fotos de Microscopia Eletrônica de Varredura das fêmeas do isolado UENPn-01.





A: Região anterior da fêmea hermafrodita com papilas labiais; B: Região anterior da fêmea de segunda geração com presença de papilas e lábios; C: Vulva da fêmea hermafrodita; D: Cauda e ânus da fêmea hermafrodita; E: Região anterior do macho com as papilas labiais; F: Cauda e espícula do macho.

3.4.5 Teste de patogenicidade e virulência

No teste de patogenicidade e virulência realizado com as lagartas de *G. mellonella*, pôde-se observar uma mortalidade de 88% diferindo significativamente em relação a testemunha (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 Porcentagem de mortalidade confirmada (%) de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com isolado UENPN-01 após cinco dias.

Tratamento	Mortalidade (%)
UENPN-01	88,0 ± 3,42 a*
Controle	0,0 ± 0,0 b
CV (%)	9,38

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna diferem entre si pelo Teste F ($p \leq 0,05$).

Guide (2019) observou no teste realizado com *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08) que o isolado causou uma mortalidade de 100% em lagartas de *G. mellonella*. Em trabalho semelhante com o nematoide *H. amazonensis*, os autores observaram uma mortalidade de 90% em relação ao tratamento controle (ANDALÓ et al., 2009). Molina et al. (2005) realizaram o mesmo teste, mas com diferentes isolados de *Heterorhabditis* sp., e observaram que estes apresentaram variação na patogenicidade sobre lagartas de *G. mellonella*, variando de 89 a 100% de mortalidade. Assim, esses trabalhos mostraram que *G. mellonella* é susceptível aos NEPs, corroborando os dados obtidos no presente trabalho. Relacionado ao resultado obtido com UENPN-01, mostrou que é um nematoide patogênico, com a capacidade de infectar o hospedeiro, e também é virulento, pois é capaz de matar o mesmo.

3.4.6 Ciclo de vida

Com relação ao ciclo de vida curto do isolado UENPN-01, verificou-se que este apresentou todas as fases de desenvolvimento: ovo, juvenil (J1, J2, J3 e J4) e adultos. Pode-se observar também, que houve a presença de fêmeas hermafroditas, que é uma característica das espécies do gênero *Heterorhabditis* (Tabela 3.8).

O aparecimento de J4 e de fêmeas hermafroditas se deu em tempos iguais aos resultados obtidos por Andaló et al. (2009) e Guide (2019) no período de 48 horas. Por outro

Tabela 3.8 Ciclo curto: duração dos estágios de desenvolvimento do isolado UENPn-01 em lagartas de *Galleria mellonella* (concentração de nematoide usada para inoculação foi de 400 JIs/lagarta).

Estágios de desenvolvimento	Tempo (horas)			
	1ª Geração	2ª Geração	3ª Geração	4ª Geração
J4	0-24			
Hermafrodita	48			
Hermafrodita + ovos/Juvenis	72			
Machos e fêmeas de 2ª Geração		96		
Juvenis de 3ª Geração			196	
Machos e fêmeas de 3ª Geração			220	
Fêmeas de 3ª Geração e Juvenis de 4ª Geração			292	
Final do ciclo (JIs)				364

lado, a presença de machos e fêmeas de segunda geração ocorreu com 96 horas, diferindo de Guide (2019) quando estas fases foram observadas no tempo de 144 horas.

Ao final do ciclo, observaram-se quatro gerações ocorrendo dentro do hospedeiro, diferindo também dos resultados obtidos por Guide (2019) e Andaló et al. (2009), que observaram apenas três gerações no ciclo de vida curto.

O tempo de duração do ciclo pode variar entre espécies de nematoides e também depende da quantidade de alimento disponível no hospedeiro (ADAMS; NGUYEN, 2002). Além disso, pode existir diferença na duração de ciclos de vida de espécies do mesmo gênero ou em isolados da mesma espécie. Estas variações se dão tanto em função de fatores relacionados ao isolado (virulência, patogenicidade, bactéria simbiote), bem como, em função de fatores externos, como variação de clima, umidade e temperatura (GREWAL et al., 1994).

3.5 CONCLUSÃO

O nematoide UENPn-01 apresenta características sintomatológicas diferentes das espécies pertencentes aos outros heterorhabditídeos.

Com base nos resultados obtidos das análises moleculares da região ITS e D2D3, sabe-se que o isolado UENPn-01 é pertencente ao gênero *Heterorhabditis*, e que está próximo à espécie *H. mexicana*, não sendo possível afirmar que ele pertença a essa espécie.

