

UFRRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOSSANIDADE
E BIOTECNOLOGIA APLICADA**

DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO E VIRULÊNCIA DE BACTÉRIAS SIMBIONTES
DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NATIVOS DO BRASIL, E
TOXICIDADE DE SEUS METABOLITOS SECUNDÁRIOS PARA
LARVAS DE TRAÇA DA COLMÉIA (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

Julie Giovanna Chacon Orozco

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**CARACTERIZAÇÃO E VIRULÊNCIA DE BACTÉRIAS SIMBIONTES
DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NATIVOS DO BRASIL, E
TOXICIDADE DE SEUS METABOLITOS SECUNDÁRIOS PARA
LARVAS DE TRAÇA DA COLMÉIA (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

JULIE GIOVANNA CHACON OROZCO

Sob a Orientação do Professor
Ricardo Luis Louro Berbara

e Co-orientação do Professor
Luis Garrigós Leite

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Biotecnologia Aplicada.

Seropédica, RJ
Julho de 2014

592.57

O74c

T

Orozco, Julie Giovanna Chacon, 1987-

Caracterização e virulência de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos nativos do Brasil, e toxicidade de seus metabolitos secundários para larvas de traça da colmeia (Lepidoptera: Pyralidae) / Julie Giovanna Chacon Orozco. - 2014.

63 f.: il.

Orientador: Ricardo Luis Louro Berbara.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, 2014.

Bibliografia: f. 55-63.

1. Nematoda - Teses. 2. Bactérias - Patogênese - Teses. 3. Pragas - Controle biológico - Teses. I. Berbara, Ricardo Luis Louro, 1957- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA
APLICADA**

JULIE GIOVANNA CHACON OROZCO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em **Biotecnologia Aplicada**.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/07/2014

Ricardo Luis Louro Berbara. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Alessandra De Carvalho Silva. Dra. Embrapa Agrobiologia

Jerri Zilli. Dr. Embrapa Agrobiologia

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Ricardo Berbara* (UFRRJ), pela confiança, amizade, exemplo de seriedade e profissionalismo, e pela orientação que auxiliou na minha formação;

Ao *Prof. Dr. Luís Garrigós Leite* (IB-Campinas), pela dedicação, apoio e guia no desenvolvimento do trabalho e a elaboração do escrito;

Ao *Prof. Dr. Ricardo Harakava*, pela paciência, ensinamentos e apoio nas técnicas de biologia molecular;

Ao pesquisador do laboratório de Ecologia Microbiana, da EMBRAPA Agrobiologia: *Dr. Jerri Zilli*, pela oportunidade de fazer parte do laboratório e desenvolver parte da minha pesquisa;

À *Profª. Rosane Nora Castro*, do laboratório da Química (IQ-UFRRJ) pela colaboração na extração dos metabólitos secundários e cromatografias;

Aos amigos da UFRuralRJ: *Livia, Erika, Kandice, William e Angie*, que foram minha família no Brasil, obrigada pela ajuda com o português, pela amizade e convivência nos passeios, jantares e churrascos;

Aos amigos do Laboratório de Controle biológico, do IB - Campinas: *Lucas, Renata e Roselaine*, que me deram a mão mesmo sem me conhecer, me ajudaram no laboratório e me permitiram fazer parte de suas vidas;

A meus *Pais e familiares* que fizeram de mim a pessoa que sou hoje, e devo tudo a eles e seus ensinamentos, e independente da distância sempre me incentivaram;

Agradeço com especial ênfase, ao apoio financeiro imprescindível que recebi da CAPES, na forma de bolsa de mestrado; a EMBRAPA Agrobiologia, que me permitiu fazer o estágio durante dois anos para realizar parte da pesquisa; ao programa de pós-graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, pela oportunidade de realização deste curso e ao projeto: “Dimensionamento e exploração da diversidade de agentes de controle biológico de pragas agrícolas: entomopatógenos e ácaros predadores edáficos”, com financiamento do CNPq e FAPESP, dentro do programa SISBIOTA Brasil, Chamada 2 - Pesquisa em Redes Temáticas para Ampliação do Conhecimento sobre a Biota, o Papel Funcional, Uso e Conservação da Biodiversidade Brasileira, processo 2010/52342-4. Sem os quais não teria sido possível efetuar o trabalho de dissertação;

E finalmente agradeço a Deus que é a luz em meu caminho e ao Brasil, país pelo qual me apaixonei, e que me acolheu permitindo o desenvolvimento do mestrado.

RESUMO

CHACON-OROZCO, Julie Giovanna. **Caracterização e virulência de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos nativos do Brasil, e toxicidade de seus metabolitos secundários para larvas de traça da colméia (Lepidoptera: Pyralidae)**. 2014. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2014

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) compõem um importante grupo de agentes usados mundialmente no controle biológico. São encontrados no solo onde vivem sob a forma Juvenil Infetante (JI) a procura de um hospedeiro, normalmente insetos que tem um ou mais estágios de desenvolvimento no solo. Os NEPs gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis* carregam no seu intestino as bactérias associadas do gênero *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* respectivamente. Os JIs penetram no hospedeiro e as bactérias são liberadas dentro do hemoceloma onde reconhecem a L-proline e produzem toxinas que inibem o sistema imune do inseto. A bactéria, então, se multiplica e o inseto morre por septicemia. Neste trabalho foi feito o isolamento das bactérias simbiotes de 35 cepas de nematoides entomopatogênicos nativos de Brasil, seguido da caracterização morfológica, bioquímica (Testes API20E e API20NE) e da identificação molecular por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Também foi avaliada a toxicidade das bactérias sobre lagartas de *Galleria mellonella*, em três experimentos para testar células com metabolitos secundários (MS), suspensão de células sem MS, e MS sem células. As bactérias foram identificadas como: *X. nematophila* (isolados IBCB n2 e IBCB n48), *X. doucetiae* (IBCB n6, IBSC15, AM47 e AM163), *X. magdalenensis* (IBCB n28 e AM75), *Xenorhabdus* sp. (IBCB n34, IBCB n47, IBCB n49, CER17, CER33, CER105, CER107, CER108, CER120, CER144 e CER199), *X. szentirmaii* (PAM10, PAM11, PAM13, PAM25, PAM31, PAM42, PAM44), *X. romanii* (CER09, CER16, CER21, CER129 e CER140), *P. luminescens* (CB10 e AM71) e *P. luminescens* subsp *akurtsii* (IBCB n5). Todos os isolados foram patogênicos para *G. mellonella* em todos os experimentos. Dentre todos os isolados promissores, apenas três, *P. luminescens* subsp *akurtsii* IBCB n5, *X. romanii* CER21 e *Xenorhabdus* sp. CER106, não diferiram significativamente dos melhores isolados nos três experimentos (com célula+MS, MS e células), o que os destacam como os melhores isolados para serem usados nessas formas visando o desenvolvimento de produtos para controle de pragas.

Palavras-chave: Juvenil Infetante, patogenicidade, sequenciamento, controle biológico.

ABSTRACT

CHACON-OROZCO, Julie Giovanna. **Characterization and virulence of symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes indigenous from Brazil, and toxicity of their secondary metabolites against to the larva of the wax moth (Lepidoptera: Pyralidae).** 2014. 63 p. Dissertation (Master Science in Phytossanitary and Applied Biotechnology). Institute of Biology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2014

Entomopathogenic nematodes (NEPs) comprise an important group of agents used in biological control worldwide. They are found in the soil where they live as infective juvenile (IJ) and search for a host, usually insects that have one or more stages of development on the ground. The IJs carry in their gut an associated bacteria of the genus *Xenorhabdus* for NEPs of the genus *Steinernema*, and *Photorhabdus* to *Heterorhabditis*. The IJs penetrate the host until the haemocoel, and release the bacterium that recognize L-proline and produce toxins to inhibit the immune system of insects. The bacterium, then, multiplies and the insect dies of septicemia. In this study, 35 strains of Symbiotic bacteria were isolated from native entomopathogenic nematodes indigenous from Brazil, and identified by morphological and biochemical (Tests and API20E API20NE) tests, as well as by molecular test sequencing the 16S rDNA gene. Was also evaluated the toxicity of the bacteria on larvae of *Galleria mellonella* in three experiments to test cells with Secondary Metabolites (MS), the cell suspension without MS and MS without cells. The bacteria were identified as: *X. nematophila* (isolates IBCB n2 and IBCB n48), *X. doucetiae* (IBCB n6, IBSC15, AM47 and AM163), *X. magdalenensis* (IBCB n28 and AM75), *Xenorhabdus* sp. (IBCB n34, IBCB n47, IBCB n49, CER17, CER33, CER105, CER107, CER108, CER120, CER144 and CER199), *X. szentirmaii* (PAM10, PAM11, PAM13, PAM25, PAM31, PAM42, PAM44), *X. Romanii* (CER09, CER16, CER21, CER129 and CER140), *P. luminescens* (CB10 and AM71) and *P. luminescens* subsp *akurtsii* (IBCB n5). All isolates were pathogenic to *G. mellonella* in all experiments. Among all promising isolates, only three, *P. luminescens* subsp *akurtsii* IBCB n5, *X. Romanii* CER21 and *Xenorhabdus* sp. CER106, did not differ significantly from the best isolates in the three experiments (with Cell + MS, MS and cells), which stand out them as the best isolates for use in these ways for the development of products for pest control.

Key Word: infective Juvenile, patogenicity, sequencing, biological control.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1.** Bactérias *Xenorhabdus* (A) e *Photorhabdus* (B) no intestino do JI dos NEPs, *Steinernema* e *Heterorhabditis*. (Fodor *et al.*, data não publicada).....4
- Figura 2.** Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos, associados a bactérias simbiotes (Hinchliffe *et al.*, 2010).....5
- Figura 3.** Flagelos peritricos de *X. nematophila* (Holly *et al.*, 2011).....10
- Figura 4.** Colônias de *Xenorhabdus sp.* em FI crescendo em ágar NBTA e produzindo metabolitos secundários (Crawford *et al.*, 2010).....10
- Figura 5.** Lagartas de *Galleria mellonella* (Traça das colmeias) inoculadas com *P. luminescens*. (A) Não inoculada; (B) Apos 24 horas da inoculação; (C) Após 48 horas da inoculação; (D) Bioluminescência (Mannhrez, 2010).....11
- Figura 6.** Modelo de interação das diferentes proteínas do Tc, expressadas por *E. coli* transformada com os tc genes de *Photorhabdus*.....13
- Figura 7.** Estrutura de vários antibióticos produzidos por *Xenorhabdus spp.* e *Photorhabdus spp.* segundo Forst & Nealson, 1996 (A) e Crawford *et al.*, 2010 (B).....14
- Figura 8.** Estrutura de vários antibióticos produzidos por *Xenorhabdus spp.* segundo Ji *et al.*, 2004 (A); Bode, 2009 (B, C e F); Forst & Nealson, 1996 (E e G); Crawford *et al.*, 2010 (D e H); Nollmann *et al.*, 2012 (J); schüffler *et al.*, 2009 (K).....15
- Figura 9.** Estrutura de vários antibióticos produzidos por *Photorhabdus spp.* segundo Forst & Nealson, 1996 (A e C); Orozco, 2012 (B, D, E e G) e Hu *et al.*, 2006 (F).....16

CAPITULO I

- Figura 10.** Municípios de procedência dos isolados de NEPs e seus biomas. Fonte do mapa: IBG2004, Rio de Janeiro – esc,1:5,000,00024
- Figura 11.** JIs de *Steinernema sp.* IBCB n6 saindo do cadáver de *G. mellonella* (A); Recuperação dos JIs na armadilha de White (B).....28
- Figura 12.** Aspecto das Lagartas de *G. mellonella* mortas por *Steinernema/Xenorhabdus* (A) e *Heterorhabditis/Photorhabdus* (B); Bioluminescência emitida em Lagartas mortas por *Heterorhabditis indica* IBCB n5, expostas a UV (C).28
- Figura 13.** Crescimento de colônias de *S. marcescens* no isolado CER199 a partir da hemolinfa de lagasta inoculada com NEPs.....30

Figura 14. Morfologia das colônias de *Xenorhabdus sp.* CER 107 na FI (A) detalhe da colônia (B); *Photorhabdus sp.* CBN 10 na FI (C) e *Xenorhabdus sp.* CBn 02 na FII (D).....30

Figura 15. Células de *Photorhabdus sp.* IBCB n5 cor rosa (Gram negativas) com corpos de inclusão no seu interior (setas).....31

Figura 16. Bateria de substratos do test API20NE (A) e API20E (B).....31

Figura 17. Colônias de *Xenorhabdus szentirmaii* em meio NBTA; superfície da colônia de cor metálica, isolado PAM 25(A); detalhe na lupa da superfície metálica pela formação do cristal (B); Detalhe na lupa do crescimento irregular, isolado PAM 11(C); cristais de polyiodinin formados na superfície da colônia isolado PAM 37 (D); detalhe na lupa, do cristal formado no meio de cultura (E-F).....34

CAPITULO II

Figura 18. Percentagem de mortalidade das lagartas de *G. mellonella* através do tempo cuasada pelos isolados e controles em meio LB e agua destilada esteril.....48

Figura 19. Aspecto de lagartas de *G. mellonella* mortas pelas bactérias *P. luminescens* CB10 (A), *P. luminescens* subsp *akurtsii* IBCBn 5 (B), *Xenorhabdus sp.* IBCBn 47 (C), *Xenorhabdus sp.* CER16 (D).....51

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1. Espécies da bactéria *Xenorhabdus* identificadas até 2014, os nematoides do gênero *Steinernema* dos quais foram isoladas e sua origem geográfica.....7

Tabela 2. Espécies da bactéria *Photorhabdus* identificadas até 2014, os nematoides do gênero *Heterorhabditis* dos quais foram isoladas e sua origem geográfica.....8

Tabela 3. Taxonomia das bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos.....9

Tabela 4. Principais diferenças entre os gêneros das bactérias simbiotes de NEPs (Stock, 1998).....10

CAPITULO I

Tabela 5. Identificação e procedência dos isolados de nematoides entomopatogênicos.....23

Tabela 6. *Primers* utilizados no estudo e temperatura de anelamento.....26

Tabela 7. Bactérias não-simbiotes isoladas.....29

Tabela 8. Caracterização fenotípica e bioquímica dos isolados das bactérias simbiotes dos NEPs.....38 -39

Tabela 9. Valores de homologia (%) entre as sequencias de nucleotídeos dos isolados de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* estudados e as depositadas no GenBank.....40

CAPITULO II

Tabela 10. Bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* avaliadas neste estudo.....46

Tabela 11. Mortalidade (\pm Erro padrão) de *G. mellonella* expostas a células bacterianas (CB) + metabólitos secundários (MS), MS sem CB, e CB sem MS, de isolados de *Xenorhabdus*/*Photorhabdus*, após oito dias da inoculação.....49

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico ribossomal
AN	Ágar nutriente
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico ribossomal
°C	Graus Celsius
dnaN	Gene que codifica a subunidade β da DNA polymerase III
gltX	Gene que codifica a sintetase glutamyl-tRNA
gyrB	Gene que codifica a subunidade B da DNA gyrase
H	Horas
JI	Juvenil infetivo
LB	Meio Luria-Bertani
NEPs	Nematoides Entomopatogênicos
ml⁻¹	Mililitros por litro
nm	Nanômetros
min	Minutos
MS	Metabólitos secundários
NBTA	Meio Azul de Bromotimol
mM	Micro molar
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
recA	Proteína que codifica a recombinase
Rpm	Rotações por minuto
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Tc	Complexo de toxinas
µg	Micrograma
µL	Micro litro

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 OBJETIVOS	2
3 REFERENCIAL TEÓRICO	2
3.1 Nematoides Entomopatogenicos.....	3
3.2 Ciclo de vida do complexo Nematoides entomopatogenicos-Bactérias.....	3
3.3 Distribuição e influência dos fatores climáticos.....	6
3.4 Diversidade das bactérias simbiotes.....	7
3.5 Bactérias não-simbiotes	8
3.6 Biologia das bactérias simbiotes.....	9
3.7 Bioluminescência.....	11
3.8 Fatores de virulência e patogenicidade das bactérias.....	11
3.9 Modo de ação das bactérias no inseto.....	12
3.10 Toxinas bacterianas.....	12
3.11 Antibióticos produzidos pelas bactérias.....	13
3.12 NEPs e suas bactérias simbióticas no controle biológico de pragas.....	16
3.13 Estudo das bactérias simbiotes de NEPs no Brasil.....	18

CAPITULO I

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS SIMBIOTES DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (STEINERNEMA E HETERORHABDITIS), NATIVOS DO BRASIL.

RESUMO	20
ABSTRACT	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1. Material biológico	23
2.2. Isolamento das bactérias	24
2.3. Caracterização fenotípica e bioquímica das bactérias.....	25
2.4. Caracterização molecular das bactérias	25
2.4.1. Extração do DNA total	25
2.4.2. Amplificação do 16S rRNA	26
2.4.3. Purificação do produto da PCR.....	26
2.4.4. Sequenciamento do 16S rRNA.....	26
2.4.5. Análise das sequências.....	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4 CONCLUSÃO	41

CAPITULO II

TOXICIDADE DAS BACTÉRIAS SIMBIONTES DE NEPs E SEUS METABOLITOS SECUNDARIOS EM LAGARTAS DE *G. mellonella*

RESUMO	43
ABSTRACT	44
1 INTRODUÇÃO	45
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Virulencia de <i>Xenorhabdus</i> spp., <i>Photorhabdus</i> spp e toxicidade dos seus metabolitos secundários para lagartas de <i>G. mellonella</i>	45
2.1.1 Material biológico.....	45
2.1. 2 Ativação das bactérias e preparação dos tratamentos.....	45
2.2 Analise estatística.....	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4 CONCLUSÃO	52
4 GLOSSARIO	53
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae) são parasitos obrigatórios de insetos (Blaxter *et al.*, 1998) e frequentemente usados para o controle de insetos de importância econômica, principalmente pragas do solo. São encontrados no solo onde vivem sob a forma Juvenil Infetante (JI) a procura de um hospedeiro, normalmente insetos que tem um ou mais estágios de desenvolvimento no solo. Cada uma das espécies está associada com uma bactéria simbiote do gênero *Xenorhabdus* para os steinernematídeos e *Photorhabdus* para os heterorabditídeos. Essas bactérias são carregadas no intestino do NEP e contribuem para o sucesso dos mesmos no controle biológico de insetos praga, pois potencializam a virulência e restringem o crescimento de outros micro-organismos oportunistas, garantindo o crescimento e reprodução dos nematoides.

No processo de infecção, as bactérias associadas são liberadas pelos NEPs na hemolinfa do inseto hospedeiro onde reconhecem a L-proline e produzem toxinas que inibem o sistema imune do inseto, a bactéria, então, se multiplica e o inseto morre por septicemia após 24 a 48 h da penetração dos NEPs. A eficiência com a qual o complexo nematoide-bactéria mata o hospedeiro depende da espécie, do estado fisiológico e imunológico do inseto infectado e da espécie bacteriana (Salvadori, 2011).

A patogenicidade do NEP é atribuída à bactéria simbiote, e essas vem sendo estudadas com relação a diversidade de espécies, descrição do genoma, rotas metabólicas, atividades exo-enzimáticas, produção de metabólitos especiais, processos patogênicos, capacidade de se diferenciar na população multicelular para a colonização de nichos diferentes, e uso no controle biológico de insetos praga.

O Brasil é o país com a maior biodiversidade biológica, abrigando entre 15% a 20% do número total de espécies do planeta (Fapesp, 2008), esta enorme e variada biodiversidade brasileira, dividida em seis biomas como Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pampa e Pantanal, acolhe a maior riqueza do planeta em organismos (Diniz & Ferreira, 2000).

Em função da importância do conhecimento da diversidade da microbiota do solo nas diferentes regiões, torna-se evidente a realização de estudos que venham contribuir para a ampliação de dados sobre a diversidade de microorganismos nos diferentes biomas e seu potencial uso no manejo integrado de pragas.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar bactérias associadas a nematoides entomopatogenicos de quatro biomas do Brasil e avaliar as bactérias e seus metabolitos secundários (MS) quanto ao potencial de uso como bioinseticidas

Objetivos específicos

- Caracterizar bactérias simbiotes de nematóides entomopatogenicos com base e aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares;
- Avaliar a toxicidade das bactérias e seus metabólitos secundários em lagartas de *G. mellonella*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Nematoides entomopatogênicos

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) são conhecidos como importantes agentes de controle biológico de uma ampla variedade de insetos-praga no mundo, especialmente pragas do solo. Os NEPs são parasitos obrigatórios de insetos e frequentemente usados como agentes de controle biológico de insetos de importância econômica. Estes NEPs estão representados pelas famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae, e os principais gêneros são *Heterorhabditis* Poinar e *Steinernema* Travassos respectivamente. Encontram-se associados simbioticamente com as bactérias do gênero *Xenorhabdus* para os Steinernematidae e *Photorhabdus* para os Heterorhabditidae, as quais lhes conferem vantagens no controle de insetos (Boemare, 2002).

Os NEPs possuem uma ampla gama de hospedeiros e podem ser produzidos de diferentes formas: *in vivo*, em lagartas; ou *in vitro*, através de fermentadores líquidos, o qual os torna mais atraentes para seu desenvolvimento comercial em comparação com outros microrganismos, além de serem de fácil aplicação no campo por métodos convencionais (Kaya, 2003).

Os NEPs são considerados como uma das alternativas biológicas mais relevantes para o controle de insetos-praga por seu alto potencial reprodutivo, facilidade de produção massiva e sua inocuidade, tanto para vertebrados como para invertebrados.

Durante a última década, uma série de eventos tem contribuído ao avanço na identificação e sistemática dos NEPs, como a determinação dos critérios para a descrição de novas espécies, a atualização e correção dos nomes das espécies já identificadas, e a interpretação das relações filogenéticas do Filo Nematoda fundamentadas nas evidências moleculares (Stock *et al.*, 2007).

Adicionalmente, o incremento no número de novas espécies descritas durante a última década e a busca por inimigos naturais com potencial para o manejo integrado de pragas (MIP), tem levado ao estabelecimento de um consenso metodológico entre os pesquisadores, permitindo assegurar uma adequada identificação deste grupo através do uso combinado de ferramentas taxonômicas e moleculares.

No entanto, as características principais e os meios que devem ser usados para a identificação das espécies do gênero *Heterorhabditis* ainda precisam ser criteriosamente debatidos para uma adequada definição das espécies. Os nematoides deste gênero apresentam pouca variação morfológica e alguns caracteres válidos na identificação são difíceis de se observar e requerem uma verificação muito cuidadosa, como exemplo as espículas. (Phan *et al.*, 2003, Nguyen *et al.*, 2004).

3.2 Ciclo de vida do complexo NEP-Bactéria

Juvenil infectante (JI) é a única forma do nematoide que vive fora do inseto (vida livre) e levam no seu interior células das bactérias simbiotes, formando o que se conhece como complexo NEPs-Bactéria. Nessa fase, os NEPs não se alimentam e vivem de reservas lipídicas que armazenaram previamente, sobrevivendo por longos períodos se as condições forem favoráveis (Ishibashi e Kondo, 1990).

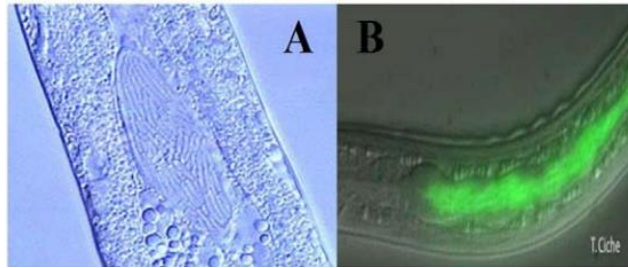


Figura 1. Bactérias *Xenorhabdus* (A) e *Photorhabdus* (B) no intestino do JI dos NEPs, *Steinernema* e *Heterorhabditis*. (Fodor *et al.*, data não publicada)

Os JIs carregam as células das bactérias em seu trato intestinal (Figura 1), sendo que o gênero *Steinernema* levam as células na vesícula intestinal especializada (Bird e Akhurst, 1983) chamada de receptáculo (Snyder *et al.*, 2007), enquanto que o gênero *Heterorhabditis*, as células bacterianas estão distribuídas ao longo do intestino, muitas vezes rodeadas por uma membrana de origem desconhecida (Ciche e Ensign, 2003).

Os JIs procuram (Figura 2) ou esperam insetos hospedeiros suscetíveis para entrar e invadir o hemocele através de aberturas naturais como boca, ânus e espiráculos. No caso de *Heterorhabditis*, pode também entrar diretamente através do tegumento dos insetos (Wang & Gaugler 1998). Assim que alcançar o hemocele, os JIs libertam as bactérias simbiotes. *Xenorhabdus* é liberado através da defecação (Wouts, 1991), enquanto *Photorhabdus* através do estoma (Ciche & Ensign, 2003).

As bactérias simbiotes se multiplicam e colonizam o hospedeiro rapidamente com a produção de metabolitos secundários (substâncias antibióticas, exo-enzimas e toxinas), causando septicemia e morte do inseto em 24 e 72 h (Poinar, 1990). Por sua vez os NEPs também produzem substâncias tóxicas contra o inseto independentemente das bactérias.

As toxinas produzidas pelas bactérias induzem a apoptose (morte celular programada) dos granulocitos ou hemócitos granulares tipo I, células essenciais do sistema imunológico do inseto encontradas em praticamente todos os tecidos do corpo, que se constituem na primeira linha de defesa celular (Götz *et al.*, 1981).

As bactérias entomopatogênicas possuem um extenso repertório de genes envolvidos na produção de toxinas e MS. Acredita-se que estas moléculas sejam responsáveis por garantir tanto o processo de patogenicidade para o inseto e a manutenção da simbiose com o nematoide (Clarke, 2008).

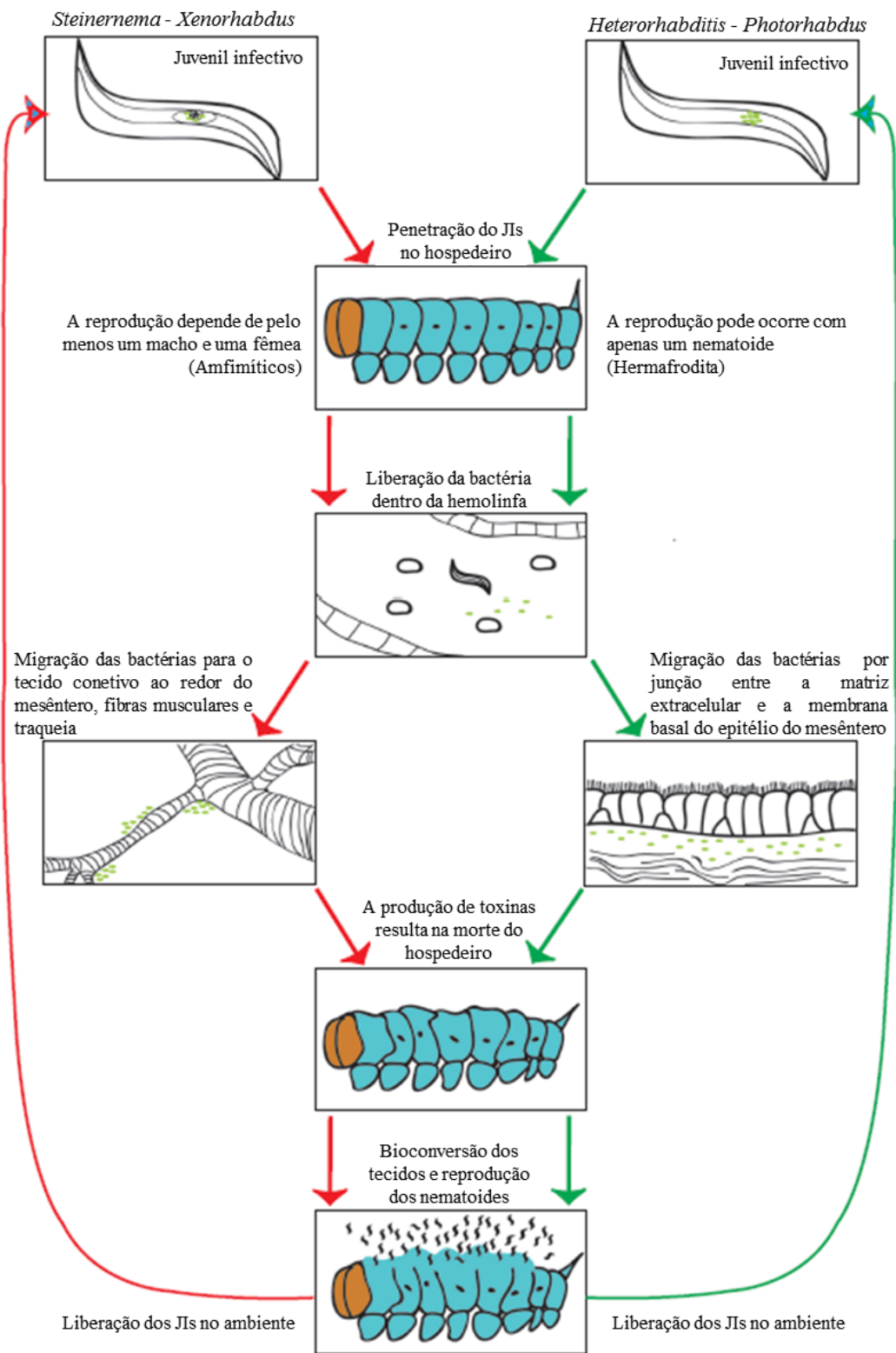


Figura 2. Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos, associados a bactérias simbiotes (Hinchliffe *et al.*, 2010)

As bactérias permitem o crescimento e reprodução dos NEPs ao disponibilizar alimento (tecido digerido do inseto), pois produzem agentes antimicrobianos como xenocoumarins, xenorhabdin (Akhust, 1982; McInerney *et al.*, 1991) e bacteriocinas (Boemare *et al.*, 1992), que inibem o crescimento de outros organismos, incluindo bactérias, leveduras, nematoides, fungos e também elementos que protegem os NEPs de insetos saprófagos (Koppenhöfer, 2007). Entretanto, alguns micro-organismos saprófitos do solo e as bactérias aderidas ao intestino do inseto ou a cutícula dos NEPs representam uma fonte potencial de competidores que podem crescer no cadáver do inseto (Bode, 2009). Estas bactérias não-simbiontes podem coabitar o cadáver junto com as bactérias simbiotes caso adquiram resistência aos antibióticos produzidos por *Xenorhabdus/Photorhabdus* durante a interação, ou caso já estejam resistentes desde o início da associação (Ortega-Estrada *et al.*, 2012).

Quando começam a se alimentar do tecido do hospedeiro, os NEPs introduzem ao mesmo tempo as bactérias simbiotes. Os JIs desenvolvem-se em adultos no interior do inseto e dão lugar a uma ou mais gerações, dependendo do tamanho do inseto. Uma das principais diferenças entre *Steinernema* e *Heterorhabditis* é o estado posterior no desenvolvimento do JI para a fase adulta. Para *Steinernema* o JI converte-se em macho ou fêmea, enquanto que para *Heterorhabditis*, converte-se em hermafrodita na primeira geração, gerando machos e fêmeas nas demais gerações (Kaya & Simmann, 1987).

No cadáver do inseto, o alimento começa a se esgotar, induzindo o nematoide a converter-se para a forma de JIs. Os nematoides incorporam as bactérias simbiotes e emergem do cadáver do inseto como JIs (Adams & Nguyen, 2002) para procurar um novo hospedeiro (Kaya & Gaugler, 1993). Em condições ideais este processo realiza-se entre quatro e dez dias para os esteinernematídeos, e entre 12 e 14 dias para os heterorabditídeos.

Estudos taxonômicos mostraram que no complexo nematoide-bactéria cada espécie de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae), está associado a uma única espécie de *Xenohabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente. Não obstante, uma espécie de bactéria pode estar associada a mais de uma espécie de NEP (Akhust & Boemare, 1990).

3.3 Distribuição e influência dos fatores climáticos

Os NEPs e as suas bactérias simbiotes estão distribuídos em diversas regiões do mundo e são encontrados no solo em profundidades que chegam a 90 cm abaixo da superfície. Esta mobilidade cruzada permite e facilita a busca dos insetos, podendo ser afetada pela umidade, temperatura e textura do solo. O mais crítico é a umidade já que os JIs precisam de um filme de água nos espaços intersticiais do solo para se locomoverem (Koppenhöfer *et al.*, 1995). A porosidade do solo afeta a dispersão, sendo menor quando os poros apresentam menor tamanho (Kaya, 1990). Na dispersão dos JIs, contribuem a ação da água, dos insetos infetados, da atividade humana, entre outros fatores.

Os JIs são atraídos pelo gradiente de CO₂ liberado pelo inseto, o qual conduz o nematoide até o seu hospedeiro. O dióxido de carbono tem um papel muito importante na agregação de JIs ao redor das raízes das plantas, um comportamento que os coloca na zona de alimentação dos insetos hospedeiros (Ishibashi & Kondo, 1990). Estudos mais recentes vêm demonstrado que as plantas atacadas pelos insetos na raiz liberam substâncias voláteis identificadas como β -cariofilenos, os quais também atraem os NEPs (Rasmann *et al.*, 2005, Hiltbold *et al.*, 2010).

As diferentes espécies de nematoides e suas bactérias simbiotes são favorecidas por diferentes faixas de temperatura (Griffin, 1993; Grewal *et al.*, 1994) que variam com a espécie ou cepa (Grewal *et al.*, 1994; Hazir *et al.*, 2001). Uma prolongada exposição a temperaturas extremas (abaixo de 0°C ou acima de 40°C) é letal para muitas espécies de NEPs (Brown *et al.*, 1996).

Os fatores abióticos como as temperaturas extremas, umidade relativa, a radiação UV (Smith, 1996; Baur & Kaya, 2001) e fatores bióticos como antibioses, competidores e inimigos naturais (Kaya e Koppenhöfer 1996; Kaya, 2002), são as principais causas que afetam a sobrevivência dos JIs e consequentemente das bactérias que se encontram no seu interior.

3. 4 Diversidade das bactérias simbiotes

Inicialmente Thomas e Poinar (1979) catalogaram as bactérias simbiotes de NEPs como pertencentes ao gênero *Xenorhabdus*, mas posteriormente, estudos feitos por Boemare *et al.* (1993) permitiram desmembrar o gênero *Photorhabdus* como um grupo isolado do gênero *Xenorhabdus*.

Até o momento, o gênero *Xenorhabdus* contém 24 espécies descritas (Tabela 1) enquanto que o gênero *Photorhabdus*, contém três espécies (Tabela 2), com 18 subespécies (Lee e Stock, 2010). Embora muitas espécies de *Steinernema* e *Heterorhabditis* já tenham sido identificadas e caracterizadas, muitas das bactérias associadas a esses nematoides ainda não foram totalmente identificadas e descritas.

Tabela 1. Espécies da bactéria *Xenorhabdus* identificadas até 2014, os nematoides do gênero *Steinernema* dos quais foram isoladas e sua origem geográfica.

Bactérias	Neps	Origem geografica (type strain)
<i>X. nematophila</i> (Poinar & Thomas, 1965)	<i>S. carpocapsae</i>	Rússia
<i>X. poinarii</i> (Akhurst, 1983)	<i>S. glaseri</i>	USA
<i>X. bovienii</i> (Akhurst, 1983)	<i>S. feltiae</i>	França
<i>X. beddingii</i> (Akhurst, 1986)	<i>Steinernema</i> sp.	Austrália
<i>X. japonica</i> (Nishimura <i>et al.</i> , 1995)	<i>S. kushidai</i>	Japão
<i>X. innexi</i> (Lengyel <i>et al.</i> , 2005)	<i>S. scapterisci</i>	Uruguai
<i>X. budapestensis</i> (Lengyel <i>et al.</i> , 2005)	<i>S. bicornutum</i>	Sérvia
<i>X. ehlersii</i> (Lengyel <i>et al.</i> , 2005)	<i>S. serratum</i>	China
<i>X. szentirmaii</i> (Lengyel <i>et al.</i> , 2005)	<i>S. rarum</i>	Argentina
<i>X. cabanillasii</i> (Tailliez <i>et al.</i> , 2006)	<i>S. riobrave</i>	USA e Jamaica
<i>X. doucetiae</i> (Tailliez <i>et al.</i> , 2006)	<i>S. diaprepesi</i>	América Central
<i>X. griffiniae</i> (Tailliez <i>et al.</i> , 2006)	<i>S. hermaphroditum</i>	Indonésia
<i>X. hominickii</i> (Tailliez <i>et al.</i> , 2006)	<i>S. monticolum</i>	Quênia e Coreia
<i>X. koppenhoeferi</i> (Tailliez <i>et al.</i> , 2006)	<i>S. scarabaei</i>	USA
<i>X. kozodoii</i> (Tailliez <i>et al.</i> , 2006)	<i>S. arenarium</i>	Rússia e Itália
<i>X. mauleonii</i> (Tailliez <i>et al.</i> , 2006)	<i>Steinernema</i> .sp.	São Vicente (Caribe)
<i>X. miraniensis</i> (Tailliez <i>et al.</i> , 2006)	<i>Steinernema</i> .sp.	Austrália
<i>X. romanii</i> (Tailliez <i>et al.</i> , 2006)	<i>S. puertoricense</i>	Porto Rico
<i>X. stockiae</i> (Tailliez <i>et al.</i> , 2006)	<i>S. siamkayai</i>	Tailândia
<i>X. indica</i> (Somvanshi <i>et al.</i> , 2009)	<i>S. thermophilum</i>	Guadalupe
<i>X.vietnamensis</i> (Tailliez <i>et al.</i> , 2010)	<i>S. sangi</i>	Vietnã
<i>X. magdalenensis</i> (Tailliez <i>et al.</i> , 2012)	<i>S. australe</i>	Chile
<i>X. ishibashii</i> (Kuwata <i>et al.</i> , 2013)	<i>S. aciari</i>	China e Japão
<i>X. khoisanae</i> (Ferreira <i>et al.</i> , 2013)	<i>S. khoisanae</i>	África do Sul

Tabela 2. Espécies da bactéria *Photorhabdus* identificadas até 2014, os nematoides do gênero *Heterorhabditis* dos quais foram isoladas e sua origem geográfica.

Bactérias	NEPs	Origem geográfica
<i>Photorhabdus luminescens</i> (Thomas e Poinar, 1979)	<i>H. luminescens</i>	China
<i>P. luminescens Luminescens</i> (Fischer-Le Saux et al., 1999)	<i>H. bacteriophora</i>	Austrália
<i>P. luminescens Akhurstii</i> (Fischer-Le Saux et al., 1999)	<i>H. indica</i>	Guadalupe
<i>P. luminescens caribbeanensis</i> (Tailliez et al., 2010)	<i>H. bacteriophora</i>	Guadelupe
<i>P. luminescens Kayaii</i> (Hazir et al., 2004)	<i>H. bacteriophora</i>	-
<i>P. luminescens Kleinii</i> (An e Grewal, 2011)	<i>H. georgiana</i>	USA
<i>P. luminescens Laumondii</i> (Fischer-Le Saux et al., 1999)	<i>H. bacteriophora</i>	Trinidad
<i>P. luminescens Hainanensis</i> (Tailliez et al., 2010)	<i>Heterorhabditis</i> sp.	China
<i>P. luminescens Noenieputensis</i> (Ferreira et al., 2013)	<i>H. indica</i>	África do Sul
<i>P. luminescens Thraceaensis</i> (Hazir et al., 2004)	<i>H. bacteriophora</i>	Turquia
<i>P. luminescens Sonorensis</i> (Orozco et al., 2013)	<i>H. sonorensis</i>	USA
<i>P. temperata</i> (Fischer-Le Saux et al., 1999)	<i>H. megidis</i>	Austrália
<i>P. temperata Cinerea</i> (Tóth & Lakatos, 2008)	<i>H. downesic</i>	Hungria
<i>P. temperata Tasmaniensis</i> (Tailliez et al., 2010)	<i>H. zealandica</i>	Austrália
<i>P. temperata Stackebrandtii</i> (An e Grewal, 2011)	<i>H. bacteriophora</i>	USA
<i>P. temperata Khanii</i> (Tailliez et al., 2010)	<i>H. bacteriophora</i>	USA
<i>P. temperata Temperata</i> (Tóth & Lakatos, 2008)	<i>H. megidis</i>	Rússia
<i>P. temperata Thracensis</i> (Tailliez et al., 2010)	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Turquia
<i>P. asymbiotica</i> (Fischer-Le Saux et al., 1999)	Não simbiótica	USA
<i>P. asymbiotica asymbiotica</i> (Akhurst et al., 2004)	Não simbiótica	Austrália
<i>P. asymbiotica australis</i> (Akhurst et al., 2004)	Não simbiótica	Austrália

3.5 bactérias não-simbiontes

Diversas outras bactérias não-simbiontes foram relatadas como associadas aos NEPs e as lagartas infetadas por NEPs (Ortega-Estrada et al., 2012), porém de forma oportunista ou em associação não conhecida. O primeiro relato foi feito por Weiser (1963) que reportou a presença de *Pseudomonas* spp. em *Steinernema carpocapsae*. A partir de cadáveres de *G. mellonella* infectadas com *S. carpocapsae*, Poinar (1966) isolou as espécies *Achromobacter nematophilus*, *Alcaligenes* sp., *Aerobacter* spp., *Proteus* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*. Lysenko e Weiser (1974) mantiveram *S. carpocapsae* por 15 anos em laboratório e isolaram, a partir dos JIs, as bactérias *Alcaligenes odorans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *P. alcaligenes* e *Acinetobacter* sp. Boemare (1983) identificou várias bactérias não-simbiontes como resistentes aos compostos antimicrobianos produzidos por *X. nematophila*. Usando JIs de *S. scapterisci*, Aguilera e Smart (1993) isolaram as bactérias *E. coli*, *Ochrobactrum anthiropi*, *Paracoccus denitrificans*, *P. aureofaciens*, *P. fluorescens*, *Xanthomonas maltophilia*. Jackson et al. (1995) verificaram a presença da bactéria *Providencia rettgeri* em cultivos de 10 linhagens do simbionte *Photorhabdus*, fato conhecido

como crescimento dixênico. Boemare *et al.* (1997) isolaram diferentes espécies de *Serratia* a partir dos JIs de *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* spp. reproduzidos por vários anos em laboratório, sugerindo que a associação do NEP com as bactérias não-simbiontes possa ser resultado de adaptações ancestrais. Babic *et al.* (2000) isolaram as bactérias *Ochrobactrum anthiropi* e *O. intermedium* relacionadas com *Heterorhabditis indica* nativos do Caribe, e verificaram que estas bactérias não possuem efeito entomopatogênico. Gouge e Snyder (2006) identificaram as bactérias *S. proteomaculans* e *S. marcescens* em associação com *Steinernema* e *Heterorhabditis*, e relataram que essa associação deve-se ao abrigo ocasional das bactérias entre as camadas das cutículas dos JIs. Lee e Stock (2010) Isolaram bactérias contaminantes como *Proteus* sp., *Serratia* sp. e *Delftia* sp. a partir de *G. mellonella* infectadas por *Xenorhabdus* spp., e diretamente a partir dos JIs. Ortega-Estrada *et al.* (2012) descreveram uma relação de foresia ocorrendo entre a bactéria *S. marcescens* e o nematoide *S. carpocapsae*, e avaliaram a virulência da bactéria não-simbionte para *G.mellonella*, concluindo que a bactéria é transportada na superfície do nematoide e não causa mortalidade nas lagartas infetadas.

3.6 Características das bactérias simbiotes

Xenorhabdus e *Photorhabdus* são bacilos Gram negativos, Gamma-Proteobacteria, da família Enterobacteriaceae (Tabela 3). São bactérias pleomórficas, ou seja, tem formas diferentes da colônia e variação de fase, de FI (forma primária ou ativa) para FII (forma secundária ou inativa). As duas fases variantes podem ser diferenciadas em vários aspectos, incluindo a virulência contra insetos ou na associação com os NEPs. De modo geral, as propriedades da FI estão muito acentuadas ou ausentes da FII (Givaudan & Lanois, 2000). Algumas das características mais relevantes encontram-se nomeadas na Tabela 4.

Tabela 3. Taxonomia das bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos

Domínio	Bactéria
Filo	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordem	Enterbacterales
Família	Enterbacteriaceae
Genero	<i>Xenorhabdus/ Photorhabdus</i>

A bactéria em FI apresenta as seguintes características: flagelos peritricos (Figura 3); produz um amplo espectro de toxinas, as quais são as responsáveis da morte do inseto hospedeiro; produz enzimas encarregadas da decomposição das proteínas e carboidratos no interior do inseto (Boemare & Akhurst, 1988); produz também antibióticos que inibem o crescimento de micro-organismos oportunistas; possui grandes inclusões para-cristalinas no seu citoplasma; forma colônias pequenas que absorvem o corante Azul de Bromotimol e reduzem o Cloreto de Trifenil-tetrazolio em placas de NBTA; e as culturas artificiais das bactérias em FI produzem também combinação (Figura 4) de proteases, lipases, quitinases e lecitinases (Akhurst & Boemare, 1990).

Tabela 4. Principais diferenças entre os gêneros das bactérias simbiotes de NEPs (Stock, 1998).

Características	<i>Xenorhabdus</i>	<i>Photorhabdus</i>
Localização nos Jis	Porção ventricular do intestino	Todo o intestino
Bioluminescência dos cadáveres	Não	FI: Sim FII: Não
Absorção do Azul de Bromotimol (BTB)	Sim	Não
Cor das colônias em NBTA	FI: Azul ou verde, com uma zona clara ao redor FII: vermelha	FI: verde com centro vermelho ou marrom FII: vermelha
Absorção do vermelho neutro	Sim	Sim
Cor das colônias em Mc Conkey	FI: Vermelhas ou rosa FII: brancas e amarelas	FI: Vermelhas ou rosa FII: brancas e amarelas

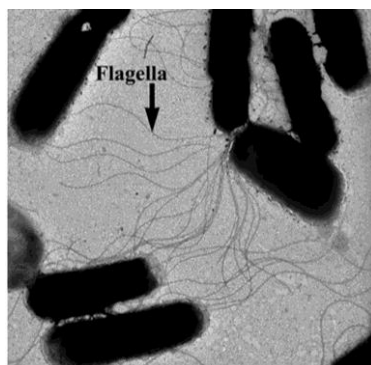


Figura 3. Flagelos peritricos de *X. nematophila* (Holly *et al.*, 2011)

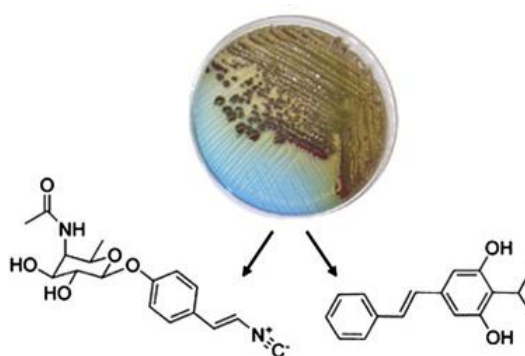


Figura 4. Colônias de *Xenorhabdus sp.* em FI crescendo em ágar NBTA e produzindo metabolitos secundários (Crawford *et al.*, 2010).

A fase II não tem flagelos e pode se manter facilmente em cultivos *in vitro* prolongados. Tem ação inseticida, mas é menos efetiva (Boemare & Akhurst, 1988); é igualmente produtora de antibióticos; não forma inclusões para-cristalinas; forma colônias grandes; não

adsorve o Azul de Bromotimol, e adquire uma cor vermelha ao degradar o cloreto de trifeniltetrazolio em placas de NBTA (Ensign, 2000; Martínez, 2010).