Em relação as análises de taxonomia morfológica, UENPn-01 apresentou características diferentes quando comparado com outras espécies do mesmo gênero.

Os juvenis infectantes do UENPn-01 apresentaram a capacidade de ser patogênico e virulento as lagartas de *G. mellonella*.

Quanto ao ciclo de vida, UENPn-01 apresentou as características de um ciclo do gênero *Heterorhabditis*, com hermafroditas, fêmeas e machos, com a capacidade de se desenvolver de maneira rápida, chegando até a quarta geração.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. J.; BURNELL, A. M.; POWERS, T. O. A Phylogenetic Analysis of Heterorhabditis (Nemata: Rhabditidae) Based on Internal Transcribed Spacer 1 DNA Sequence Data. **Journal Of Nematology**, v. 1, n. 30, p.22-39, 1998.
- ADAMS, B.J.; NGUYEN, K.B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, New York. 2002. Cap. 1 p. 1-28.
- ALMENARA, D. P.; ROSSI, C.; NEVES, M. R. C.; WINTER, C. E. Nematoides Entomopatogênicos. In: **Tópicos avançados em entomologia molecular**. São Paulo, p. 1-40, 2012.
- ANDALÓ, V.; MOINO JR, A.; SANTA-CECÍLIA, L.V.C. Compatibilidade de nematoides entomopatogênicos com produtos fitossanitários utilizados na cultura do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, v. 28, p. 149-158, 2004
- ANDALÓ, V.; MOREIRA, F. G.; CAVALCANTI, R. S.; MOINO JUNIOR, A. Observations on the Life Cycle and Pathogenicity of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 2, 194-197, 2009a
- ANDALÓ, V.; MOREIRA, G.F.; MOINO JUNIOR, A.. Studies of two new populations of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematropica**, v. 29, n. 2, p.199-211, 2009b
- ANDALÓ, V.; NGUYEN, K. B.; MOINO JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology**, v. 8, n. 6, p. 853-867, 2006
- BARBOSA-NEGRISOLI, C.R.C. et al. Survey of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Nematologia Brasileira**, p.189-197, 2010
- BEDDING, R. A.; AKHURST, R. J. A. Simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. **Nematologica**, v. 21, p. 109-110, 1975.
- BOEMARE, N. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**. New York: Cabi Publishg, 2002. Cap.2 p.35-51.
- CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. Nictation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). **Brill**, v. 126, n. 3/4, p.155-169, 1993.
- CHASTON, J.; GOODRICH-BLAIR, H. Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.34, n.1, 34, p. 41-58, 2010.

CONSTANT, P.; MARCHAY, L.; FISHER-LESAUX, M.; BRIAND-PANOMA, S.; MAULÉON, H. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Guadeloupe islands. **Fundamental And Applied Nematology**, Paris, v. 21, n. 6, p.667-672, 1998.

COSTA, J. C. R. **Estudo da ecologia de infecção dos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapse* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) em *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).** 2006. 109 f. Dissertação (Mestrado em Concentração de Comportamento e Biologia Animal) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2006.

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

DE LEY, P. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. **Wormbook**, p.1-8, 2006.

DELL'ACQUA, R. **Identificação molecular e morfométrica de nematoides entomopatogênicos (Nematoda: rhabditida) e eficiência de *Heterorhabditis* spp. no controle de *Bradysia* sp. (Diptera: sciaridae) em cultivo protegido de crisântemo.** 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, 2011.

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

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

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

DONEZE, Gabriela Souza. **Caracterização molecular de nematoides entomopatogênicos (ISOLADOS UENP 02, 05 E 06) nativos da região Norte do Paraná.** 2019. 25 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte do Paraná - Campus Cornélio Procopio, Cornélio Procopio, 2019.

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

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

FLOYD, R.; ABEBE, E.; PAPERT, A.; BLAXTER, M. Molecular barcodes for soil nematode identification. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 4, p.839-850, 2002.

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

FORST, S.; CLARKE, D. Bacteria–Nematode Symbiosis. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. New Jersey: Cabi Publishing, 2002. Cap.3 p. 57-74.

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

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

GRENIER, E.; CATZEFLIS, F. M.; ABAD, P. Genome sizes of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida). **Parasitology**, v. 114, n. 5, p.497-501,1997

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

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

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

HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, Randy. **Entomopathogenic Nematology**. Surrey: Cabi Publishing, 2002. Cap. 6. p. 115-137.

JONES, John. Nematode Sense Organs. In: LEE, Donald L. **The Biology of Nematodes**. London And New York: Taylor & Francis, 2002. p. 1284.