3.7 Bioluminescência

Espécies do gênero *Photorhabdus* são as únicas bactérias terrestres que possuem a característica de bioluminescência. A enzima catalisadora da emissão de luz foi identificada como sendo luciferase bacteriana (dímero de alfa – beta). Isto significa que utiliza o oxigênio molecular para oxidar dois substratos (um aldeído alifático de cadeia longa e um FMNH₂), produzindo uma luz cor verde-azul a 490 nm. Apesar da luciferase produzir uma luz azul-verde, o inseto fica como uma aparência vermelha, presumivelmente por causa do pigmento vermelho produzido pelas bactérias que se acumulam na carcaça do inseto (Forst & Nealson, 1996). Os genes responsáveis da produção da enzima luciferase são chamados de genes lux.

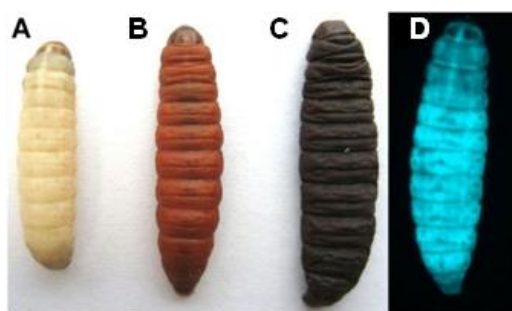


Figura 5. Lagartas de *Galleria mellonella* (Traça das colmeias) inoculadas com *P. luminescens*. (A) Não inoculada; (B) Após 24 horas da inoculação; (C) Após 48 horas da inoculação; (D) Bioluminescência (Mannhrez, 2010).

3.8 Fatores de virulência e patogenicidade das bactérias

As bactérias entomopatogênicas produzem fatores de virulência que são capazes de destruir as células responsáveis pela defesa imunitária (Gomes, 2002).

As bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* produzem exo-enzimas tais como lipases (Thaler *et al.*, 1995), quitinases (Chen *et al.*, 1996), proteases (Bowen *et al.*, 2000), e fosfolipases. As lecitinases são produzidas somente por *Xenorhabdus* e estão envolvidas na quebra de fosfolipídios de insetos proporcionando assim uma fonte lipídica para o crescimento de NEPs do gênero *Steinernema* (Mahar *et al.*, 2008). No geral, ocorre um aumento na produção dessas enzimas extracelulares durante o final da fase logarítmica e começo da fase estacionária do crescimento das bactérias, disponibilizando nutrientes para o desenvolvimento dos nematoides dentro do inseto. A hemolinfa é uma fonte rica em macromoléculas, que disponibiliza diversos substratos para ação das enzimas secretadas pelas bactérias (Forst & Nealson, 1996). Esse processo é chamado de bioconversão do inseto, tornando sua biomassa disponível para a nutrição do nematoide e nas diferentes gerações (Bode, 2009).

Além de exoenzimas, também são produzidas toxinas do grupo das citotoxinas capazes de lisar os granulócitos e impedir as reações de defesa (Ribeiro *et al.*, 1999), e antibióticos de ação fungicida e bactericida, que impedem a colonização do cadáver por outras espécies de microrganismos presentes no ambiente.

3.9 Modo de ação das bactérias no inseto

A patogenicidade das bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* está relacionada à inibição das reações de defesa do sistema imunológico do inseto hospedeiros (Dowds & Peters, 2002).

O sistema imune do inseto tem dois grandes tipos de reações de defesa celular, promovidos por células livres da hemolinfa, chamadas hemócitos (Gomes, 2002). Inicialmente ocorre a formação de nódulos ao redor dos NEPs, resultando no seu encapsulamento e isolando-os do resto das células do organismo por meio da formação de várias camadas concêntricas formadas por numerosos hemócitos, chamados plasmatócitos. Em seguida ocorre a fagocitose, promovida por diferentes tipos de hemócitos, sendo os mais eficazes os granulócitos. Este processo é favorecido pela cascata de Fenol-Oxidase (PO), um composto que faz parte do sistema imune do inseto, além de ser uma molécula essencial ao NEP que indica o momento adequado para seu desenvolvimento no interior do inseto (Joyce *et al.*, 2008).

Quando as bactérias são liberadas pelos NEPs, elas reconhecem a L-Proline presente na hemolinfa do inseto. Este componente induz ou regula a mudança metabólica das bactérias as quais passam a produzir toxinas, antibióticos e outros MS não identificados (Crawford *et al.*, 2010).

Kim *et al.*, 2005 demonstraram que as bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* se assemelham na forma como ocorre a ação inibidora do sistema imune do inseto, impedindo a formação de nódulos e a ativação da PO. Além disso, provocam também a apoptose dos granulócitos por meio de lipopolissacarídeos ou outros fatores citotóxicos (Brillard *et al.*, 2001)

3.10 Toxinas bacterianas

As bactérias simbiotes de NEPs produzem toxinas que contribuem para a letalidade do inseto e a proteção microbiana do cadáver.

A ação toxica das bactérias é promovida por um complexo de toxinas (Tc), as quais têm seus genes (tc gene) localizados em diferentes loci. Este Tc consiste em pelo menos 10 polipeptídios que são agrupados em três componentes proteicos de classe A, B e C (Bowen *et al.*, 1998), os quais se classificam com base em similaridade da sequência e tamanho. As proteínas de Classe A são muito grandes e tem um peso molecular de 280 kDa, as proteínas da Classe B com 170 kDa, e as proteínas da classe C com 110 kDa (Ffrench-Constant *et al.*, 2006).

As proteínas da classe A estão encarregadas dos efeitos citotóxicos do Tc, aquelas da classe B modula a toxicidade das proteínas de classe A, enquanto as proteínas de classe C abrigam a atividade biológica. O Tc de *Xenorhabdus* é formado pelas proteínas XptA2, XptB1 e XptC1, enquanto que o Tc de *Photorhabdus* é formado pelas proteínas TcdA1, TcdB2 e TccC3 ou TccC5 (Sheets *et al.*, 2011).

No estudo feito por Ffrench-Constant *et al.* (2007) foi demonstrado que a atividade plena do Tc requer a presença de todas as três classes de Proteínas A, B e C (Figura 6).

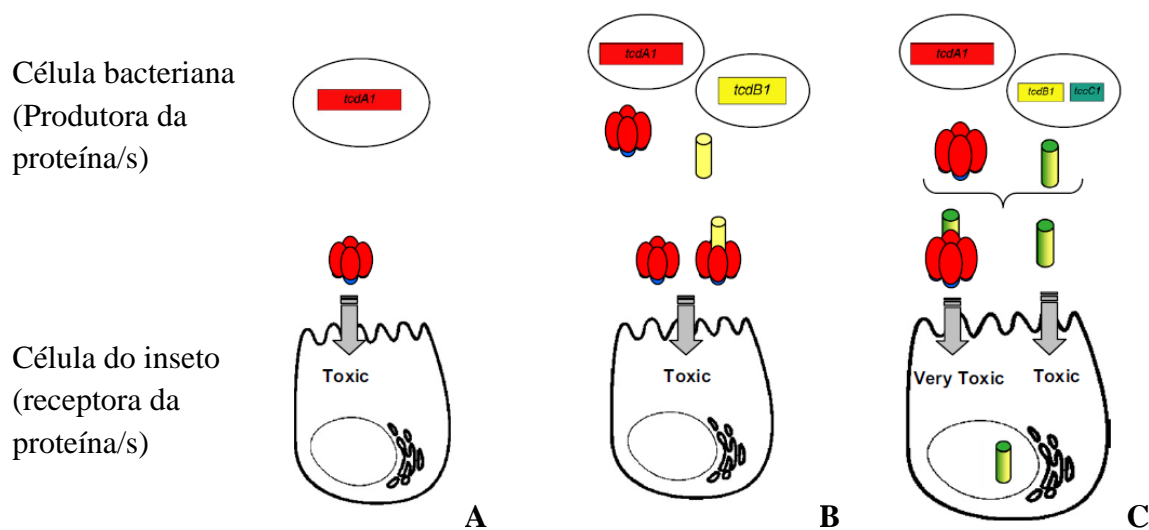


Figura 6. Modelo de interação das diferentes proteínas do Tc, expressadas por *E. coli* transformada com os tc genes de *Photorhabdus*. (A) TcdA1 (proteína da classe A) pode se unir as células do intestino do inseto e causar baixos níveis de toxicidade. (B) TcdA1 e TcdB1 (proteínas da classe A e B) expressadas em diferentes células de *E. coli* e logo misturadas antes da penetração na célula do inseto. Nota-se que somente a proteína TcdB1 não produz uma interação produtiva, ou seja não potencializa a toxicidade de TcdA1. (C) Quando a proteína TcdB1 e TccC1 são expressadas no mesmo citoplasma (*E. coli*) e logo misturadas, produzem uma interação produtiva, pois a toxicidade de TcdA1 é potencializada. (Ffrench-Constan *et al.*, 2007)

Em bactérias do gênero *Photorhabdus*, existem também proteínas relacionadas ao inseto ('*Photorhabdus* insect-related' - Pir) que são toxinas binárias PirAB (Duchaud *et al.*, 2003), tem atividade por via oral, e agrupa as proteínas relacionadas a virulência "Photorhabdus virulence cassettes" (PVCs), que são ativadas somente quando injetadas dentro da hemolinfa, com modo de ação ainda desconhecido (Ffrench-Constant *et al.*, 2006). Outras toxinas proteicas são produzidas pela expressão de um gene chamado 'makes caterpillars floppy' (Mcf). Estas toxinas promovem a destruição rápida do intestino do inseto, resultando na morte das lagartas (Daborn *et al.*, 2002).

3.11 Antibióticos produzidos pelas bactérias

A bactéria produz antibióticos permitindo o desenvolvimento dos nematoides em um ambiente bastante favorável no cadáver do inseto, livre de outras bactérias, fungos e incluso de outras espécies de nematoides (Park & Kim, 2005; Triviño *et al.*, 2006).

As bactérias simbiotas dos NEPs produzem um grande espectro de fatores antimicrobianos, como os derivados de Indol (Figura 7) que tem um amplo espectro de efeitos nematicidas (Orozco, 2012) e o Rhabduscin, composto com atividade anti-Fenol-Oxidase. Como explicado anteriormente, a Fenol-Oxidase é um componente crítico inato do sistema imune do inseto (Crawford *et al.*, 2010)

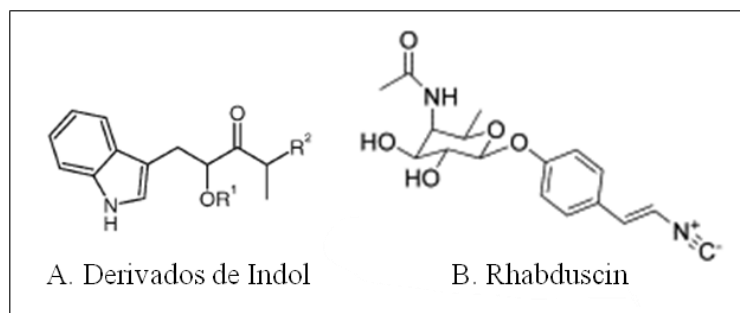


Figura 7. Estrutura de vários antibióticos produzidos por *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. segundo Forst & Neilson, 1996 (A) e Crawford *et al.*, 2010 (B).

Os antibióticos produzidos pelas bactérias do gênero *Xenorhabdus* (Figura 8), descritos na literatura, são na maioria moléculas pequenas, como Benzylideneacetone, Iodinine, Phenethylamides, e derivados de Índole, e também alguns compostos mais complexos como os Xenorhabdinas e Xenorxides, além de compostos derivados do complexo multienzimático: sintase de policétido (PKS)/ peptídeo sintase não ribossômica (NRPS) como Xenocoumacinas (XCNs), Xenematide e Xenortides (identificados como péptidos produzidos por *X. nematophila*) (Bode, 2009), Xenofuranone e Szentiamide.

A Benzylideneacetona (trans-4-phenyl-3-buten-2-one) é um composto com atividade contra algumas bactérias Gram-negativas, encontrado em *X. nematophila*, por Ji *et al.* (2004)

O exo-cristal de Poli- Iodinine é um composto antimicrobiano, encontrado unicamente na bactéria *X. szentirmaii* (Fodor *et al.*, 2008)

Outro composto produzido é o Nematophin (derivado do indol), estabelecido como indoleethyl 3-(3'-metil-2'-oxo)-pentanamida, revela uma forte bioatividade *in vitro* contra uma série de espécies de fungos e bactérias (Li *et al.*, 1997).

A Xenorhabdina é uma substância efetiva contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, mas numa menor proporção.

Os principais antibióticos produzidos por *X. nematophila* são as Xenocoumacinas (XCN), dentre os quais apenas dois são conhecidos até o momento: XCN 1 e XCN 2. Estudos realizados por Park *et al.* (2005) demonstraram que XCN1 é melhor que XCN2 na ação contra diversas bactérias, indicando diferenças desses antibióticos quanto às funções biológicas.

O péptido cíclico chamado Xenematide, cuja estrutura é PA-L-[L-Thr-Trp-D-Trp-beta-Ala]. (PA = fenilacetil), tem ação antimicrobiana fraca (Hung *et al.*, 2011)

Crawford *et al.* (2010) reportou que a L-proline (presente na hemolinfa) regula a produção de Xenematide e Nematophin, na bactéria *X. nematophila*.

A Xenofuranone (dimero de phenylpyruvate) e Szentiamide (peptídeo) foram identificados na bactéria *X. szentirmaii* (Brachmann *et al.*, 2006; Nollmann *et al.*, 2012).

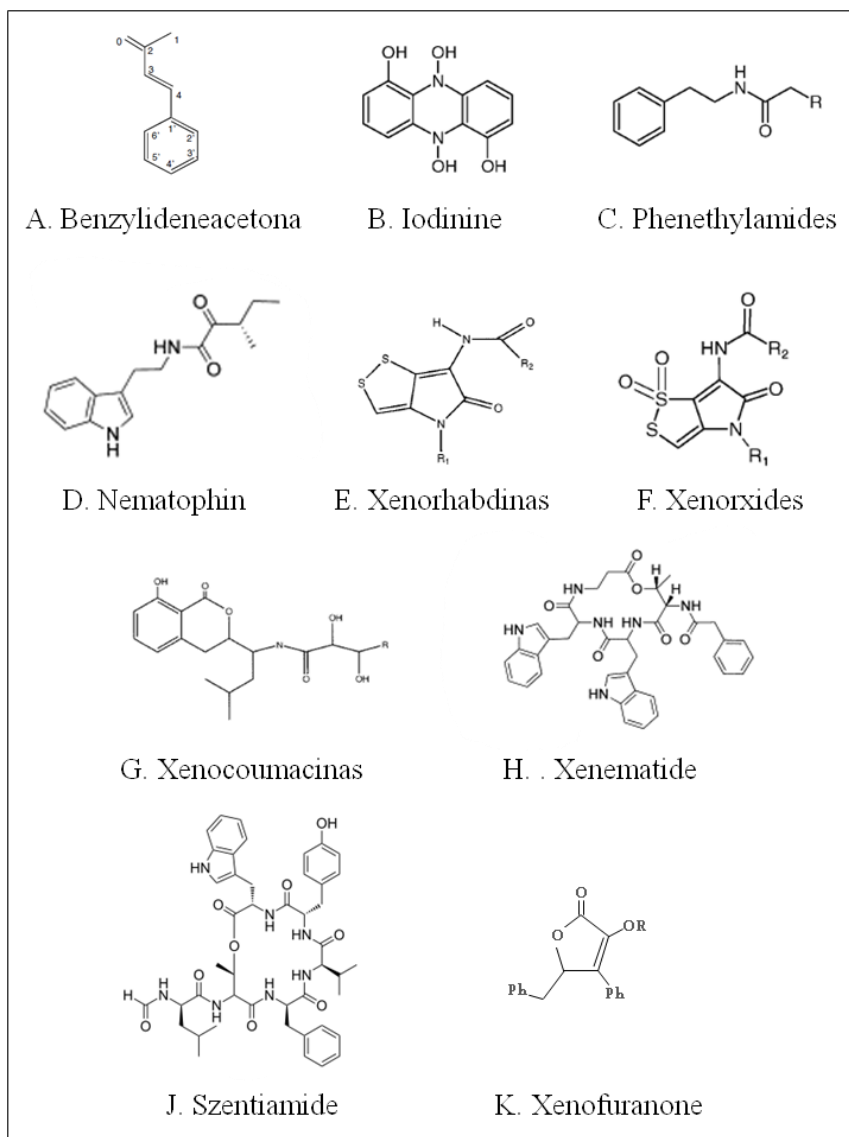


Figura 8. Estrutura de vários antibióticos produzidos por *Xenorhabdus* spp. segundo Ji *et al.*, 2004 (A); Bode, 2009 (B, C e F); Forst & Nealon, 1996 (E e G); Crawford *et al.*, 2010 (D e H); Nollmann *et al.*, 2012 (J); Schüffler *et al.*, 2009 (K).

As bactérias do gênero *Photorhabdus* (Figura 9) produzem compostos poliquetídios, como as anthraquinones poli-aromáticos, os quais possuem atividade antifúngica e antibacteriana fraca, mas tem atividade repelente contra formigas e pássaros (Pankewitz & Hilker, 2008). A produção deste composto é regulada pela L-prolina.

Photorhabdus spp. também produzem estilbenos (ST) que tem um amplo espectro antibacteriano e fortes propriedades antifúngicas além de ser um potente inibidor da Fenol-Oxidase (Eleftherianos *et al.*, 2007). Compostos tais como os estilbenos são alquenos conjugados produzidos geralmente pelo reino vegetal, que têm sido encontrados nas culturas de todas as espécies *Photorhabdus*. Essa bactéria vem sendo considerada, até o momento como o único organismo não planta que produz essa família de compostos (Crawford e Clardy, 2011). A produção deste composto é regulada também pela L-prolina. Joyce *et al.* (2008) demonstraram que o isopropylstilbene é um composto requerido para o desenvolvimento adequado dos NEPs.

Weber *et al.* (2002) registraram também a produção de hidroxi-stilbeno, composto com atividade antibiótica e nematocida, que exerce sua atividade antibiótica através da inibição da síntese de RNA.

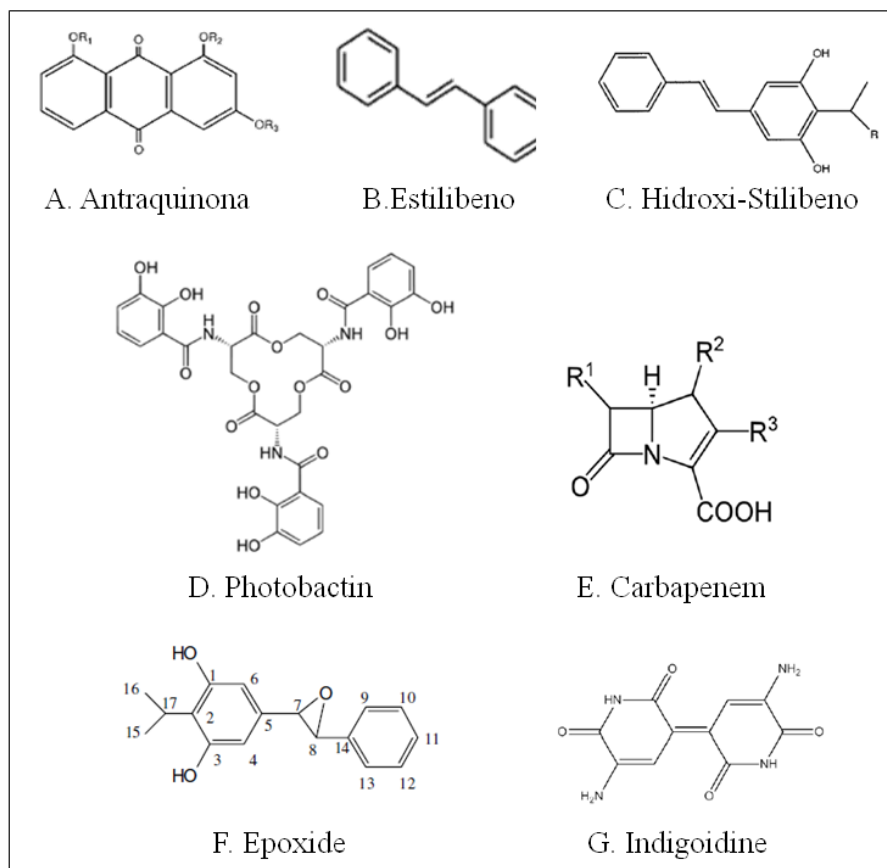


Figura 9. Estrutura de vários antibióticos produzidos por *Photorhabdus* spp. segundo Forst & Neelson, 1996 (A e C); Orozco, 2012 (B, D, E e G) e Hu *et al.*, 2006 (F).

Outros compostos como sideróforos catecolatos (photobactina) tem sido encontrado como contribuintes na antibiose do cadáver (Ciche *et al.*, 2003)

O Carbapenem é um antibiótico da classe β -lactam que tem atividade contra muitas bactérias Gram-negativa bactéria (Coulhoroust *et al.*, 2005).

O Epoxide, 2-isopropyl-5-(3-phenyl-oxiranyl)-benzene-1,3-diol, é outro composto com ação contra as bactérias, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, como demonstrado por Hu *et al.* (2006).

E por ultimo, o Indigoidine pigmento azul produzido através da NRPS, com ação antibacterial.

3.12 NEPs e suas bactérias simbióticas no controle biológico de pragas

Os NEPs são organismos com potencial para serem utilizados em programas de controle biológico (Gaugler *et al.*, 1991). Novas espécies são descobertas cada vez com mais frequência, apresentando potencial para controlar insetos praga (Powell & Webster, 2004).

Os NEPs e suas bactérias simbiontes apresentam uma série de vantagens importantes que fazem deles agentes promissores como controladores biológicos, destacando-se os seguintes aspectos: a) sua adaptabilidade e capacidade de colonizar o solo (organismos

inundativos); b) comportamento de busca para combater insetos-praga de hábitos terrestres; c) alta virulência, matando rapidamente o hospedeiro; d) são seguros para os vertebrados e plantas, não geram ameaça alguma contra o ambiente; e) são fáceis de multiplicar em condições de laboratório; f) de fácil aplicação por equipamentos convencionais e; g) são compatíveis com defensivos químicos e biológicos. Como desvantagem, dependem de condições favoráveis de umidade no solo (Kaya *et al.*, 1993).

O complexo NEP-bactéria se torna muito virulento para insetos, sendo considerado como uma das melhores alternativas não químicas para o controle de insetos em nível mundial.

Pesquisas recentes vem apresentando as bactérias simbiotes e suas secreções como agentes e produtos potenciais para uso no controle de insetos, porém estes estudos ainda são incipientes necessitando de confirmações. Além disso, Bowen *et al.* (1998) ressaltaram que é possível o uso de toxinas produzidas a partir de suspensões das bactéria simbiotes para proteger as plantas por aspersão direta (na cultura) ou por meio da transformação do genoma das plantas com os genes das toxinas.

Gotz *et al.* (1981) demonstraram, pela primeira vez que a bactéria *X. nematophila* e suas secreções são letais para lagartas de *G. mellonella* quando aplicadas na areia, o que incentivou muitas pesquisas sobre esse assunto ao redor do mundo.

Boemare *et al.* (1992) fizeram a primeira descoberta de dois tipos distintos de atividade antimicrobiana em *X. nematophila* (bacteriocinas e fagos). Ainda em 1992, Chen estudou os efeitos dos antibióticos produzidos pelas bactérias *Xenorhabdus* spp. sobre bactérias do solo. No ano seguinte, Philip Maxwell *et al.* (1993) estudaram a estabilidade e atividade antibiótica produzida por dois isolados de *X. nematophila* durante a infecção no inseto *G. mellonella*.

Em 1996, Chen descobriu dois grupos de substâncias antimicrobianas (*Nematophin* e *Xenorxides*) a partir do complexo NEP-Bactérias.

Posteriormente, os estudos foram focando na busca de bactérias para uso como controladores biológicos de insetos praga. Dudney *et al.* (1997) mostraram que a bactéria *X. nematophila* inoculada por injeção na hemolinfa, é tóxica para a formiga *Solenopsis invicta*. Jacques-olivier *et al.* (1998) testaram as propriedades da lecitinase entomotóxica por infecção em lagartas de insetos, mas não verificaram toxicidade nos insetos testados (*Locusta migratoria*, *G. mellonella*, *Spodoptera littoralis* e *Manduca sexta*). Elawad *et al.* (1999) confirmaram a toxicidade para lagartas e pupas de *Spodoptera exigua*. Ainda em 1999, Ho e Yu, inocularam lagartas de *G. mellonella* com *X. nematophila* e suas secreções (suspensão livre de células bacterianas), injetadas na hemolinfa, verificando a mortalidade nas lagartas após 20 h da inoculação.

Ribeiro (2002) estudou o efeito do fator citotóxico produzido pela bactéria *X. nematophila* sobre os hemócitos de insetos, o que permitiu purificar e caracterizar a proteína alfa-Xenorhabdolisina (α -Xlis) implicada na reação de ataque ao inseto.

Abdel-Razek (2003) avaliou os efeitos patogênicos de *X. nematophila* e *P. luminescens* em pupas de *Plutella xylostella* (L.), observando mortalidades de 60 e 40 % ao usar concentrações de 5×10^4 e 5.5×10^5 cels/ml⁻¹, respectivamente. Mahar Ali *et al.* (2005), aspergiram lagartas de *G. mellonella* com *X. nematophila* numa concentração de 4×10^7 cels/ml¹, obtendo 93% de mortalidade das lagartas seis dias após a inoculação. Nesse mesmo experimento foi avaliada a atividade das secreções tóxicas das bactérias (suspensão livre de células), obtendo-se em menor tempo (4dias) , maior mortalidade das lagartas (95%).

Em 2008, Hussien & Hanan testaram a atividade antimicrobiana das secreções bacterianas de *X. indica*, *X. nematophila*, *X.sp.* e *P. lumenscens laumondii*, crescidas em placas de Petri com as bactérias pagotênicas para humanos Gram +vas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus fecalis*) e Gram – vas (*Pseudomonas flurecens*, *Vibrio anatum*, *Salmonella typhemurium* e *Aeromonus hydrophila*). As secreções da bactéria *X. indica*

inibiram todas as bactérias, exceto *V. anatum* e *A. hydrophila*. A solução de secreções dessa bactéria foi fragmentada quimicamente em três grupos (fração proteicas, fração lipídica e fração de carboidratos) e esses grupos foram testados sobre as bactérias patogênicas, apresentando atividades antimicrobianas. Estes resultados contribuíram para conhecer a natureza dos antibióticos produzidos por *Xenorhabdus* spp., e seu potencial de uso para fins médicos, como novo agente antimicrobiano com baixo custo de produção e potente contra bactérias resistentes (Cepas resistentes à penicilina e metilicina).

Campos-Herrera *et al.* (2009) avaliaram *X. bovienii* ES14 aplicando 20 µl, numa concentração de 4×10^7 Cels/ml⁻¹, sobre lagartas de *Spodoptera littoralis*, obtendo mortalidade de 80% em 24.h.

Yam Kumar e Kyeong-Yeoll (2011) avaliaram a toxicidade dos adultos da mosca-branca (*Bemisia tabaci*), inoculadas com *P. temperata* obtendo a mortalidade máxima (100%) 60h após da inoculação, além de ter feito análise molecular para ver os efeitos da ingestão oral da bactéria no sistema imune do inseto.

3.13 Estudo das bactérias simbiotes de NEPs no Brasil

Apesar dos avanços nas pesquisas com bactérias simbiotes em nível mundial, no Brasil, estudos sobre o assunto é ainda recente. O primeiro trabalho foi publicado em 2006, ocorrendo a formação de diversos grupos de pesquisa atuando na identificação e uso desses agentes a partir desse ano.

Em 2006, DePaula *et al.* avaliaram a patogenicidade de *P. temperata* K122 sobre formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). A bactéria causou alta mortalidade (>80% e 60%), para as duas espécies de formigas após 24h de inoculação, matando em menor tempo as operárias de *A. subterraneus* comparadas aquelas de *A. laevigata*.

Carneiro *et al.* (2008) avaliaram os efeitos da bactéria *P. temperata* sobre as enzimas digestivas de lagartas de *Diatraea saccharalis* (L), verificando diminuição na atividade da alpha-glucosidase em 50% e de alpha-galactosidase em 70% após 20h da inoculação da bactéria. Também relataram a morte de todas as lagartas após 48 horas.

Kaminati (2010) caracterizou molecularmente um isolado de *Heterorhabditis* spp. e de sua bactéria simbiote *Photorhabdus* spp., provenientes de Monte Negro, RO. A bactéria isolada no trabalho foi identificada como *P. luminescens* subsp. *luminescens* linhagem MN7.

Salvadori (2011) avaliaram a patogenicidade de NEPs e de suas bactérias simbiotes, *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, pela injeção em pré-pupas de *Spodoptera frugiperda* (L), concluindo que os isolados bacterianos, especialmente de *Heterorhabditis*, causaram altos níveis de mortalidade.

Em geral, estudos sobre a ecologia, biologia e fisiologia das bactérias simbiotes ainda são escassos, sendo necessário mais estudos sobre diversidade taxonômica, distribuição (Fisher-Le *et al.*, 1998), comportamento e metabolismo, que contribuam para desvendar sobre o potencial de uso e aplicabilidade destes organismos e seus diferentes componentes.



CAPITULO I
Caracterização bioquímica e molecular de bactérias
simbiontes de nematoides entomopatogênicos
(*Steinernema* e *Heterorhabditis*) nativos do Brasil

RESUMO

Trinta e cinco bactérias simbiotes dos generos *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, da família Enterobacteriaceae, associadas respectivamente a nematoides entomopatogénicos (NEPs) dos generos *Steinernema* e *Heterorhabditis* nativos do Brasil, foram identificadas por diversas técnicas. As bactérias foram isoladas a partir da hemolinfa de lagartas de *G. mellonella* infectadas, e também por meio do macerado dos NEPs imaturos (fase juvenil infectante). As bactérias foram identificadas como *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. na fase primária, de acordo com o seu crescimento, coloração e emissão de bioluminescência em NBTA, com algumas características observadas em microscopia, e com o perfil metabólico nos testes API 20E e API 20NE. Foi feita a caracterização molecular mediante o sequenciamento do gene DNA 16Sr e as sequências obtidas foram comparadas com as sequências das bactérias já descritas, depositadas no banco de dados internacional (GenBank). As espécies bacterianas isoladas de cada nematoide apresentaram homologia com variação de 88-99%, sendo identificadas como: *X. nematophila* (isolados IBCB n2 e IBCB n48), *X. doucetiae* (IBCB n6, IBSC15, AM47 e AM163), *X. magdalenensis* (IBCB n28 e AM75), *Xenorhabdus* sp. (IBCB n34, IBCB n47, IBCB n49, CER17, CER33, CER105, CER107, CER108, CER120, CER144 e CER199), *X. szentirmaii* (PAM10, PAM11, PAM13, PAM25, PAM31, PAM42, PAM44), *X. romanii* (CER09, CER16, CER21, CER129 e CER140), *P. luminescens* (CB10 e AM71) e *P. luminescens* subsp *akurtsii* (IBCB n5). Para as espécies indefinidas, a identificação deve ser baseada ainda em análise multilocus com os genes housekeeping (*gyrB*, *recA*, *dnaN*, *rplB* e *gltX*).

Palavras-chave: Controle biológico, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, sequenciamento.

ABSTRACT

Thirty-five bacteria of the genus *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of the family Enterobacteriaceae, associated to entomopathogenic nematodes (EPNs) of the genera Steinernema and Heterorhabditis, respectively, native of Brazil, were identified by various techniques. The bacteria were isolated from the hemolymph of infected larvae of *G. mellonella*, and also through the mash of immature EPNs (infective juvenile stage). The bacteria were identified as *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. in the primary phase, according to their growth, coloration and issuing bioluminescência in NBTA, with some features observed in microscopy, and metabolic profile tests in API 20E and API 20NE. Molecular characterization was performed by sequencing the 16S gene and DNA. The sequences obtained were compared with sequences of bacteria already described, deposited in the international database (GenBank). Bacterial species isolated from each nematode showed homology ranging from 88-99%, being identified as: *X. nematophila* (isolated IBCB n2 IBCB n48), *X. doucetiae* (IBCB n6, IBSC15, AM47 and AM163), *X. magdalenensis* (IBCB n28 and AM75), *Xenorhabdus* sp. (IBCB n34, IBCB n47, IBCB n49, CER17, CER33, CER105, CER107, CER108, CER120, CER144 and CER199), *X. szentirmaii* (PAM10, PAM11, PAM13, PAM25, PAM31, PAM42, PAM44), *X. Romanii* (CER09, CER16, CER21, CER129 and CER140), *P. luminescens* (CB10 and AM71) and *P. luminescens* subsp *akurtsii* (IBCB n5). For the undefined species, identification should be still based on multilocus analysis with housekeeping genes (*gyrB*, *recA*, *nDNA*, and *rplB gltX*).

keywords: Biological control, Symbiont Bacteria, sequency.

1 INTRODUÇÃO

Os NEPs do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis* são parasitos obrigatórios de insetos e encontram-se associados a bactérias da família *Enterobacteriaceae* dos gêneros *Xenorhabdus* Thomas e Poinar 1979, e *Photorhabdus* Boemare *et al.* 1993, respectivamente. Estas bactérias são carregadas no intestino da forma juvenil infectante do nematoide, o qual as libera no hemocele do inseto, onde se reproduzem e induzem a morte do inseto por septicemia. A multiplicação da bactéria contribui para sua relação simbiótica com o NEP, assegurando sua reprodução e alimentação dentro do cadáver do inseto. Essas bactérias não são encontradas no solo e na água, sugerindo que não possuem formas de vida livre e que a associação com os NEPs é essencial para a sobrevivência das mesmas no ambiente (Rathore, 2013).

A determinação de espécies e subespécies dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* baseia-se na descrição das características morfológicas em diferentes meios de cultura, na forma e na cor das colônias, na presença de flagelos e de corpos de inclusão (dependendo da fase bacteriana), na emissão de bioluminescência, na temperatura de crescimento e em provas bioquímicas (assimilação e fermentação de carboidratos) que ajudam a conhecer o perfil metabólico, pois as bactérias secretam vários produtos extracelulares, incluindo lipases, fosfolipases, protease e antibióticos. Na identificação molecular das bactérias, utiliza-se amplificação de sequências do gene 16S rRNA para a identificação e caracterização de espécies bacterianas e para inferir suas relações filogenéticas. Atualmente a amplificação do gene 16S rRNA não é usado como o único critério de identificação de novas espécies, devido a falta de variação genética na sequência (Lee e Stock, 2010), como comprovado por Tailliez *et al.* (2006) onde a diferença entre os genes 16S rRNA de dois espécies de *Xenorhabdus* é muito baixa (3-5%). Por isto, tem sido considerada também a amplificação dos genes housekeeping (*gyrB*, *recA*, *dnaN*, *rplB* e *gltX*), conhecidos por serem altamente conservados, altamente expressados e resistentes a altos níveis de transferência lateral de genes, além de evoluir numa taxa mais rápida do que o gene 16S rRNA (Lawrence *et al.*, 1991).

Segundo Peteira *et al.* (2008), é difícil a identificação de novas espécies bacterianas, já que a maioria das cepas são fenotipicamente muito similares e os testes clássicos de identificação não mostram resultados conclusivos, além de serem pouco confiáveis devido ao número insuficiente de indivíduos por táxon. Portanto, poucas espécies têm sido descritas, sendo que algumas dessas foram descritas com poucos isolamentos.

O gênero *Xenorhabdus* contém 24 espécies descritas, enquanto que o gênero *Photorhabdus* contém três espécies, com 18 subespécies, sendo que a maiorias das identificações foram feitas nos últimos 10 anos.

Segundo Adams *et al.* (2006), tem sido cada vez mais frequente a identificação de NEPs e suas bactérias simbiotes, embora os levantamentos desses organismos ainda se restrinjam a uma pequena parte do globo. Os avanços nos estudos com NEPs e suas bactérias, junto com a exploração de múltiplas fontes de dados genéticos e fenótipos moleculares está contribuindo para um conhecimento cada vez maior sobre o assunto.

O presente estudo teve como objetivo conhecer as espécies de bactérias associadas aos NEPs nativos do Brasil, caracterizados com base em métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares, por meio da amplificação do gene 16S rRNA.

2 MATERIAL E METODOS

2.1 Material Biológico

Os 39 nematoides entomopatogênicos utilizados para o isolamento das bactérias foram obtidos da coleção de nematoides do laboratório de Controle Biológico, do Instituto Biológico, Campinas-SP (Tabela 5). Sendo escolhidos aleatoriamente dos biomas, Cerrado, Mata Atlântica, Amazonia e Pampa do Brasil (Figura10) buscando ampliar a diversidade dos indivíduos. Os nematoides foram coletados a partir de amostras de solo mediante a técnica do inseto-armadilha usando lagartas de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) (Bedding & Akhurst, 1975) e recuperados mediante armadilha de White (White, 1927)

Tabela 5. Identificação e procedência dos isolados de nematoides entomopatogênicos

Identificação	Gênero e espécie	Local	Bioma
IBCB n2	<i>S. carpocapse</i>	All/USA	-
IBCB n5	<i>H. indica</i>	Itapetininga-SP	Mata Atlântica
IBCB n6	<i>S. brasiliense</i>	Porto Murтинho -MS	Cerrado
IBCB n10	<i>H. amazonensis</i>	Santa fé do sul -SP	Mata Atlântica
IBCB n28	<i>S. australe</i>	Mogi Guaçu -SP	Cerrado
IBCB n27	<i>Steinernema</i> sp.	Mogi Guaçu -SP	Cerrado
IBCB n34	<i>Steinernema</i> sp.	Naviraí - MG	Cerrado
IBCB n36	<i>Steinernema</i> sp.	Naviraí - MG	Cerrado
IBCB n39	<i>Steinernema</i> sp.	Naviraí - MG	Cerrado
IBCB n40	<i>H. amazonensis</i>	Tabapuã -SP	Mata Atlântica
IBCB n47	<i>S. puertoricense</i>	Santa Adélia -SP	Mata Atlântica
IBCB n48	<i>Steinernema</i> sp.	Itapetininga-SP	Mata Atlântica
IBCB n49	<i>Steinernema</i> sp.	Itapetininga-SP	Mata Atlântica
IBSC n15	<i>S. diapresi</i>	Teodoro Sampaio -SP	Mata Atlântica
PAM 10	<i>S. rarum</i>	Bagé -RS	Pampa
PAM 11	<i>S. rarum</i>	Bagé -RS	Pampa
PAM 13	<i>S. rarum</i>	Bagé -RS	Pampa
PAM 25	<i>S. rarum</i>	Bagé -RS	pampa
PAM 31	<i>S. rarum</i>	Bagé -RS	Pampa
PAM 37	<i>S. rarum</i>	Bagé -RS	Pampa
PAM 42	<i>S. rarum</i>	Bagé -RS	Pampa
PAM 44	<i>S. rarum</i>	Bagé -RS	Pampa
CER 09	<i>S. puertoricense</i>	Rio Verde -GO	Cerrado
CER 16	<i>S. puertoricense</i>	Rio Verde -GO	Cerrado
CER 17	<i>S. costarricense</i>	Rio Verde -GO	Cerrado
CER 21	<i>Steinernema</i> sp.	Rio Verde -GO	Cerrado
CER 33	<i>Steinernema</i> sp.	Rio Verde -GO	Cerrado
CER 105	<i>Steinernema</i> sp.	Rio Verde -GO	Cerrado
CER 107	<i>Steinernema</i> sp.	Rio Verde -GO	Cerrado
CER 108	<i>Steinernema</i> sp.	Rio Verde -GO	Cerrado
CER 120	<i>Steinernema</i> sp.	Rio Verde -GO	Cerrado
CER 129	<i>S. puertoricense</i>	Rio Verde -GO	Cerrado
CER 140	<i>S. puertoricense</i>	Rio Verde -GO	Cerrado
CER144	<i>Steinernema</i> sp.	Rio Verde -GO	Cerrado
CER 199	<i>Steinernema</i> sp.	Rio Verde -GO	Cerrado
AM 47	<i>S. diaprepsi</i>	Sinop -MT	Amazônia
AM 71	<i>H. amazonensis</i>	Sinop -MT	Amazônia
AM 75	<i>Steinernema</i> sp.	Sinop -MT	Amazônia
AM 163	<i>S. diaprepsi</i>	Sinop -MT	Amazônia

Para sua reativação, os nematoides mantidos a 15°C em água destilada estéril, foram multiplicados em lagartas de último instar de *G. mellonella* (Espécie utilizada como inseto padrão nos estudos com NEPs) criadas no laboratório de controle biológico do Instituto Biológico, Campinas. Os nematoides foram multiplicados nos insetos, dentro de placas de Petri contendo papel filtro (2 círculos), sobre o qual foi adicionado 1,5 ml da suspensão de JIs e liberados cinco lagartas. Após 8-10 dias de incubação a 25°C, os insetos mortos pelos nematoides foram transferidos para armadilhas de White. Os nematoides foram armazenados novamente a 15°C.

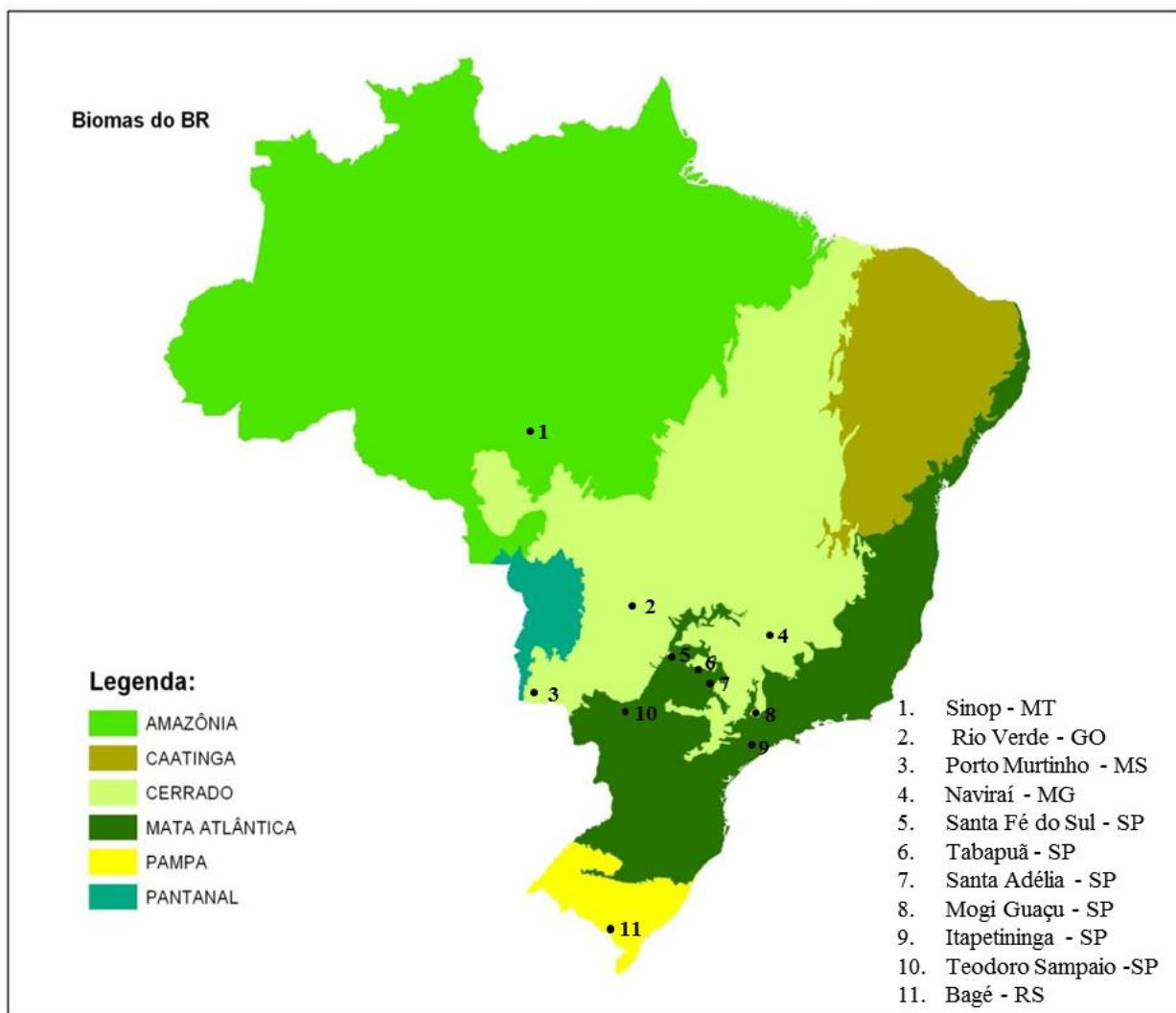


Figura 10. Municípios de procedência dos isolados de NEPs e seus biomas.
 Fonte do mapa: IBG2004, Rio de Janeiro – esc,1:5,000,000

2.2 Isolamento das Bactérias

O isolamento das bactérias foi feito por dois métodos:

a) A partir da hemolinfa do hospedeiro infectado (Akhurst, 1980). Lagartas de *G. mellonella* foram inoculadas com 1 ml da suspensão de nematoides. Logo após a morte, foram desinfestadas superficialmente com álcool 90% e flambadas. Com auxílio de um alfinete

entomológico foi feito um ferimento na parte frontal da lagasta e a hemolinfa extravasada foi riscada no meio de cultura NBTA (Agar Nutritivo; 25 mg Azul de Bromotimol; 40 mg Cloreto de Trifenil-Tetrazolio; 1000 ml⁻¹ água destilada). As placas foram incubadas no escuro durante 48-72 hs a 28 °C.

b) Pela técnica do macerado de JIs de acordo com a metodologia de Boemare *et al.* (1997). Um volume de 1 ml da suspensão de JIs foi centrifugado e o pellet formado no fundo foi desinfestado externamente com hipoclorito de sódio a 3% por quatro minutos e lavado com solução Ringer por três vezes. Os NEPs foram macerados com um pistilo e plaqueados no meio de cultura NBTA.

As colônias bacterianas de cor azul e verde foram repicadas novamente até que todas as colônias apresentassem tamanho e morfologia uniforme. Para garantir a confiabilidade do material biológico, as repicagens das bactérias foram feitas a cada oito dias, por no máximo três vezes. O armazenamento por longos períodos (não superior a 6 meses) foi feito em Glicerol 15%, congelado a -80°C.

2.3 Caracterização Fenotípica e Bioquímica das Bactérias

As bactérias foram avaliadas quanto a cor, forma e tamanho das colônias no meio de cultura NBTA após 48 h de crescimento a 28°C, e também quanto a coloração de Gram, presença de corpo de inclusão no interior das células, mobilidade, absorção de Azul de Bromotimol, redução do Cloreto de Trifenil-Tetrazolio e emissão da bioluminescência, conforme sugeridos por Boemare *et al.* (1997) e Arkhurst (1980) para determinar o gênero das bactérias.