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

KAYA, H. K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. **Manual of techniques in insect pathology**. New York: Academic Press, p. 281-324. 1997

LEWIS, E. E. Behavioural Ecology. In: GAUGLER, Randy. **Entomopathogenic Nematology**. New Jersey: Cabi Publishing, 2002. Cap. 10 p. 205-220.

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

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

LIU, J.; POINAR, G. O.; BERRY, R. E.. Control of Insect Pests with Entomopathogenic Nematodes: The Impact of Molecular Biology and Phylogenetic Reconstruction. **Annual Review Of Entomology**, v. 45, n. 1, p.287-306, 2000.

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

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

MRAČEK, Z., BEČVÁR, S., KINDLMANN, P., JERSÁKOVÁ, J. Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. **Biological Control**, v. 34, n. 1, p. 27–37, 2005

NASMITH, C. G.; SPERANZINI, D.; JENG, R.; HUBBES, M. RFLP Analysis of PCR Amplified ITS and 26S Ribosomal RNA Genes of Selected Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae). **Journal Of Nematology**, v. 28, n. 1, p.15-25, mar. 1996.

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

NGUYEN, K. B.; MARUNIAK, J.; ADAMS, B. J. Diagnostic and Phylogenetic Utility of the rDNA Internal Transcribed Spacer Sequences of *Steinernema*. **Journal of Nematology**. p. 73-82. 2001.

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

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

NGUYEN, K B.; SMART JUNIOR, G. C.. *Steinernema scapterisci* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae). **The Journal Of Nematology**, v. 22, n. 2, p.187-199, 1990.

POINAR, G.O. Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids. *Heterorhabditis* and *Steinernema*. **Fundamental and Appl. Nematology**. v. 16, 333-338, 1993.

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

RIFFEL, A.; COSTA, J. G. da (Ed.). Os Voláteis de Plantas e o seu Potencial para a Agricultura. 2015. **Documentos Embrapa**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/142135/1/Doc-201.pdf>>. Acesso em: 08 nov. 2019.

SAN-BLAS, E.; CAMPOS-HERRERA, R.; DOLINSKI, C.; MONTEIRO, C.; ANDALÓ, V.; LEITE, L. G.; RODRÍGUEZ, M. G.; MORALES-MONTERO, P.; SÁENZ-APONTE, A.; CEDANO, C.. Entomopathogenic nematology in Latin America: A brief history, current research and future prospects. **Journal Of Invertebrate Pathology**, v. 165, p.22-45, 2019.

SEINHORST, J.W. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. **Nematologica**, v. 4, p. 67-69, 1959.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; LEWIS, E. E.; SCHLIEKELMAN, P. Aggregative group behavior in insect parasitic nematode dispersal. **International Journal For Parasitology**, v. 44, n. 1, p.49-54, jan. 2014.

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

STOCK, S. P. Presence of *Steinernema scapterisci* Nguyen et Smart parasitizing the mole cricket *Scapteriscus boizellii* in Argentina. **Nematologia Mediterranea**, Buenos Aires, v. 20, n. 2, p.163-165, 1992.

STOCK, S. P. Diversity, Biology and Evolutionary Relationships. In: CAMPOS-HERRERA, Raquel (Ed.). **Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection**. Suíça: Springer, 2015. p. 3-27.

STOCK, S. P., MRÁČEK, Z.; WEBSTER, J. M. Morphological variation between allopatric populations of *Steinernema kraussei* (Steiner, 1923). (Rhabditida: Steinernematidae). **Nematology**, v. 2, p. 143– 152, 2000.

STUART, R. J.; BARBERCHECK, MARY E.; GREWAL, P. S. Entomopathogenic Nematodes in the Soil Environment: Distributions, Interactions and the Influence of Biotic and Abiotic Factors. In: CAMPOS-HERRERA, R. **Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection** 123. Suíça: Springer, 2015. p. 97-138.

TARASCO, E.; CLAUSI, M.; RAPPAZZO, G.; PANZAVOLTA, T.; CURTO, G.; SORINO, R.; Vinciguerra, M. T. Biodiversity of entomopathogenic nematodes in Italy. **Journal of Helminthology**, v.89, n.3, p. 359-366, 2015.

TONELLI, Mateus. **Resposta de nematoides entomopatogênicos aos voláteis radiculares de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) sob herbivoria de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae)**. 2014. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Entomologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2014.

VAN TOL, R. W.H.M.; VAN DER SOMMEN, A. T.C.; BOFF, M. I.C.; VAN BEZOOIJEN, J.; SABELIS, M. W.; SMITS, P.H. Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs. **Ecology Letters**, v. 4, n. 4, p.292-294, 22 jul. 2001.

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

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