Também foram realizados testes bioquímicos API20E e API20NE (BioMérieux, Inc. Durham, NC) para avaliar e comparar os perfis metabólicos. A prova de motilidade foi feita em Agar Nutriente (AN) semissólido dentro de tubos, para determinar a presença de flagelos. A bioluminescência foi avaliada por observação das colônias numa câmara escura com luz UV. A absorção de Azul de Bromotimol e a redução do Cloreto de Trifenil-Tetrazolium foram avaliadas em NBTA, pela formação de colônias com coloração azul/verde (*Xenorhabdus*) ou verde/vermelho (*Photorhabdus*).

2.4 Caracterização Molecular das Bactérias

2.4.1 Extração do DNA total

As bactérias isoladas foram cultivadas em 1,5 ml de meio Luria-Bertani (LB) (Tryptona, 10 g; Extrato de levedura, 5 g; NaCl, 5 g em 1 L de água) mantido sob agitação a 27 °C por 12 horas. As células crescidas foram precipitadas por centrifugação a 14.000 rpm durante dois minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 567 µL de tampão TE, 30 µL de SDS 10% e 3 µL de proteinase K (20 mg/ml⁻¹). A suspensão foi incubada a 37 °C por uma hora, e em seguida foi adicionada de 100 µL de NaCl 5M e 80 µL de CTAB/NaCl (CTAB 100 g/L, NaCl 41 g/L) para finalmente ser incubada a 65°C por 10 minutos. Adicionou-se ainda igual volume de clorofórmio/álcool isoamil (24:1) para a suspensão ser então centrifugada a 13.000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamil (25:24:1). O material foi agitado e novamente centrifugado a 13.000 rpm durante quatro minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado de 600 µL de isopropanol, sendo então agitado até ocorrer à precipitação do DNA. O DNA precipitado foi enxaguado com 1 ml de etanol 70 %, seco, ressuspensão em 60 µL de tampão TE, e armazenado a -20°C.

2.4.2 Amplificação do gene 16S rRNA

A amplificação foi feita através de reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização dos *primers* para bactérias fD1 e rP1 (Weisburg *et al.*, 1991). 1 µL do DNA bacteriano foi transferido para Eppendorf contendo 50 µL dos componentes de reação (1 µL de fD1 (10 µ M); 1 µL de rP1 (10 µ M); 10 µL de tampão 5X; 1 µL de dNTPs; 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase (5 U/ µL); 35,8 µL de água estéril). Todos os reagentes utilizados foram da marca Invitrogen.

A reação foi realizada em termociclador marca MJ Research Inc, modelo PTC100, utilizando-se o seguinte programa: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min; 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 30 s e extensão de *primers* a 72 °C por 1 min e 30 s; extensão final a 72 °C por 4 min.

Uma amostra (3 µL) do produto da amplificação de cada bactéria, adicionada de um marcador de peso molecular (1 Kb), foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % com o corante brometo de etídio (0,1 µg/ml⁻¹) em tampão TAE, para a verificação da presença de fragmentos de aproximadamente ~1500 pb.

Tabela 6. *Primers* utilizados no estudo e temperatura de anelamento

<i>Primer</i>	Orientação	5-3 Sequência	T° anelamento
16S rRNA	fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	60 °C
16S rRNA	rP1	ACGGTTACCTTGTTACGACTT	60 °C

2.4.3 Purificação do produto da PCR

Para a precipitação do produto da amplificação (16S rRNA das bactérias), em cada tubo foram adicionados 12 µL de PEG₆₀₀₀ 50%, 1,4 µL de EDTA 0,5M e 7 µL de NaCl 5M, sendo misturados e centrifugados a 4.000rpm durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado adicionado de 125 µL de Etanol 70%. A suspensão foi agitada e centrifugada a 4.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco.

2.4.4 Sequenciamento do 16S rRNA

O produto purificado (obtido da PCR) foi submetido à reação em uma placa de PCR com as seguintes proporções; 6,68 µL de DNA, 2 µL de BidDye (Applied Biosystems), 1 µL de tampão 5x (água miliQ e Tampão Save money), 0,32 µL de Primer fD1, para um volume final de 10 µL.

A reação foi realizada em termociclador marca MJ Research Inc., modelo PTC100, utilizando-se o seguinte programa: desnaturação inicial a 95 °C por um minuto; 25 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos; anelamento a 51 °C por 5 segundos; e extensão de *primers* a 60 °C por quatro minutos e 30 segundos.

Posteriormente, as placas foram retiradas do termociclador, adicionadas de 40 µL de Isopropanol 75%, e seladas com adesivo resistente a álcool. O conteúdo foi misturado por inversão da placa durante três vezes, e centrifugado a 4.000 rpm por 30 min. O excesso de Isopropanol foi descartado por inversão em papel toalha e o precipitado enxaguado com mais 100 µL de Isopropanol 75%, o qual foi também descartado após a precipitação por gravidade

do material sólido. O precipitado foi seco através de incubação em estufa a 37°C por 30 minutos, depois resuspenso em 2 µL de formamida, e desnaturado em termociclador a 95°C por dois minutos.

Finalmente, a placa foi submetida ao sequenciamento no sequenciador automático de DNA Hitachi 3500xL (Genetic analyzer), utilizando-se o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por um minuto; 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento a 51°C por cinco segundos e extensão a 60 °C por quatro minutos.

2.4.5 Análise das sequências

As sequências que apresentaram erros e/ou nucleotídeos com posições ambíguas foram avaliadas nos electroferogramas e editados no programa BioEdit (Hall, 1999). As montagens das cadeias *sense* com as *antisense* foram realizadas no programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997).

As sequências correspondentes aos *primers* de amplificação de PCR foram removidas antes do alinhamento de sequências múltiplas. As sequências dos genes 16S rRNA das bactérias, foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados internacionais GenBank através do programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de reativação utilizado foi apropriado para a reprodução dos NEPs nas lagartas de *G. mellonella*, e permitiu a obtenção dos JIs (Figura 11) após 4-6 dias da inoculação com *Steinernema* e 8-10 dias com *Heterorhaditis*.

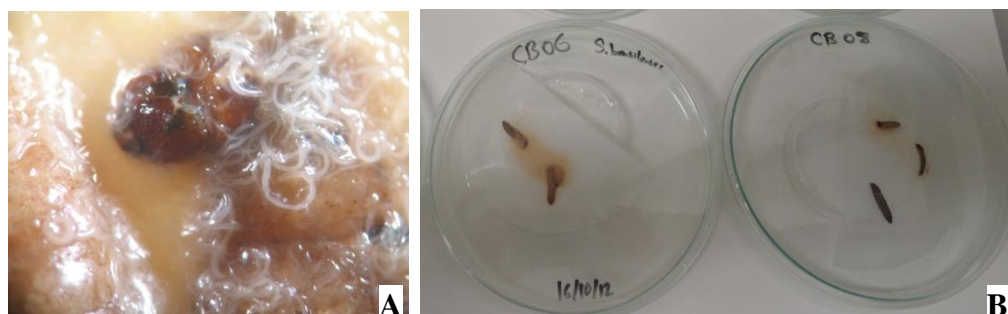


Figura 11. JIs de *Steinernema sp.* IBCB n6 saindo do cadáver de *G. mellonella* (A); Recuperação dos JIs na armadilha de White (B).

A coloração dos cadáveres das lagartas (Figura 12) foi o primeiro passo na identificação do gênero, baseando-se em Kaya (1990). As lagartas de *G. mellonella* infetadas pelo complexo nematoide/bactéria, *Steinernema/Xenorhabdus* mostravam uma cor amarela ou pardo (IBCB n2, IBCB n6, IBCB n28, IBCB n49, IBSC15, CER17, CER105, CER107, CER108, CER120, CER129 e AM47), com exceção das lagartas infetadas por *Steinernema rarum* (PAM10, PAM11, PAM13, PAM25, PAM31, PAM37, PAM42, PAM44), que mostraram uma cor vermelha clara, mas a cor foi diminuindo com a saída dos JIs da lagarta. Esta é uma característica única da espécie *S. rarum* de acordo com Nguyen *et al.* (2006). As lagartas mortas por *Heterorhabditis/Photorhabdus* mostravam uma cor marrom escura avermelhada (IBCB n5, IBCB n10, IBCB n40 e AM 71) e bioluminescência.



Figura 12. Aspecto das Lagartas de *G. mellonella* mortas por *Steinernema/Xenorhabdus* (A) e *Heterorhabditis/Photorhabdus* (B). Bioluminescência emitida em Lagartas mortas por *Heterorhabditis indica* IBCB n5, expostas a UV (C).

As bactérias foram isoladas com sucesso pelos dois métodos utilizados, a partir da hemolinfa do inseto infetado e do macerado de JIs. O método do macerado de JIs apresentou-se mais adequado, pois permitiu obter uma maior proporção de colônias na fase I em relação às colônias contaminantes. As contaminações que ocorrem nos processos de isolamento das bactérias simbiotas se devem a razões relativas aos métodos utilizados:

- para isolamentos a partir da hemolinfa, deve-se a invasão da hemolinfa por bactérias não-simbiontes que saiam principalmente do intestino do inseto após a degradação dos tecidos do hospedeiro. Essa degradação é causada pelas enzimas liberadas pelas bactérias *Xenorhabdus/Photorhabdus* durante a reprodução (Weiser, 1963; Poinar, 1966; Lysenko & Weiser, 1974; Boemare, 1983; Aguilera & Smart, 1993; Jackson et al., 1995; Boemare et al., 1997; Babic et al., 2000; Ortega-Estrada *et al.*, 2012);

- para isolamentos a partir de JIs, deve-se a presença de bactérias não-simbiontes entre as duas cutículas que protegem os nematoides durante este estágio (Gouge & Snyder, 2006).

No presente estudo, surgiram diversas espécies de bactérias não-simbiontes nas tentativas de isolamento das bactérias simbiotes, conforme listadas na Tabela 7. Estas bactérias apresentaram colônias de diferentes cores, formas e tamanhos, tendo a bactéria mais frequente apresentado colônias grandes, vermelhas e com centro branco, identificada posteriormente como *Serratia* sp. (Figura 13).

Tabela 7. Bactérias não-simbiontes isoladas

Nematoide		Método de isolamento	
		Hemolinfa do inseto infectado	Macerado de JIs
<i>S. brazilense</i>	IBCB n6	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.
<i>Steinernema</i> sp.	IBCB n27	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.
<i>Steinernema</i> sp.	IBCB n36	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.
<i>Steinernema</i> sp.	IBCB n39	-	<i>Chromobacterium</i> sp.
<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	IBCB n40	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Burkholderia</i> sp., <i>Serratia</i> sp.
<i>S. rarum</i>	PAM25	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.
<i>S. rarum</i>	PAM42	<i>Stenotrophomonas</i> sp	-
<i>S. puertoricense</i>	CER09	-	<i>Burkholderia</i> sp.
<i>S. puertoricense</i>	CER15	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.
<i>Steinernema</i> sp.	CER34	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
<i>Steinernema</i> sp.	CER108	<i>Enterobacter</i> sp	<i>Enterobacter</i> sp.
<i>Steinernema</i> sp.	CER140	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Steinernema</i> sp.	CER199	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.

Não foi possível o isolamento puro das bactérias simbiotes a partir dos nematoides *Steinernema* sp. isolados IBCB n27, IBCB n36, IBCB n39 e *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n40 devido ao crescimento massivo das bactérias contaminantes nos meios de cultura.

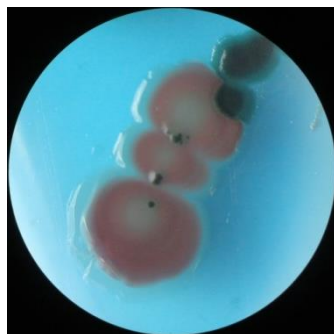


Figura 13. Colônias de *Serratia* sp. que surgiram na tentativa de isolamento de bactérias *Xenorhabdus* a partir de lagartas de *G. mellonella* infectadas com o nematoide *Steinernema* sp. CER199

Todas as bactérias foram isoladas na fase I, sendo que algumas passaram para a fase II (Figura 14d) após o quarto repique em meio sólido (oito dias para cada repique), Para manter a bactéria na fase I, essas foram repicadas por no máximo três vezes para depois serem congeladas a -20°C em Glicerol 15%.

As colônias das bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* na fase I possuem uma cor azul/verde, bem característica, devido a absorção do azul de bromotimol e a redução do Cloreto de trifenil-tetrazolium, o que permite diferenciá-las das outras bactérias não-simbióticas para um novo reisolamento em placas contendo NBTA, até obter colônias puras.

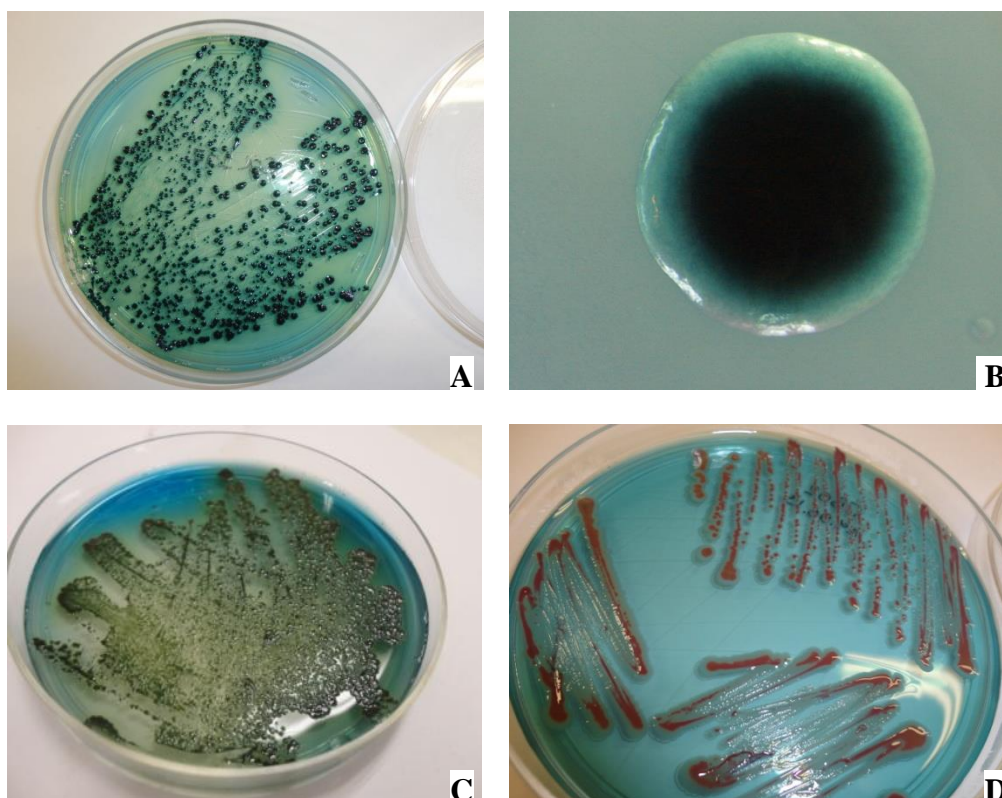


Figura 14. Morfologia das colônias de *Xenorhabdus* sp. CER 107 na F I (A) Detalhe da colônia (B); *Photorhabdus* sp. IBCB n10 na FI (C); e *Xenorhabdus* sp. CBn 02 na FII (D).

Todas as bactérias no gênero *Xenorhabdus* apresentaram colônias com morfologia granular, convexa, opaca e circular (Figura 14b), exceto para os isolados PAM que apresentaram borda irregular (Figura 17). A pigmentação de cada colônia bacteriana variou de acordo com o isolado (Tabela 8). Na coloração de Gram, foram classificadas como bactérias Gram-negativas com células em forma de bastonete, pequenas, de cor vermelha, e presença de corpos de inclusão (Figura 15).



Figura 15. Células de *Photorhabdus* sp. IBCB n5 cor rosa (Gram negativas) com corpos de inclusão no seu interior (setas).

Os isolados de *Photorhabdus* apresentaram uma morfologia convexa, opaca, circular, pegajosa (Figura 14c) e com colônias bioluminescentes.

De acordo com os testes API 20E e 20NE (Tabela 8), as bactérias isoladas apresentaram perfis metabólicos diferentes, sugerindo pertencerem à diferentes espécies ou subespécies. Os testes foram realizados seguindo as indicações dos fabricantes, por métodos qualitativos de mudança de cor no meio com os diferentes substratos (Figura 16).

Todos os isolados apresentaram reações positivas para assimilação da Glucose e hidrólise de Protease, e negativos para formação de Indol (Tryptofano), redução de Nitratos em nitritos, atividade Oxidase e fermentação de Rhamnose. Resultados similares foram obtidos por Boemare e Akhurst (1988), Lengyel et al. (2005), Tailliez et al. (2006). A maioria dos isolados não fermentaram Manitol, Inositol, Sorbitol, Saccharose, Melibiose, Amygdalin e Arabinose. Por outro lado, mais de 80% dos isolados assimilou Manose, N-acetilglucosamina, D-Maltose, Gluconato Potássico, Malato e Citrato Trissódico.



Figura 16. Diferentes reações das bactérias nos substratos para os testes, API20NE (A) e API20E (B)

As sequências do gene 16S rRNA (± 1429 pb) dos 35 isolados foram comparados às sequências homologas de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* depositadas no GenBank com o BLAST, os valores de homologia para os isolados de *Xenorhabdus* variaram 88-99%, enquanto que para os isolados de *Photorhabdus* variaram de 96-98%, conforme apresentado na Tabela 9. Para todos os isolados, o E value (probabilidade de se obter outra sequência aleatória igual) foi de 0.0.

Em seguida, foram definidas as espécies a que percentem os diferentes isolados de bactérias simbiotes com base nas suas características apresentadas pelos diferentes testes utilizados: morfológicos, bioquímicos e moleculares.

Isolados IBCB (Bioma Mata Atlântica e Cerrado)

IBCB n2- A bactéria esta associada simbioticamente com o nematoide *S. carpocapsae* (All/USA), pelo análise molecular indica ser *X. nematophila* com uma porcentagem de homologia de 97%. Forma colônias azuis em meio de cultura NBTA. Fermenta a Glucose; tem atividade para Arginina dihidrolase e para Protease (Protease); além de assimilar Manose, N-acetilglucosamina e D-Maltose.

IBCB n5- A bactéria esta associada simbioticamente com o nematoide *H. indica* IBCB n5 e pela análise molecular indica ser *Photorhabdus luminescens* subsp *akurtsii*, apresentando 98% de similaridade com um isolado dessa espécie. Forma colônias redondas e verdes com centro vermelho, pegajosa e bioluminescente. Apresenta reação positiva para hidrolise de Esculina e Protease, e negativa para índole. Usa e acidifica levemente o Manitol e Inositol. Assimila a Manose, Manitol, N-acetilglucosamina, D-Maltose, Gluconato potássico, Malato e Citrato Trissódico.

IBCB n6- A bactéria esta associada simbioticamente com o nematoide *S. brazilense* Nguyen *et al.* (2010) (isolado IBCB n6) que foi originário de amostras de solo do município de Porto Murtinho –MS. Nenhum estudo foi realizado para identificação da bactéria associada até o momento, tendo o presente estudo identificado como *X. doucetiae* com uma porcentagem de homologia de 97%. A bactéria forma colônias redondas e azuis. Fermenta levemente a Glucose. Hidrolisa a esculina e arginina, e assimila D-Maltose, Malato e Citrato Trissódico levemente.

IBCB n10- A bactéria esta associada simbioticamente com o nematoide *H. amazonenses* IBCB n10 e pela análise molecular, indica ser *Photorhabdus luminescens* subsp *luminescens*, apresentando 97% de similaridade com um isolado dessa espécie. Forma colônias redondas e verdes com centro vermelho, pegajosa e bioluminescente. Apresenta reação positiva para hidrolise de Esculina e Protease. Usa e acidifica o Manitol, Manose, N-acetilglucosamina, D-Maltose, Gluconato potássico, Ácido Caprico, Malato, Citrato Trissódico e Ácido fenilacetico. Fermenta levemente a Glucose, manitol e inositol.

IBCB n28- A bactéria esta associada simbioticamente com o nematoide *S. australe* IBCB n28 e a análise molecular indicou similaridades com as bactérias *X. romanii* e *X. magdalenensis*, pelo qual não foi possível definir a espécie. Considerando-se que o nematoide descrito na especie *S. australe* teve sua bactéria identificada como *X. magdalenensis* (Tailliez *et al.* 2012) , conclue-se que a espécie do isolado *S. australe* IBCB n28 pertence a especie *X. magdalenensis*. Forma colônias redondas e azuis. Apresenta reação positiva para hidrolise de Esculina e Protease. Usa e acidifica N-acetilglucosamina, D-Maltose, Malato e Citrato Trissódico.

IBCB n34 e IBCB n49- As bactérias estão associadas simbioticamente com o nematoide *Steinernema* sp., isolados IBCB n34 e IBCB n49 originários de amostras de solo dos municípios de Naviraí - MG e Itapetininga-SP, respectivamente. Pela análise molecular, foram identificadas como *Xenorhabdus* sp., podendo ser uma nova espécie, devido a diferenças moleculares em comparação com as bactérias já descritas anteriormente. Forma colônias redondas e verdes. Apresenta reação positiva para hidrólise de Esculina e Protease, e negativa para índole. Usa e acidifica a Manosa, N-acetilglucosamina, D-Maltose, Gluconato potássico, Malato e Citrato Trissódico.

IBCB n47- A bactéria está associada simbioticamente com o nematoide *S. puertoricense* IBCB n47, isolado de solos de Santa Adélia -SP, foi indicando ser *Xenorhabdus* sp. com 96 % de identidade com outras bactérias da mesma espécie. Forma colônias redondas e azuis. Apresenta reação positiva para Uréase, hidrólise de β -Galactosidasa (ONPG) e Arginine, negativa para Índole. Usa e acidifica Manitol, Sorbitol, Manosa, N-acetilglucosamina, Sacarose, Melibiose, amigdalina, Arabinose, D-Maltose, Gluconato potássico, Malato e Citrato Trissódico.

IBCB n48- A bactéria está associada simbioticamente com o nematoide *Steinernema* sp. IBCB n48 (Itapetininga-SP) isolado do bioma Mata Atlântica. Indica ser *X. nematophila* por apresentar 95% de similaridade com um isolado dessa espécie. Forma colônias redondas e azuis. Apresenta reação positiva para Uréase, hidrólise de β -Galactosidasa (PNG e ONPG), Esculina e Arginine. Usa e acidifica, Manitol, Sorbitol, Manosa, N-acetilglucosamina, Sacarose, Melibiose, Amigdalina, Inositol, Ácido fenilacético, Ácido capríco, Arabinose, D-Maltose, Gluconato potássico, Malato, Citrato Trissódico e Ácido Adípico levemente. Usa Lisina, Ornitina e Citrato.

IBSC 15- A bactéria está associada simbioticamente com o nematoide *S. diapresi* IBSC15, indicando ser *Xenorhabdus doucetiae* 96% de similaridade. Forma colônias redondas pequenas, convexas e azuis com borda clara. Apresenta reação positiva para Uréase, Hidrólise de Esculina e β -Galactosidasa (PNG). Assimila Arabinose, Manose, Manitol, N-acetilglucosamina, D-Maltose, Gluconato Potássico, Ácido Adípico e Citrato Trissódico. Fermenta levemente Inositol e, ao contrário do reportado por Tailliez *et al.* (2006), assimila Malato.

Isolados Bioma Pampa (PAM)

As bactérias codificadas como PAM10, PAM11, PAM13, PAM25, PAM31, PAM37, PAM42 e PAM44 foram isoladas do nematoide *Steinernema rarum*, proveniente de solos de Bagé -RS e identificadas como *Xenorhabdus szentirmaii*, com porcentagens de homologia que variaram de 96% a 99% (Tabela 9). Apresentaram colônias em NBTA com um fenótipo bem característico (Figura 17): cor metálica na superfície, bordas irregulares e formação de pontos roxos resultantes do acúmulo de exo-cristais com atividade antibiótica, chamados de Poly-iodinina. Estes cristais foram primeiramente observados e identificados por Haynes e Zeller em bactérias da mesma espécie (Fodor *et al.*, 2008).

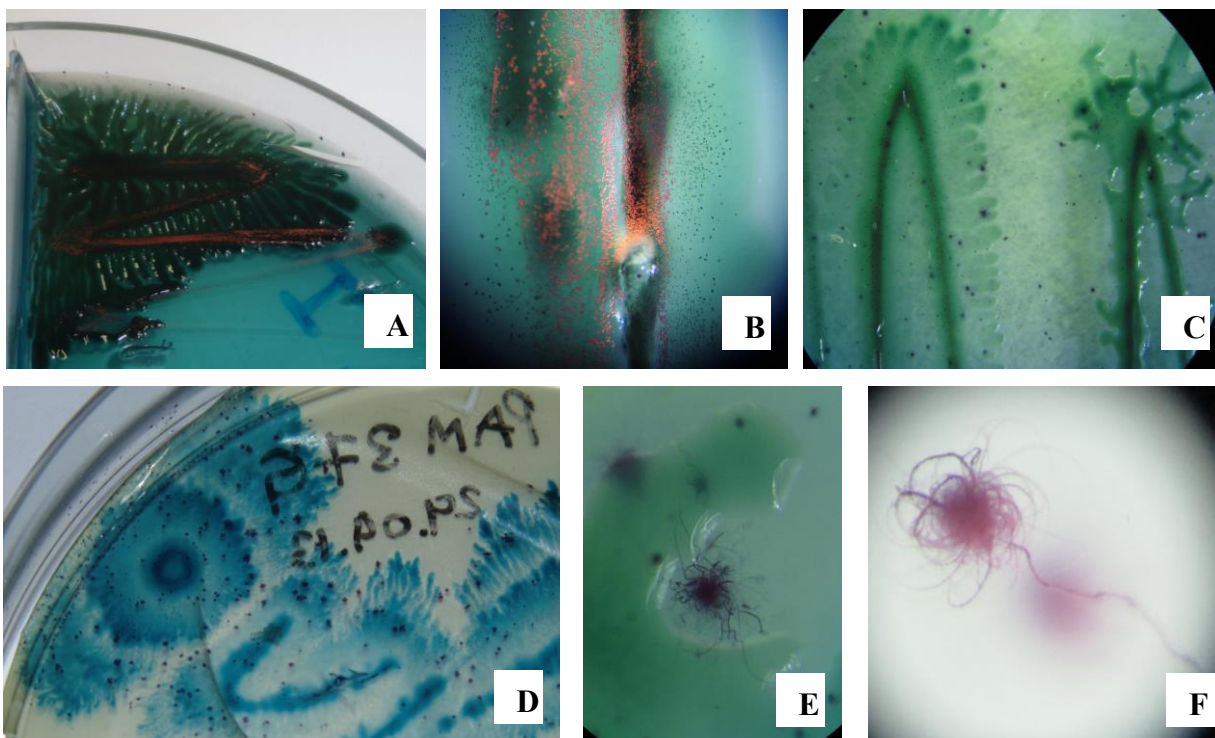


Figura 17. Colônias de *Xenorhabdus szentirmaii* em meio NBTA. Superfície da colônia de cor metálica (A) e detalhe da superfície metálica pela formação do cristal (B) do isolado PAM 25. Detalhe do crescimento irregular do isolado PAM 11(C). Cristais de poly-iodinin formados na superfície da colônia (D) e detalhe do cristal formado no meio de cultura (E-F) do isolado PAM 37.

Nos testes bioquímicos, todas as bactérias apresentaram o mesmo perfil metabólico: Reação positiva para a hidrólise de Esculina e Protease; utilização de Glucose, Manose, N-acetilglucosamina, D-Maltose, Inositol, Gluconato Potássico, Malato, Citrato Trissódico, e levemente da Arginina; e reação negativa para a produção de ácido a partir de Manitol, Inositol, Sorbitol, Rhamnose, Saccharose, Melibiose, Amygdalin e Arabinose.

Isolados Bioma Cerrado (CER)

CER 09, CER 21 e CER 129- As bactérias estão associadas simbioticamente com o nematoide *S. Puertoicense* isolados CER 09, CER 21 e CER 129, provenientes de solos de Rio Verde –GO, e foram identificadas como *X. romanii*, apresentando entre 96% e 97% de similaridade com isolados dessa espécie. Forma colônias pequenas, redondas e verdes. Fermenta levemente a Glucose, hidrolisa a Protease, assimila a D-Glucose, D-Maltose, Malato e o citrato Trissódico. Utiliza levemente o citrato e fermenta levemente Inositol.

CER 16- A bactéria está associada simbioticamente com o nematoide *S. Puertoicense* CER16 proveniente de solos de Rio Verde – GO, apresentou na análise molecular uma baixa homologia com as bactérias *X. romanii* (88%) e *X. nematophila* (87%), provavelmente devido a mistura de bactérias no meio de cultura, ou contaminação do DNA. Pelo qual foi possível a identificação de espécie como *Xenorhabdus romanii*, já que este nematoide somente encontra-se associado a esta espécie de bactéria (Tailliez *et al*, 2006). Forma colônias pequenas, redondas e azuis com borda clara. Hidrolisa Arginina, Urease e Protease. Assimila D-

Glucose, D-Manitol, N-Acetilglucosamina, D-Maltose, Gluconato de Potássio, Ácido caprico, Ácido Adípico, Malato e Citrato Trissódico. Esse isolado também utiliza ligeiramente Citrato e provoca uma leve fermentação do Inositol.

CER17- A bactéria esta associada simbioticamente com o nematoide *S. costaricense* CER17 proveniente de solos de coletados em Rio Verde – GO, e foi identificada na análise molecular como *Xenorhabdus* sp., apresentando 97% de homologia com a bactéria *Xenorhabdus* sp. CR9 (Costa Rica). segundo Lee e Stock (2010) esta bacteria somente apresentou somente 95% de similaridade com a bacteria *X. szentirmaii* com base no gene RNAr 16S, o qual nao foio qual não foi considerado não adequado . A bacteria tem colônias redondas e azuis com borda clara. Hidrolisa Esculina, Protease e β -Galactosidase. Assimila D-Glucose, D-Manitol, N-Acetilglucosamina, D-Maltose, Gluconato de Potássio, L-Arabinose, D-Manose, Malato, Ácido Fenilacetico e Citrato Trissódico, além de utilizar o Citrato.

CER33- A bactéria esta associada simbioticamente com o nematoide *Steinernema* sp. CER33, indicando ser *Xenorhabdus* sp. na análise molecular, apresentando 97% de homologia com a bactéria *Xenorhabdus* sp. BA2 (isolado da Costa Rica). Forma colonias pequenas, redondas e azuis com borda clara. Apresenta reação positiva para hidrolise de Esculina e Protease, e negativa para índole. Fermeta a glucose. Usa e acidifica a Manosa, N-acetilglucosamina, D-Maltose, Gluconato potássico, Malato e Citrato Trissódico.

CER105 e CER108, as bactérias estao associadas simbioticamente com o nematoide *Sterinernema* sp. CER105 e CER108, coletado em Rio Verde – GO, sendo identificadas como *Xenorhabdus* sp., em comparação entres as sequencias do GenBank aprensetou 96% e 97% de similaridade a com a bactéria *Xenorhabdus koppenhoeferi*, respetivamente, não entanto as diferenças etre as bases nitrogenadas, não premiteram uma identificação segura de que se trata de dita espécie, sendo necessárias novas amplificações com diferentes genes. As colônias são pequenas, redondas e cor azul com borda clara. Hidrolisa a Esculina e Protease. Usa e acidifica a Manosa, N-acetilglucosamina, D-Maltose, Gluconato potássico, Malato e Citrato Trissódico. Fementa a Saccarosa, Melibiose, Amygdalin, Arabinose, Manitol e Sorbitol.

CER107 e CER 120- As bactérias estao associadas simbioticamente com o nematoide *Sterinernema* sp. CER107 e CER120, coletado em Rio Verde – GO. Foram identificadas como *Xenorhabdus* sp., apresentando 97% de homologia com a bactéria *Xenorhabdus* sp. BA2 (isolado da Costa Rica). Forma colônias pequenas redondas e cor azul com borda clara. Hidrolisa a Esculina e Protease. Assimila L-Arabinose, D-Glucose, D-Manitol, D-Manose, D-Maltose, Malato, N-acetilglucosamina, Citrato Trissódico, Ácido Caprico, Ácido Adípico, Gluconato de Potássio e ligeiramente o Ácido fenilacetico. Fementa a Saccarosa, Melibiose, Amygdalin, Arabinose, Manitol e Sorbitol. O isolado CER 107 também hidrolisa a β -Galactosidase.

CER 140- A bactéria esta associada simbioticamente com o nematoide *S. puertoricense* CER140 proveniente de solos coletados em Rio Verde – GO, e indica ser *Xenorhabdus romanii* com 92% de identidade. Forma colônias pequenas, redondas e de cor azul com borda clara. Hidrolisa Arginina e Protease. Assimila D-Glucose, D-Manose, L-Arabinose, D-Manitol, N-Acetilglucosamina, Ácido fenilacetico, D-Maltose, Gluconato de Potássio, Ácido caprico, Ácido Adípico, Malato e Citrato Trissódico. Esse isolado também utiliza Citrato e fermenta Glucose, melibiose e Arabinose.

CER144 e CER 199- As bactérias estão associadas simbioticamente com o nematoide *Sterinernema* sp., os isolados CER144 e CER199 procedentes de amostras de solo de Rio Verde –GO. As bactérias foram identificadas como *Xenorhabdus* sp. pela análise molecular, apresentando 96% de homologia com a bactéria *Xenorhabdus* sp. BA2. Formam colônias pequenas, redondas e de cor verdes/Azul. Apresentam perfil metabólico similar, mas com algumas diferenças nas reações de bioquímicas, sendo que o isolado CER144 assimila D-Glucose, e levemente D- Manose e N-Acetilglucosamina. Usam o Citrato Trissódico, ornitina e β -Galactosidas. O isolado CER199, fermenta Glucose, assimila D-Glucose, D- Manose, N-Acetilglucosamina. Os dois isolados hidrolisam esculina e protease, e fermentam Manitol, Sorbitol, Sacarose, Melibiose, Amigdalina e Arabinose.

Isolados Bioma Amazonas (AM)

AM47 e AM163- As bactérias estão associadas simbioticamente com o nematoide *S. diaprepesi*, Isolados AM47 e AM163 provenientes de solos de Sinop – MT, sendo identificadas como *X. doucetiae*, para o qual apresentaram 95% e 97%, de homologia, respectivamente. Forma colônias pequenas, redondas e de cor azul com borda clara. Hidrolisa Protease, assimila D-Glucose, D- Manose, L-Arabinose, N-Acetilglucosamina, Ácido Capríco, Gluconato de Potássio e malato, usa o Ácido trissódico, e fermenta a Glucose e o Inositol ligeiramente.

AM71- A bactéria está associada simbioticamente com o nematoide *H. amazonensis* AM71 isolado de solos de Sinop - MT. Indicando ser *Photorhabdus luminescens*, com uma homologia de 96%. Forma colônias redondas, vermelhas, pegajosas e bioluminescentes. Hidrolisa a Protease. Assimila L-Arabinose, D-Glucose, D-Manitol, D-Manose, D-Maltose, Malato, N-acetilglucosamina, Ácido fenilacético Citrato Trissódico, Ácido Capríco, e ligeiramente o Ácido Adípico e Gluconato de Potássio. Fermenta levemente o Manitol e Inositol.

AM75- A bactéria está associada simbioticamente com o nematoide *Steinernema* sp. AM75 isolado de solos de Sinop - MT. Indicando ser *X. magdalenensis*, com uma homologia de 93%. Forma colônias redondas e azuis com borda clara. Apresenta reação positiva para hidrólise de Esculina e Protease. Usa e acidifica N-acetilglucosamina, D-Maltose, Malato e Citrato Trissódico.

As espécies de bactérias identificadas como *X. nematophila* IBCB n2, *P. luminescens* subsp *akurtsii* IBCB n5, *X. magdalenensis* IBCB n28, *X. szentirmaii* isolados PAM10, PAM 11, PAM13, PAM 25, PAM31, PAM 37, PAM 42 e PAM 44, *X. romanii* isolados CER09 e CER129 e *X. doucetiae* isolados IBSC15, AM47 e AM163 coincidiram com as espécies de bactérias que segundo Poinar e Thomas (1965), Fischer-Le Saux *et al.* (1999), Tailliez *et al.* (2006, 2012) e Lengyel *et al.*(2005) estão em associação com as respectivas espécies de nematoides utilizados, *S. carpocapse* (IBCB n2), *H. indica* (IBCB n5), *X. australe* (IBCB n28), *S. rarum* (PAM10, PAM 11, PAM13, PAM 25, PAM31, PAM 37, PAM 42 e PAM 44), *S. puertoricense* (CER09 e CER129) e *S. diaprepesi* (IBSC15, AM47 e AM163), o que aumenta a confiabilidade dos resultados obtidos na identificação dessas bactérias como dos nematoides.

Para os nematoides *S. braziliense* e *H. amazonense*, as bactérias simbiotes não tinham ainda sido descritas, sendo identificadas como pertencentes às espécies *X. doucetiae* e *P. luminescens*, respectivamente.

A espécie *X. doucetiae* foi descrita pela primeira vez na América central por Tailliez *et al.* (2006), tendo sido isolada do nematoide *S. diaprepesi*, originado da América central. O nematoide *S. braziliense* IBCB n6 foi descrito por Nguyen *et al.* (2010) e está estreitamente relacionado ao nematoide *S. diaprepesi*, pois formam um grupo monofilético, o qual explica a razão da bactéria *X. doucetiae* estar associada a ambas espécies de NEPs.

Já a espécie *Photorhabdus luminescens*, foi descrita em estudos prévios como dez diferentes subespécies associadas aos nematoides *H. luminescens*, *H. bacteriophora*, *H. indica*, *H. bacteriophora*, *H. bacteriophora*, *H. georgiana*, *H. bacferiophora*, *H. indica*, *H. bacteriophora* e *H. sonorensis*, portanto, as bactérias *Photorhabdus luminescens* (IBCB n10 e AM71) isoladas do nematoide *H. amazonense* são certamente subspécies ainda não descritas.

Os isolados *Xenorhabdus* sp., IBCB n34, IBCB n47, IBCB n49, CER17, CER33, CER105, CER107, CER108, CER120, CER144, CER199 e *Photorhabdus luminescens* IBCB n10 e AM71 merecem uma melhor investigação, principalmente pela amplificação dos genes Housekeeping (*gyrB*, *recA*, *dnaN* e *gltX*), para fazer um análise multilocus que permita confirmar se trata-se de novas espécies, ou subespécies.

Tabela 8. Caracterização fenotípica e bioquímica dos isolados (Continua)

Especie de NEPs hospedeira Isolado bacteriano	<i>S. carpocapse</i>	<i>H. indica</i>	<i>S. brazilense</i>	<i>H. amazonensis</i>	<i>S. australe</i>	<i>Steinernema</i> sp.	<i>S. feltiae</i>	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Steinernema</i> sp.	<i>S. diapresi</i>	<i>S. rarum</i>	<i>S. rarum</i>	<i>S. rarum</i>	<i>S. rarum</i>	<i>S. rarum</i>	<i>S. rarum</i>	<i>S. rarum</i>
	IBCB n2	IBCB n5	IBCB n6	IBCB n10	IBCB n28	IBC nB34	IBCB n47	IBCB n48	IBCB n49	IBSC 15	PAM 10	PAM 11	PAM 13	PAM 25	PAM 31	PAM 37	PAM 42
Pigmentação em NBTA*	A	VV	A	VV	A	VA	A	A	VA	A	VA	VA	VA	VA	VA	VA	VA
Bioluminescência	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Redução de Nitratos a Nitritos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de Indole (triptophane)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação (glucose)	+	W	W	W	W	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	-	W	-	-	-	+	+	-	-	W	W	W	W	W	W	W
Urease	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise (β-glucosidase) (esculina)	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólise (protease) (Protease)	W	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de :																	
D-glucose	W	+	W	+	W	W	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D-mannose	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannitol	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
N-acetyl-Glucosamine	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-D-Maltose	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Potassium gluconate	-	+	-	+	-	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido Capríco	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Adípico	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malato	-	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato Trissódico	-	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido Fenylacético	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cytochrome oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-galactosidase (ONPG)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine Decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine Decarboxylase	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilização de Citrato	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Produção de H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação de:																	
Mannitol	-	W	-	W	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	W	-	W	-	-	-	+	-	W	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tipo de reação: positiva (+), negativa (-) e levemente (w). * A: azul; V: verde; VA: verde e azul; VV: verde com centro vermelho.

Tabela 8. Continuação

Especie de NEPs hospedeira	<i>S. raram</i>	<i>S. puertoricense</i>	<i>Steinernema</i> sp.	<i>S. costaricensis</i>	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Steinernema</i> sp.	<i>S.</i> <i>puertoricense</i>	<i>S.</i> <i>puertoricense</i>	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Steinernema</i> sp.	<i>S.</i> <i>diaprepsi</i>	<i>H.</i> <i>amazonensis</i>	<i>Steinernema</i> sp.	<i>S.</i> <i>diaprepsi</i>
Isolado bacteriano	PAM 44	CER 09	CER 16	CER 17	CER 21	CER 33	CER 105	CER 107	CER 108	CER 120	CER 129	CER 140	CER144	CER 199	AM 47	AM 71	AM 75	AM 163
Pigmentação em NBTA*	VA	VA	VA	A	VA	A	A	A	A	A	VA	A	V	V	A	VV	A	A
Bioluminescência	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Redução de Nitratos a Nitritos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de Indole (tryptophane)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação (glucose)	-	W	-	+	W	-	-	-	-	-	W	+	-	+	-	-	W	-
Arginine dihydrolase	W	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Urease	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise (β-glucosidase) (esculina)	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
Hidrólise (protease) (Protease)	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-galactosidase	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de :																		
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+
L-arabinose	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
D-mannose	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	W	+	+	+	-	+
D-mannitol	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
N-acetyl-Glucosemine	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	W	+	+	+	+	+
D-D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	W	-	+	+	-
Potassium gluconate	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	W	+	W	-	+
Ácido Capríco	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Ácido Adípico	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	W	-	-
Malato	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	W	+	-	W	+	+	+	+
Citrato Trissódico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+
Ácido Fenylacético	-	-	-	+	-	-	-	W	-	W	-	+	-	-	-	+	-	-
Cytochrome oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-galactosidase (ONPG)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Lysine Decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine Decarboxylase	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Utilização de Citrato	+	W	W	+	W	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Produção de H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação de:																		
Mannitol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	W	-	-
Inositol	-	W	W	-	+	-	-	-	-	-	W	-	-	-	W	W	-	W
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-

Tipo de reação: positiva (+), negativa (-) e levemente (w). * A: azul; V: verde; VA: verde e azul; VV: verde com centro vermelho.

Tabela 9. Valores de homologia (%) entre as sequências de nucleotídeos dos isolados de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* estudados e as depositadas no GenBank.

Isolado	Especie NEP	Especie Bactéria	%	Acesso
IBCB n2	<i>S. carpocapse</i>	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	97%	FJ860887.1
IBCB n5	<i>H. indica</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp <i>akurtsii</i>	98%	AY278643.1
IBCB n6	<i>S. brasiliense</i>	<i>Xenorhabdus doucetiae</i>	97%	NR_043642.1
IBCB n10	<i>H. amazonensis</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>	97%	AY278641.1
IBCB n28	<i>S. australe</i>	<i>Xenorhabdus magdalenensis</i>	90%	NR_109326.1
IBCB n34	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus</i> sp.	96%	JQ975175.1
IBCB n47	<i>S. puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.	96%	NR_043647.1
IBCB n48	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	95%	NR_102822.1
IBCB n49	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus</i> sp.	86%	JQ975175.1
IBSC n15	<i>S. diaprepesi</i>	<i>Xenorhabdus doucetiae</i>	96%	NR_043642.1
PAM 10	<i>S. rarum</i>	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	96%	DQ211708.1
PAM 11	<i>S. rarum</i>	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	98%	DQ211708.1
PAM 13	<i>S. rarum</i>	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	99%	DQ211708.1
PAM 25	<i>S. rarum</i>	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	99%	DQ211708.1
PAM 31	<i>S. rarum</i>	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	97%	DQ211708.1
PAM 37	<i>S. rarum</i>	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	98%	DQ211712.1
PAM 42	<i>S. rarum</i>	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	96%	DQ211712.1
PAM 44	<i>S. rarum</i>	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	96%	DQ211708.1
CER 09	<i>S. Puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus romanii</i>	97%	NR_043647.1
CER 16	<i>S. Puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus romanii</i>	88%	NR_043647.1
CER 17	<i>S. Puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.	97%	GU480973.1
CER 21	<i>S. Puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus romanii</i>	96%	NR_043647.1
CER 33	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus</i> sp.	97%	JQ975175.1
CER 105	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus</i> sp.	96%	HQ142625.2
CER 107	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus</i> sp.	97%	JX623978.1
CER 108	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus</i> sp.	97%	HQ142625.2
CER 120	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus</i> sp.	96%	GU480982.1
CER 129	<i>S. puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus romanii</i>	97%	NR_043647.1
CER 140	<i>S. puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus romanii</i>	92%	NR_043647.1
CER144	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus</i> sp.	96%	JQ975175.1
CER 199	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus</i> sp.	96%	GU480973.1
AM 47	<i>S. diaprepesi</i>	<i>Xenorhabdus doucetiae</i>	95%	DQ211702.1
AM 71	<i>H. amazonensis</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>	96%	AY278641.1
AM 75	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus magdalenensis</i>	93%	NR_109326.1
AM 163	<i>S. diaprepesi</i>	<i>Xenorhabdus doucetiae</i>	97%	DQ211702.1

CONCLUSAO

Foram caracterizados 35 isolados bacterianos, os quais segundo as análises morfológicas, bioquímicas e moleculares foram indicados como, *X. nematophila* (IBCB n2 e IBCB n48), *X. doucetiae* (IBCB n6, IBSC15, AM47 e AM163), *X. magdalenensis* (IBCB n28 e AM75), *Xenorhabdus* sp. (IBCB n34, IBCB n47, IBCB n49, CER17, CER33, CER105, CER107, CER108, CER120, CER144 e CER199), *X. szentirmaii* (PAM10, PAM11, PAM13, PAM25, PAM31, PAM42, PAM44), *X. romanii* (CER09, CER16, CER21, CER129 e CER140), *P. luminescens* (IBCB n10 e AM71) e *P. luminescens* subsp *akurtsii* (IBCB n5).

As bactérias associadas aos NEPs *S. braziliense* isolado IBCB n6 e *H. amazonense* isolados IBCB n10 e AM71 foram identificadas pela primeira vez como pertencentes às espécies *X. doucetiae* e *P. luminescens*, respectivamente.



CAPITULO II
Virulência de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos (*Steinernema* e *Heterorhabditis*) e toxicidade de seus metabolitos secundários para lagartas de *Galleria mellonella*

RESUMO

Xenorhabdus e *Photorhabdus* são bactérias entomopatogênicas que estão associadas aos nematoides *Steinernema* e *Heterorhabditis*, respectivamente. A combinação nematoide mais bactéria resulta na infecção e morte do inseto, sendo ambos agentes importantes para a patogenicidade. A bactéria degrada o cadáver do inseto e disponibiliza alimento para o nematoide. O nematoide oferece à bactéria acesso aos nutrientes, proteção contra os fatores externos e mecanismo de dispersão. Nesse estudo, 17 isolados de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* (nativos do Brasil) foram testados sobre lagartas de último instar de *Galleria mellonella*, tendo sido realizados três ensaios para avaliar o efeito dos seguintes inóculos: células na concentração de 4×10^6 cels/ml⁻¹ + metabólitos secundários (MS); células sem os MS; e MS sem células. Para cada um dos inóculos testados, foram consideradas quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri preenchida com areia fina estéril, contendo 10 lagartas do inseto. Cada inóculo foi testado no inseto por contato, adicionando-se 14 mL do seu preparo por placa de Petri, até o completo umedecimento da areia. Todos os isolados foram patogênicos para *G. mellonella* em todos os testes com diferentes inóculos. Isso demonstra que as bactérias simbiotes dos NEPs e seus MS aplicados na areia causam mortalidade nas lagartas de *G. mellonella* sem ser necessária a presença e atuação do nematóide para incorporá-los dentro do corpo do inseto. Dentre todos os isolados promissores, apenas três, *P. luminescens* subsp *akurtsii* IBCB n5, *X. romanii* CER21 e *Xenorhabdus* sp. CER106, foram significativamente iguais dos melhores isolados nos três experimentos (com Célula+MS, MS e Células), o que os destacam como os melhores isolados para serem usados nessas formas visando o desenvolvimento de produtos para controle de pragas.

Palavras-chave: Bactérias simbiotes, patogenicidade, virulência.

ABSTRACT

Xenorhabdus and *Photorhabdus* are entomopathogenic bacteria that are associated to the nematodes *Steinernema* and *Heterorhabditis*, respectively. The combination nematode+bacteria results on infection and death of the insects, with both agents contributing to insect pathogenesis. The bacterium degrades the body of the insect and provides food for the nematode. The nematode offers to the bacteria access to nutrients, protection against external factors and dispersion mechanism. In this study, 17 strains of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* (indigenous from Brazil) were tested against last instar larva of *Galleria mellonella*, by conducting three experiments to evaluate three types of inoculum: cells at the concentration of 4×10^6 cells/ml⁻¹ + secondary metabolites (SM); cells without SM; and SM without cells. For each of the tested inoculum, four replicates were considered, with each replicate represented by a Petri dish filled with sterile fine sand, containing 10 larvae of the insect. Each inoculum was tested in insects by contact, by adding 14 mL of its preparation per Petri dish until complete wetting of the sand. All isolates were pathogenic to *G. mellonella* in all tests with different inocula. This demonstrates that the bacterial symbionts of NEPs and their MS in applied sand cause mortality in larvae of *G. mellonella* without the presence and activity of the nematode to incorporate them into the body of the insect. Among all promising isolates, only three, *P. luminescens* subsp. *akurtsii* IBCB n5, *X. Romanii* CER21 and *Xenorhabdus* sp. CER106, did not differ significantly from the best isolates in the three experiments (with Cell + SM, and SM cells), which stand out them as the best isolates for use in these ways for the development of products for pest control.

Key words: Symbiotic bacteria, pathogenicity, virulence.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, estudos vêm propiciando o descobrimento e desenvolvimento de novos agentes de controle biológico com potencial para uso no manejo integrado de pragas agrícolas. Alguns dos organismos usados para este fim são os nematoides entomopatogênicos (NEPs), pertencentes às famílias *Steinernematidae* e *Heterorhabditidae*, os quais atuam em simbiose com bactérias do gênero *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* respectivamente, que causam a mortalidade do inseto hospedeiro em 24 a 48 h após a infecção (Hu *et al.* 1999). A causa da morte é atribuída aos metabólitos secundários (MS) produzidos pelas bactérias.

O desenvolvimento de agentes como bioinseticidas inicia-se com o isolamento do organismo, sua identificação e caracterização, seguido da elaboração de bioensaios de seleção até a execução dos ensaios piloto sob condições reais de aplicação em campo (Montesinos, 2003).

Pesquisas recentes vem apresentando as bactérias simbiotes e suas secreções como agentes e produtos potenciais para uso no controle de insetos, porém estes estudos ainda são incipientes necessitando de confirmações. Além disso, Bowen *et al.* (1998) ressaltaram que é possível o uso de toxinas produzidas a partir de suspensões das bactéria simbiotes para proteger as plantas por aspersão direta (na cultura) ou por meio da transformação do genoma das plantas com os genes das toxinas.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a virulência de isolados de *Xenorhabdus* spp. e *Photorabhdus* spp., e a toxicidade de seus metabólitos secundários, para lagartas de *G. mellonella*.

2 MATERIAL E METODOS

2.1 Virulência de *Xenorhabdus* spp. *Photorhabdus* spp. e toxicidade dos seus metabólitos secundários para lagartas de *Galleria mellonella*.

2.1.1 Material biológico

Lagartas de *G.mellonella* (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae) fornecidas pelo Laboratório de Controle Biológico, do Instituto Biológico-SP, foram criadas em dieta artificial (cera de abelha, 475 g; leite em pó desnatado, 46 g; levedura de cerveja, 188 g; fubá de milho, 385 g; soja, 160 g; glicerina 416 ml; formoldeído 40%, 1,5 ml; água destilada, 300 ml), dentro de câmara climatizada, com temperatura de 27°C, no escuro.

2.1. 2 Ativação das bactérias e preparação dos tratamentos

As bactérias isoladas de NEPs (Tabela 10) e armazenadas em glicerol 15%, a -20°C, foram inoculadas em meio liquido LB (20 ml) e mantidas em agitação por 24 h a 28°C. Em seguida, 100 ul da suspensão foi plaqueada em meio NBTA para conferir a sobrevivência e a preservação da bactéria na fase I, baseada na sua forma e coloração. Foi feita uma repicagem de cada isolado para obter colônias uniformes e usá-las posteriormente nos testes de virulência contra lagartas de *G. mellonella*.

Tabela 10. Bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* avaliadas na patogenicidade de *G.mellonella*.

Isolado	Bactéria
IBCB n5	<i>P. luminescens</i> subsp <i>akurtsii</i>
IBCB n6	<i>X. doucetiae</i>
IBCB n10	<i>P. luminescens</i>
IBCB n40	<i>Photorhabdus</i> sp.
IBCB n47	<i>Xenorhabdus</i> sp.
IBCB n48	<i>X. nematophila</i>
PAM25	<i>X. szentirmaii</i>
PAM42	<i>X. szentirmaii</i>
CER16	<i>X. romanii</i>
CER21	<i>X. romanii</i>
CER33	<i>Xenorhabdus</i> sp.
CER106	<i>Xenorhabdus</i> sp.
CER120	<i>Xenorhabdus</i> sp.
CER144	<i>Xenorhabdus</i> sp.
CER199	<i>Xenorhabdus</i> sp.
AM71	<i>P. luminescens</i>
AM75	<i>X. doucetiae</i>

Nesse teste foram avaliadas as bactérias simbiotes juntamente com os metabólitos secundários (MS), as células separadas dos MS, e os MS sem células, quanto ao efeito toxicidade para lagartas de *G. mellonella*. Como controle foram utilizados o meio de cultura LB e água destilada.

Cada isolado (obtido de uma colônia) foi cultivado em 300 ml de meio de cultura LB mantido sob agitação (150 rpm) por 24 h a 27°C. A concentração da suspensão foi determinada por contagem de células em câmara de Neubauer. Com base nos resultados obtidos por Mahar *et al.* (2005), a concentração bacteriana usada neste trabalho foi de 4×10^6 cels/ml⁻¹, ajustada por meio de diluições seriadas com água destilada estéril.

Para obter a suspensão de células bacterianas livre de MS, o meio de cultura (caldo de cultura com concentração bacteriana de 4×10^6 cels/ml⁻¹) foi centrifugado a 4100 rpm por 20 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet presente no fundo do tubo foi ressuspendido em água destilada estéril, e aplicado posteriormente nas lagartas. Para obter os MS sem células, o meio de cultura (caldo de cultura com concentração bacteriana de 4×10^6 cels/ml⁻¹) foi filtrado utilizando filtros de celulose (poro 0,2 µm). O sobrenadante (MS) foi invertido em um recipiente estéril, e aplicado posteriormente nas lagartas.

Para cada inóculo foram consideradas quatro repetições no tempo, sendo cada repetição representada por uma placa de petri contendo 100g de areia estéril e dez lagartas de *G. mellonella* com aproximadamente 2 cm. A areia esteril em cada placa foi inoculada com 14 ml dos tratamentos, gerando uma umidade na areia de 14%. As placas foram seladas e acondicionadas no escuro a 25 °C. A mortalidade foi avaliada a cada 24 h ao longo de oito dias após da inoculação. Após esse período, as lagartas sobreviventes foram descartadas.

Para confirmar a infecção do inseto pela bactéria, um cadáver foi escolhido aleatoriamente, desinfestado superficialmente com álcool 90% e flambado no fogo, para depois uma gota de hemolinfa ser estriada e plaqueada no meio NBTA.

2.2 Análise estatística

O experimento foi inteiramente casualizado. Os resultados foram apresentados em termos de mortalidade (%) das lagartas de *G. mellonella*. Os dados foram transformados usando a fórmula $\text{Arco Seno } \sqrt{\text{Proporção}}$ e submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas e analisadas pelo teste de Scott-Knott, mediante o uso do programa estadístico ASSISTAT®.

3 RESULTADOS E DISCUSAO

De forma geral, todos os inóculos (Células + MS, MS e Células) causaram mortalidade das lagartas de *G. mellonella* ao longo do tempo (Figura 18), diferindo significativamente das respectivas testemunhas com meio de cultura e com água na avaliação aos oito dias da inoculação (Tabela 11). Para o teste com as células bacterianas + MS, 14 isolados proporcionaram altos níveis de mortalidade ($\geq 80\%$) dentre os 17 isolados testados (Tabela 10). Para o teste com os MS sem células (Figura 18), apenas quatro isolados causaram mortalidade $\geq 80\%$, enquanto que para o teste com as células sem os MS, apenas dois causaram altos níveis de mortalidade ($\geq 80\%$).

Isso demonstra que as bactérias simbiotes dos NEPs e seus MS aplicados na areia causam mortalidade nas lagartas de *G. mellonella* sem ser necessário a presença e atuação do nematoide para incorporá-los dentro do corpo do inseto, fato que já foi verificado por Elawad (1998), Akhurst & Smith (2002) e Mahar *et al.* (2008). Mahar *et al.* (2008) obtiveram mortalidade de *G. mellonella* causada por *X. nematophia* e seus MS, ao longo de cinco meses após a inoculação no solo, discordando de Morgan *et al.* (1997) que relataram efeito limitado da bactéria no inseto quanto aplicada em suspensão aquosa ou pela exposição do inseto em solo tratado com o micro-organismo.

Para os inóculos de células + MS e células (sem MS), foi feita a confirmação de cada bactéria antes da sua inoculação na areia, pelo seu crescimento prévio no meio NBTA, e depois da morte do inseto, mediante o plaqueamento da hemolinfa do cadáver no mesmo meio, sendo confirmada a efetividade do processo. Nos testes com as células bacterianas + MS, e com as células sem os MS, verificou-se um crescimento normal da bactéria na fase I no meio NBTA, antes da inoculação, e o crescimento de bactérias na fase I e II dentro do cadáver do inseto, após a inoculação. A confirmação das bactérias dentro dos cadáveres indicou que as células aplicadas no solo são capazes de se mover externamente sobre o inseto, e penetrar no seu corpo na ausência do vetor (NEPs), entrando no hemocele pelas diferentes aberturas do corpo (espiráculos, boca e ânus). Contribuem para isso, provavelmente os numerosos flagelos peritricos que permitem sua mobilidade em substratos úmidos, como sugerido por Mahar *et al.* (2005), Mohan *et al.* (2003), Forst & Clarke (2002) e Givaudan *et al.* (1995).

Para a maioria dos isolados, os MS sem células causaram maiores mortalidades das lagartas comparados às células sem os MS, sugerindo ocorrer um efeito mais tóxico causado pelos MS, do que patogênico causado pelas células. No teste com MS sem células, não foi detectado a presença de bactérias no meio NBTA após o plaqueamento do conteúdo interno do cadáver. Isso confirma que somente os MS inoculados na areia e que foram os responsáveis pela morte dos insetos. A forma de ação dos compostos deve ser melhor estudada mas é possível que tenham atuado por via oral caso as lagartas tenham ingerido os grãos de areia com os metabólitos secundários.

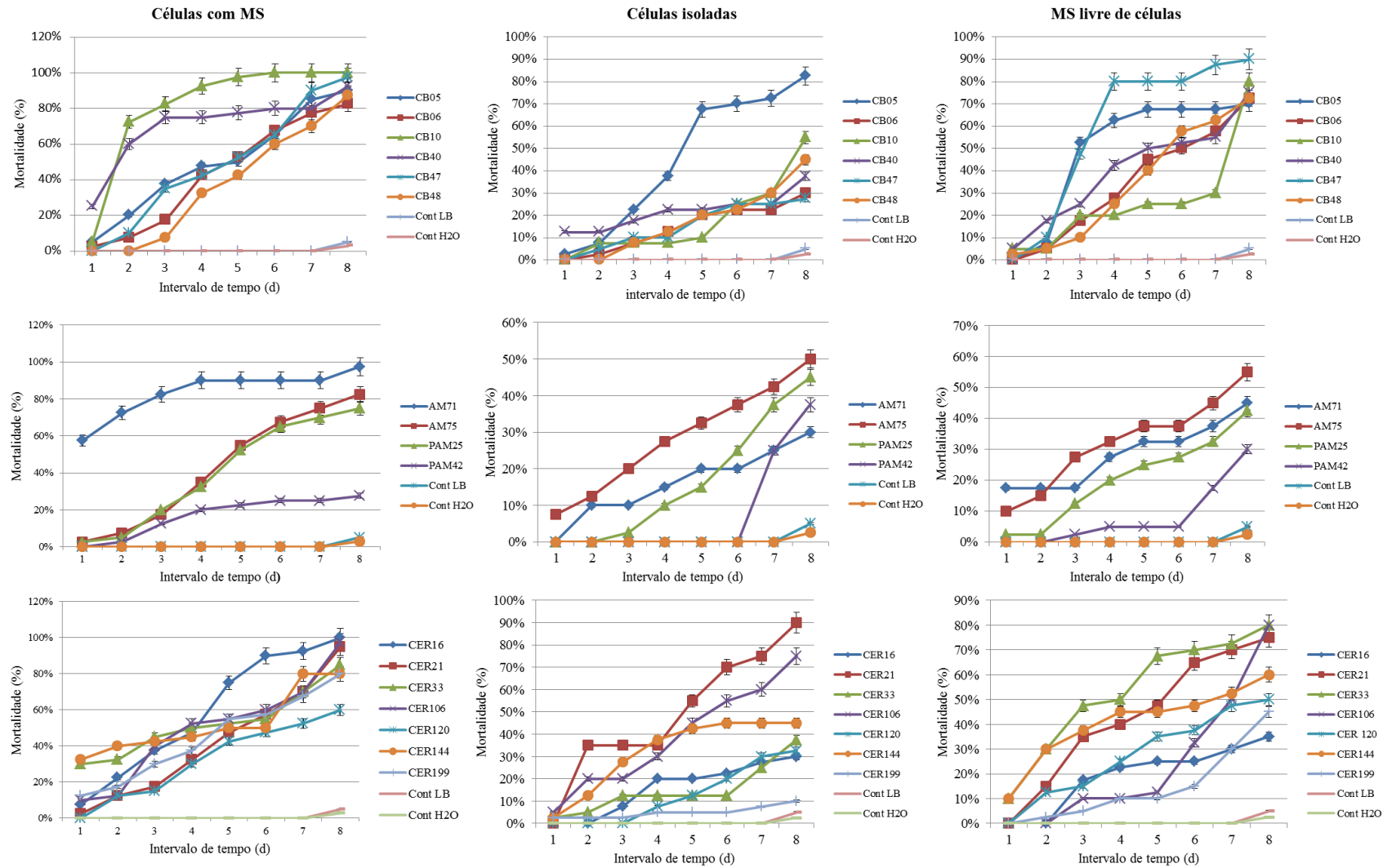


Figura 18. Porcentagem de mortalidade das lagartas de *G. mellonella* através do tempo causada pelos isolados e controles em meio LB e água destilada esteril.

Tabela 11. Mortalidade (\pm Erro padrão) de *G. mellonella* expostas a Células + metabólitos secundários (MS), MS sem Células, e Células sem MS, de isolados de *Xenorhabdus*/*Photorhabdus*, após oito dias da inoculação.

Isolado	Bactéria	Mortalidade (%)					
		C+MS	MS	C			
Controle LB	-	3 \pm 2,50	c	3 \pm 2,50	c	3 \pm 2,50	c
Contrle H₂O	-	5 \pm 2,88	c	5 \pm 2,88	c	5 \pm 2,88	c
PAM42	<i>X. szentirmaii</i>	28 \pm 7,5	b	30 \pm 5,77	b	38 \pm 14,36	b
CER120	<i>Xenorhabdus</i> sp.	60 \pm 14,14	a	50 \pm 16,83	b	33 \pm 17,96	b
PAM25	<i>X. szentirmaii</i>	75 \pm 2,88	a	43 \pm 17,01	b	45 \pm 17,07	b
CER199	<i>Xenorhabdus</i> sp.	80 \pm 14,14	a	45 \pm 21,01	b	10 \pm 7,07	b
CER144	<i>Xenorhabdus</i> sp.	80 \pm 11,54	a	60 \pm 17,32	a	45 \pm 5	b
AM75	<i>X. doucetiae</i>	83 \pm 10,30	a	55 \pm 22,17	b	50 \pm 8,16	b
IBCB n6	<i>X. doucetiae</i>	83 \pm 14,36	a	73 \pm 17,01	a	30 \pm 8,16	b
CER33	<i>Xenorhabdus</i> sp.	85 \pm 8,66	a	80 \pm 10,80	a	38 \pm 9,46	b
IBCB n48	<i>X. nematophila</i>	88 \pm 9,46	a	73 \pm 12,5	a	45 \pm 15,54	b
IBCB n5	<i>P. luminescens</i> subsp <i>akurtsii</i>	90 \pm 4,08	a	70 \pm 19,14	a	83 \pm 11,81	a
IBCB n40	<i>Photorhabdus</i> sp.	93 \pm 7,5	a	75 \pm 16,58	a	38 \pm 18,87	b
CER21	<i>X. romanii</i>	95 \pm 2,88	a	75 \pm 14,43	a	90 \pm 5,77	a
AM71	<i>P. luminescens</i>	98 \pm 2,5	a	45 \pm 13,22	b	30 \pm 5,77	b
CER106	<i>Xenorhabdus</i> sp.	98 \pm 2,5	a	80 \pm 11,54	a	75 \pm 14,43	a
IBCB n47	<i>Xenorhabdus</i> sp.	98 \pm 2,5	a	90 \pm 10	a	28 \pm 15,47	b
CER16	<i>X. romanii</i>	100 \pm 0,0	a	35 \pm 15,54	b	30 \pm 17,79	b
IBCB n10	<i>P. luminescens</i>	100 \pm 0,0	a	80 \pm 5,77	a	55 \pm 12,58	b

OBS: Médias com letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Scott-Knot ($P \leq 0,05$).

Diversos isolados apresentaram-se promissores quando testados na forma de Célula+MS (16 isolados), MS (10 isolados) e Células (3 isolados), já que não diferiram significativamente dos melhores isolados dependendo do teste. Por exemplo, os isolados de *P. luminescens*, IBCB n10 e AM71, de *X. romanii* CER16, de *Xenorhabdus* sp., IBCB n47, CER33, CER144 e CER199, de *Photorhabdus* sp. IBCB n40, de *X. nematophila* IBCB n48, de *X. doucetiae*, IBCB n6 e AM75, e de *X. szentirmaii* PAM25, apresentaram altas taxas de mortalidade quando inoculados como mistura de células + MS, não diferindo significativamente dos melhores nesse teste, porém, diferindo dos melhores nos testes com células (sem MS) e MS (sem células).

Dentre todos os isolados promissores, apenas três, *P. luminescens* subsp *akurtsii* IBCB n5, *X. romanii* CER21 e *Xenorhabdus* sp. CER106, não diferiram significativamente dos melhores isolados nos três experimentos com Célula+MS, MS e Células, o que os destacam como os melhores isolados para serem usados nessas formas visando o desenvolvimento de produtos para controle de pragas.

Considerando-se que as misturas célula+MS geraram as maiores taxas de mortalidade para a maioria (16) dos 17 isolados, conclui-se que esse inóculo seria mais adequado para desenvolvimento de bioinseticidas comparado ao MS (sem células) e célula (sem MS), com a vantagem de dispensar procedimentos necessários para a separação.

As maiores mortalidades obtidas com as misturas células + MS deve-se a somatória dos efeitos causados pelos MS (antibióticos, toxinas e proteínas extracelulares) e células bacterianas. Para as células testadas isoladamente, os MS passaram a ser produzidos somente após a penetração da bactéria no inseto, enquanto que para os inoculos com MS sem as células, estes foram disponibilizados de imediato para as lagartas. Estes resultados estão de acordo aqueles obtidos por Mahar *et al.*(2005), no qual as secreções de *X. nematophila* causaram 95% de mortalidade em lagartas de *G. mellonella* quatro dias após a aplicação, enquanto a suspensão de bactérias livres de MS matou 93% das lagartas aos seis dias. Outros autores também verificaram efeitos expressivos das toxinas bacterianas obtidas de bactérias *P. luminescens* (simbionte de *Heterorhabditis bacteriophora*) e *X. nematophila* (simbionte de *Steinernema carpocapsae*) na mortalidade de lagartas de *Manduca sexta*, deduzindo que as toxinas produzidas causaram o rompimento no epitélio do mesêntero (intestino médio) das lagartas inoculadas (Bowen & Ensign, 1998; French-Constant & Bowen, 1999). Em 2002, Ensign *et al.* aplicaram uma patente para o isolamento de toxinas das bactérias *X. nematophila*, *X. poinarii*, *X. bovienii* e *X. beddingii* e para seu uso como inseticida no controle de várias pragas da ordem Coleoptera, Lepidoptera, Diptera e Acarina. Estudos adicionais indicam que a ingestão oral dos MS produzidos por *P. temperata* e *P. luminescens* são altamente letais para adultos de mosca-branca (*B. tabaci*) quando colocados na dieta (Dunphy & Webster, 1991; Blackburn *et al.*, 2005; Shrestha & Lee, 2012).

Resultados similares foram obtidos por Mahar *et al.* (2008) quando testaram a células de *X. nematophila* juntamente com seus MS livres de células em lagartas de *Spodoptera exigua*, *Plutella xylostella*, *Otiorynchus sulcatus* e em ninfas de *Schistocerca gregaria* por meio de aspersão na superfície das folhas e inoculação no solo. Obtiveram altas taxas de mortalidade dos insetos inoculados com as células mais MS (100%), e com os MS sem células (90%), além de verificar um efeito duradouro das células e MS isoladamente, no solo, causando a mortalidade de *G. mellonella* por mais de cinco meses.

Para os inóculos células + MS e MS sem células as lagartas mortas inoculadas com os isolados *Photorhabdus luminescens* subsp *akurtsii* CB05, *Photorhabdus luminescens* subsp *luminescens* CB10, *Photorhabdus* sp. CB40 e *Photorhabdus luminescens* AM71, apresentavam aspecto característico de coloração vermelha 24 h após a morte (Figura 19a-b), ocorrendo um escurecimento ao longo do tempo devido ao acúmulo das exo-enzimas produzidas por *Photorhabdus*.

Para os testes com as células sem MS, as lagartas também adquiriram a cor vermelha, porém, a mudança de cor ocorreu mais lentamente (48h) comparada às lagartas inoculadas com as células + MS e com os MS sem células (24h). Isso destaca o MS como o responsável pela coloração vermelha no cadáver, acelerando a mudança de cor quando aplicados em mistura com células bacterianas ou isoladamente. Para as células testadas isoladamente, a mudança de cor ocorreu somente após a penetração das células no inseto e liberação dos MS.

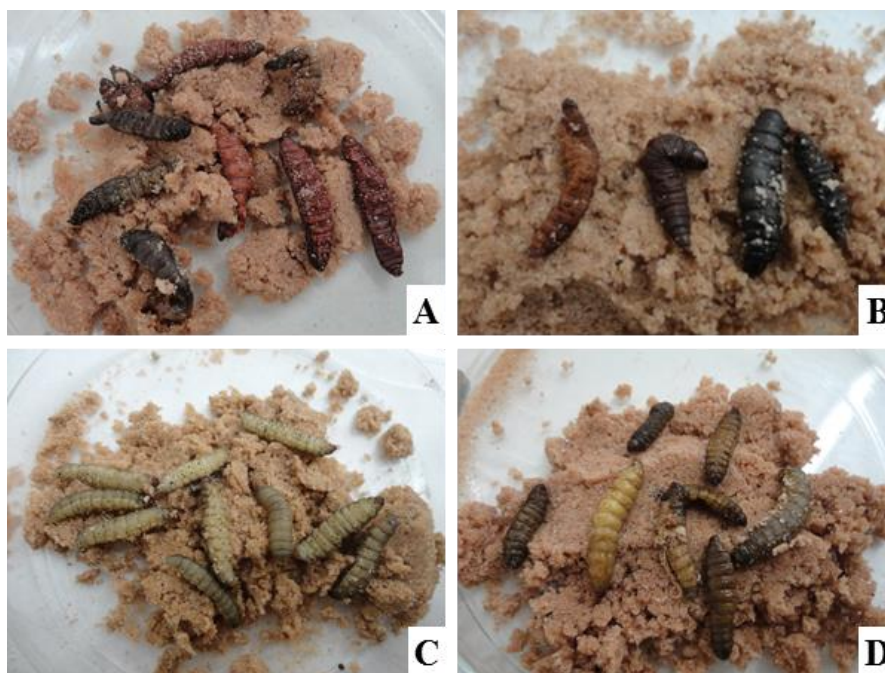


Figura 19. Aspecto de lagartas de *G. mellonella* mortas pelos MS das bactérias *Photorhabdus* sp. CB10 (A), *P. luminescens* subsp *akurtsii* IBCB n5 (B), *Xenorhabdus* sp. IBCB n47 (C), *Xenorhabdus* sp. CER16 (D).

Para os isolados PAM 25 e PAM 42 da bactéria *X. szentirmaii*, as diferenças nos níveis de mortalidade de *G. mellonella* inoculadas com células+MS, com células sem MS e com MS sem células, deve-se provavelmente a instabilidade dos isolados para se manter na fase I durante o cultivo em meio líquido. Segundo Orozco (2012), mesmo em condições semelhantes de cultivo, se desconhecem as proporções da bactéria nas fases I e II.

Estes resultados destacam os MS como produto promissor para a proteção de plantas contra o ataque de insetos praga de solo, podendo ser avaliado com a sua aplicação direta no solo. Segundo Bowen & Ensing (1998), o uso dos MS seria mais vantajoso que o uso dos NEPs, devido às dificuldades inerentes dos nematoides para reprodução em massa, transporte e preservação visando o uso em grandes culturas. Eles também sugeriram trabalhos para introdução dos genes das toxinas no genoma das plantas. Estudos de transformação do genoma das plantas estão em andamento, mas até o momento a metodologia não é comercialmente viável.

A ação dos MS com altos níveis de mortalidade das lagartas demonstra que esses metabólitos podem ser usados para matar insetos no solo, porém mais estudos devem ser realizados procurando conhecer a estabilidade dos metabólitos e sua persistência no ambiente.

CONCLUSAO

Os 17 isolados de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* avaliados neste estudo foram virulentos para lagartas de *G. mellonella*. Os caldos contendo células + MS causam maiores mortalidades que as células (sem os MS) e os MS (sem as células).

Os MS testados juntamente com as células e sem células causaram maiores mortalidades nas lagartas de *G. mellonella* comparados com a inoculação das células isoladamente. Destacando as bactérias simbiotes, *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, como agentes potenciais e como fontes de produtos potenciais para uso no manejo integrado de pragas.

Os isolados *P. luminescens* subsp *akurtsii* IBCB n5, *X. romanii* CER21 e *Xenorhabdus* sp. CER106 foram os melhores nos três experimentos (Célula+MS, MS e Células), destacando-se como os melhores isolados para serem usados no desenvolvimento de produtos para controle de pragas.

GLOSSÁRIO

Bioma: conjunto de vida (vegetal e animal) constituído pelo agrupamento de tipos de vegetação contíguos e identificáveis em escala regional, com condições geoclimáticas similares e história compartilhada de mudanças, o que resulta em uma diversidade biológica.

própria Cromatografia: método físico-químico de separação. Esta fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, ente duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionaria.

Gene: segmento de DNA que leva à produção de uma cadeia polipeptídica e inclui regiões que antecedem e que seguem a região codificadora, bem como sequências que não são traduzidas (íntrons) que se intercalam aos segmentos codificadores individuais (éxons)

Hemolinfa: líquido circulatório dos artrópodes e moluscos que tem as mesmas funções que o sangue dos vertebrados, mas com uma composição química diferente. Pode ser de diferentes cores ou incluso incolor e contem células sanguíneas de diferentes tipos.

Granulócitos: também chamados hemócitos granulares tipo I, são células do sistema imunológico, cuja função é a detecção, ingestão e destruição de partículas invasoras sejam partículas inertes ou microorganismos. São células equivalentes aos macrófagos dos mamíferos.

Nematoide: são organismos pequenos que vivem em diversos ecossistemas, ocorrendo em quase todas as regiões do mundo. Podem ser vida livre, não causando danos a outras espécies; podem alimentar-se de restos de outros animais ou plantas, sendo chamados de saprófitos; e podem ser parasitas de animais ou plantas.

Metabolitos secundários: compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos. Ao contrário dos metabolitos primários, a ausência dos metabolitos secundários não resulta na morte imediata.

Patogenicidade: qualidade que tem o agente infeccioso de, uma vez instalado no organismo (homem, planta ou animais), produzir sintomas nos hospedeiros infectados.

Primers: também chamados iniciadores, são segmentos de ácidos nucléicos, com 1 a 60 nucleotídeos, necessários para o início da replicação do DNA.

PCR: método de amplificação (múltiplas cópias) de DNA ou RNA sem o uso de um organismo vivo, O processo consiste basicamente separar as fitas sense e anti-sense são muito complexas na célula, no lugar utiliza-se a mudança de temperatura. Os ciclos são pensados para disponibilizar o sitio alvo para a ligação dos primers, funcionamento da polimerase e iniciou de um novo ciclo.

Simbiose: é uma relação mutuamente vantajosa, na qual, dois ou mais organismos diferentes são beneficiados por esta associação. Os organismos participantes são chamados de simbioses.

Toxinas bacterianas: substâncias capazes de causar danos ao organismo animal. Podem ser classificadas como endotoxinas e exotoxinas. As toxinas são definidas como substâncias solúveis, usualmente de natureza protéica, que alteram o metabolismo normal da célula ou tecido hospedeiro com efeitos deletérios nos mesmos.

Toxicidade: qualidade que caracteriza o grau de virulência de qualquer substância nociva para um organismo vivo ou para uma parte específica desse organismo, como um veneno ou uma toxina produzida por um agente microbiano.

Vetor: organismo capaz de transmitir um agente infeccioso a outros indivíduos que não o portam.

Virulência: capacidade de um bioagente produzir sintomas graves ou fatais num organismo. A virulência está associada às propriedades bioquímicas do agente relacionada à produção de toxinas, e a sua capacidade de multiplicação no organismo parasitado, o que o torna metabolicamente exigente, com prejuízo do parasitado.

REFERENCIAS

- ADAMS B.J & NGUYEN K.B 2002. Taxonomy and sistematics. Gaugler R, editor. **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI. 1-34 p.
- ADAMS BJ, FODOR A, KLEIN MG, SMITH HL, STACKEBRANDT E & STOCK SP 2006. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. **Biol Control** 37: 32-49.
- AGUILLERA, M.M., SMART JR., G.C., 1993. Development, reproduction, and pathogenicity of *Steinernema scapterisci* in monoxenic culture with diferent species of bacteria. **Journal Invertebr. Pathol.** 62, 289–294.
- AKHURST, R. J., MOURANT, R. G., BAUD, L. & BOEMARE, N. E. 1996. Phenotypic and DNA relatedness between nematode symbionts and clinical strains of the genus *Photorhabdus* (Enterobacteriaceae). **International Journal Syst Bacterio** 146, 1034–1041.
- ARKHURST, R. J. 1982. Antibiotic Activity of *Xenorhabdus* spp., Bacteria Symbiotically Associated with Insect Pathogenic Nematodes of the Families Heterorhabditidae and Steinernematidae. **Journal of General Microbiology** , 128, 306 I -3065.
- AKHURST, R.J. & K. SMITH, 2002. Regulations and safety. *In*: Gaugler, R. (ed.), Entomopathogenic Nematology, pp: 311–32. **CABI Publishing**, CAB International, Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK
- AKHURST, R. J. & BOEMARE, N. E. 1988. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. **Journal Gen Microbiol** 134, 1835–1845.
- AKHURST, R. J., BOEMARE, N. E., JANSSEN, P. H., PEEL, M. M., ALFREDSON, D. A. & BEARD, C. E. 2004. Taxonomy of Australian clinical isolates of the genus *Photorhabdus* and proposal of subspecies *Photorhabdus symbiotica* subsp. *asymbiotica* subsp. nov. and *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *australis* subsp. nov. **International Journal Syst Evol Microbiol** 54, 1301–1310.
- A. S. ABDEL-RAZEK. 2003. Pathogenic effects of *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) against pupae of the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.). *Anz. Schädlingskunde* / **Journal Pest Science** 76, 108–111
- BABIC, I., FISCHER-SAUX, M., GIRAUD, E., BOEMARE, N., 2000. Occurrence of natural dixenic associations between the symbiont *Photorhabdus luminescens* and bacteria related to *Ochrobactrum* spp. in tropical entomopathogenic *Heterorhabditis* spp. (Nematoda, Rhabditida). **Microbiology** 146, 709–718.
- BIRD, A.F. & AKHURST, R.J. 1983. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. **International Journal Parasitol.** 13(6), 599-606

BIRGIT OHLENDORF; SVEN SIMON; JUTTA WIESE ; JOHANNES F. IMHOFF. 2011. Szentiamide, an *N*-formylated Cyclic Depsipeptide from *Xenorhabdus szentirmaii* DSM 16338T. **Natural Product Communications**. Vol. 6 No. 9 1247 - 1250

BLACKBURN MB, DOMEK JM, GELMAN DB, HU JS. 2005. The broadly insecticidal *Photorhabdus luminescens* toxin complex a (Tca): Activity against the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and sweet potato fly *Bemisia tabaci*, *Journal of Insect Science*, 1-11.

BLAXTER ML, DE LEY P, GAREY JR, LIU LX, SCHELDEMAN P, VIERSTRAETE A, VANFLETEREN JR, MACKKEY LY, DORRIS M, FRISSE LM, VIDA JT & THOMAS WK 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature** 392: 71-75.

BODE, HELGE B. 2009. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Current Opinion in Chemical Biology**, 13:224–230. Available online at www.sciencedirect.com

BODE HB, et al .2012. Determination of the Absolute ConFfiguration of Peptide Natural Products by using Stable Isotope Labeling and Mass Spectrometry. *Chem. Eur. J. Chemistry* 18.8: 2342-8.

BOEMARE, N., BONIFASSI, E., LAUMOND, C., LUCIANI, J., 1983. Experimental study of the pathogenicity of *Neoaeplectana carpocapsae*: Gnotobiotic studies in *Galleria mellonella*. **Agronomie** 3, 407–415.

BOEMARE, N.E., BOYER-GIGLIO, M.H., THALER, J.E., AKHURST, R.J., BREHELIN, M., 1992. Lysogeny and bacteriocinogeny in *Xenorhabdus nematophilus* and other *Xenorhabdus* spp. **Appl. Environ. Microbiol.** 58, 3032-3037

BOEMARE N. E., AKHURST R. J. & MOURANT R. G. 1993. DNA Relatedness between *Xenorhabdus* spp. (*Enterobacteriaceae*), Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes, and a Proposal To Transfer *Xenorhabdus luminescens* to a New Genus, *Photorhabdus* gen. nov. **International journal of systematic bacteriology**. p, 249-255.

BOEMARE, N. E. & AKHURST, R. J. 1988. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (*Enterobacteriaceae*). **Journal Gen Microbiol** 134, 751–761.

BOWEN, D.; ROCHELEAU, T.A.; BLACKBURN, M.; ANDREEV, O.; GOLUBEVA, E.; BHARTIA, R. & FFRENCH-CONSTANT, R.H. 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Science** 280: 2129-2132.

BOWEN DAVID J. & ENSIGN JERALD C. 1998. Purification and Characterization of a High-Molecular-Weight Insecticidal Protein Complex Produced by the Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Applied and environmental microbiology**. Aug. p. 3029–3035

BRACHMANN AO, FORST S, FURGANI GM, FODOR A & BODE HB. 2006. Xenofuranones A and B: phenylpyruvate dimers from *Xenorhabdus szentirmaii*. **Journal Natural Products**. Dec; 69(12):1830-2.

CAMPOS-HERRERA, R.; TAILLIEZ, P.; PAGES, S.; GINIBRE, N. & GUTIERREZ, C.; BOEMARE, N.E. 2009. Characterization of *Xenorhabdus* isolates from La Rioja (Northern Spain) and virulence with and without their symbiotic entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of invertebrate pathology**, 102 (2), 173-181 p.

CHASTON JM, SUEN G, TUCKER SL, ANDERSEN AW, BHASIN A, *et al.* 2011. The Entomopathogenic Bacterial Endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Convergent Lifestyles from Divergent Genomes. **PLoS ONE** 6(11): e27909. doi:10.1371/journal.pone.0027909

CLARKE, D. J.; 2008. *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. **Cell Microbiology**. Nov;10(11):2159-67.

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

C. N.B. CARNEIRO, R. A. DAMATTA, R. I. SAMUELS & C. P. SILVA. 2008. Effects of Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus temperata* Infection on the Digestive Enzymes of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) Larvae. **Protein Pept Letters**.15(7):658-62.

DE PAULA, A. R.; VIEIRA, L.P.; DÁTILLO, W.F.C.; CARNEIRO, C. N. B.; ERTHAL JR., M.; BRITO, E.S.; SILVA, C.P. & SAMUELS, R.I. 2006. Patogenicidade e efeito comportamental de *Photorhabdus temperata* K122 nas formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). **O Biológico** Vol 68: 118-122.

DONGJIN JI , YOUNGKEUN YI, GA-HWA KANG, YONG-HWA CHOI, PANKYUNG KIM, NAM-IN BAEK & YONGGYUN KIM. 2004. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Letters** 239 241–248

DUNPHY, G.B., WEBSTER, J.M., 1991. Antihemocytic surface components of *Xenorhabdus nematophilus* var. *Dutki* and their modification by serum of nonimmune larvae of *Galleria mellonella*. **Journal of Invertebrate Pathology** 58, 40– 51.

DUDNEY R.A. 1997. Use of *Xenorhabdus nematophilus* Im/1 and 1906/1 for Fire Ant Control. **US Patent**. 5, 616, 318.

ENSIGN, J.C., BOWEN, D.J., TENOR, J.L., CICHE, T.A., PETELL, J.K., STRICKLAND, J.A., ORR, G.L., FATIG, R.O., BINTRIM, S.B., FFRENCH-CONSTANT, R.H., 2002. Proteins from the Genus *Xenorhabdus* are Toxic to Insects on Oral Exposure. **US Patent**, No. 0147148 A1

ELAWAD S.A.; GOWEN S.R. & HAGUE N.G.M. 1999. Efficacy of bacterial symbionts from entomopathogenic nematodes against the beet army worm (*Spodoptera exigua*). Test of Agrochemicals and Cultivars No. 20, **Annals of Applied Biology**. 134(Supplement): 66–67.

FERREIRA TIARIN, VAN REENEN CAROL, ENDO, PAGÈS SYLVIE, TAILLIEZ PATRICK, MALAN ANTOINETTE P. & DICKS LEON M. T. 2012. *Photorhabdus luminescens* subsp.*noenieputensis* subsp. nov., a symbiotic bacterium associated with a novel

Heterorhabditis species related to *Heterorhabditis indica*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. vol. 63 no. Pt 5 1853-1858

FERREIRA TIARIN, VAN REENEN CAROL , ENDO AKIHITO, SPRÖER CATHRIN, MALAN ANTOINETTE P. & DICKS LEON M. T. 2013. Description of *Xenorhabdus khoisanae* sp. nov., the symbiont of the entomopathogenic nematode *Steinernema khoisanae*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. vol. 63 no. Pt 9 3220-3224

FISCHER-LE SAUX MARION, MAULÉON HERVÉ, CONSTANT PHILIPPE, BRUNEL BRIGITTE & BOEMARE NOËL. 1998. PCR-Ribotyping of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* Isolates from the Caribbean Region in Relation to the Taxonomy and Geographic Distribution of Their Nematode Hosts. **Applied and environmental microbiology**. p, 4246–4254.

FISCHER-LE SAUX, M., VIALARD, V., BRUNEL, B., NORMAND, P. & BOEMARE, N. E. 1999. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. **International Journal Syst Bacteriol** 49: 1645–1656.

FFRENCH-CONSTANT, R., & WATERFIELD, N. 2006. **Adv. Appl. Microbiol.** 58, 169–183

FFRENCH-CONSTANT, RICHARD & BOWEN, DAVID. 1999. Photorhabdus toxins: novel biological insecticides. **Current Opinion in Microbiology**, 2:284-288

FFRENCH-CONSTANT, R H.; DOWLING, A., & WATERFIELD, N. R. 2007. Insecticidal toxins from Photorhabdus bacteria and their potential use in agriculture. **Toxicon** 49, 436–451

FODOR ANDRÁS, VARGA ILDIKÓ, HEVESI MÁRIA, MÁTHÉ-FODOR ANDREA, RACSKO JOZSEF & HOGAN JOSEPH A. 2012. Novel Anti-Microbial Peptides of *Xenorhabdus* Origin Against Multidrug Resistant Plant Pathogens . **In tech** 9: 147-196

FODOR A, FORST S, HAYNES L, HEVESI M, HOGAN J, KLEIN MG, MATHE-FODOR A, STACKEBRNDT E, SZENTIRMAI A, SZTARICKAI F. *et al.* 2008. New perspectives of *Xenorhabdus* antibiotics research. In **IOBC/WPRS Bulletin: Insect Pathogens Insect Parasitic Nematodes**. Edited by Ehlers RU, Enkerli J, Glazer I, Lopez-Ferber M, Tkaczuk C. IOBC/WPRS:157-164

FORST, S., & D. CLARKE. 2002. Bacteria-nematode symbiosis, p. 57–77. In R. Gaugler (ed.), Entomopathogenic nematology. **CABI Publishing**, Wallingford, United Kingdom.

FORST STEVEN & NEALSON KENNETH. 1996. Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. **American Society for Microbiology**. Vol. 60, No. 1, p. 21–43

GIVAUDAN, A.S., S. BAGHDIGUIAN, A. LANOIS & N. BOEMARE, 1995. Swarming and swimming changes concomitant with phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61: 1408–13

GAUGLER R, GEORGIS R. 1991. Culture method and efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). **Biological Control**.1:269–274.

GOUGE DAWN H., SNYDER JENNIFER L. 2006. Temporal association of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) and bacteria. **Journal of Invertebrate Pathology** 91 (2006) 147–157.

GOTZ,P., BOMAN, A. BOMAN, H.G., 1981. Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. **Proceedings of royal Society London**, 212;333-350

HILTPOLD, I.; BARONI, M.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; TURLINGS, T.C.J. 2010. Selection of entomopathogenic nematodes for enhanced responsiveness to a volatile root signal helps to control a major root pests. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 2417-2423.

HUNG H.Y, HARIS P.W. R, HEAPY & BRIMBLE M.A. 2011. Synthesis and Assignment of Stereochemistry of the Antibacterial Cyclic Peptide “Xenamamide”. **Organic and Biomolecular Chemistry**. 9:236 -242

HU, K., L. JIANXIONG & J.M. WEBSTER. 1999. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology*, 1: 457-469

HOLLY SNYDER, HONGJUN HE, HEATHER OWEN, CHRIS HANNA & STEVEN FORST. 2011. Role of Mrx Fimbriae of *Xenorhabdus nematophilus* in Competitive Colonization of the Nematode Host. **Appl. and environmental microbiology**. vol. 77 no 20.

JACKSON, T.J., WANG, H., NUGENT, M.J., GRIYN, C.T., BURNELL, A.M., DOWDS, B.C.A., 1995. Isolation of insect pathogenic bacteria, *Providencia rettgeri*, from *Heterorhabditis* spp. **Journal Applied Bacteriology** 78, 237–244.

JACQUES-OLIVIER THALER, BERNARD DUVIC, ALAIN GIVAUDAN, & NOËL BOEMARE. 1998. Isolation and Entomotoxic Properties of the *Xenorhabdus nematophilus* F1 Lecithinase. **Applied and environmental microbiology**, p. 2367–2373

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

KAYA, H.K & SIMMANN, 1987. Parasitic nematodes in biological control of insect pest. University of California, Berkely, CA.2 P.

KAYA, H.K. & GAUGLER R. 1993. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology** 38: 181-206.

KAMITANI FL. 2010. Caracterização molecular de isolados de NEPs, H. spp. e suas simbioses, *Photorhabdus* spp., provenientes de Monte Negro, RO. Tese (Doutorado), Instituto de ciências biomédicas, Universidade de São Paulo.

KOPPENHÖFER AM. 2007 **Nematodes**. Pp. 249–264 in L. A. Lacey and H. K. Kaya, eds. Field manual of techniques in invertebrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests, second ed. Dordrecht: Springer.

LEE MING-MIN & STOCK S. PATRICIA. 2010. A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp. (α -Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**. 104: 67–74

LENGYEL KATALINA, LANG ELKE, FODOR ANDRAS, SZALLAS EMILIA, SCHUMANN PETER, STACKEBRANDT ERKO. 2005. Description of four novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus budapestensis* sp. nov., *Xenorhabdus ehlersii* sp. nov., *Xenorhabdus innexi* sp. nov., and *Xenorhabdus szentirmaii* sp. nov. **System Appl. Microbiol**. 28: 115–122.

LI J, CHEN G & WEBSTER JM. 1997. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). **Canadian journal of microbiology** 43:8 Aug pg 770-3

LYSENKO, O., WEISER, J., 1974. Bacteria associated with the nematode *Neoplectana carpocapsae* and the pathogenicity of this complex for *Galleria mellonella* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**. 24, 332–336.

MAHAR, A.N.; MUNIR, M.; ELAWAD, S.; GOWEN, S.R. & HAGUE, N.G.M. 2005. Pathogenicity of bacterium, *Xenorhabdus nematophila* isolated from entomopathogenic nematode (*Steinernema carpocapsae*) and its secretion against *Galleria mellonella* larvae. **Journal of Zhejiang University Science**. 6B(6):457-463 p.

MAHAR, A.N.; N.D. JAN; G.M. MAHAR; A.Q. MAHAR. 2008. Control of Insects with Entomopathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophila* and its Toxic Secretions. **International journal of agriculture & biology**. 10:52-56

MANNHERZ HANS GEORG. 2010. Max-Planck-Forscher entschlüsseln, wie Fadenwürmer und Bakterien gemeinsam Jagd auf Insektenlarven machen. **Eine tödliche Allianz**.

MCINERNEY, B.V., R.P. GREGSON, M.J. LACEY, R.J. AKHURST AND G.R. LYONS *et al.*, 1991. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J. Nat. Prod.*, 54: 774-784.

MOHAN S, RAMAN R, GAUR H. 2003. Foliar application of *Photorhabdus luminescens*, symbiotic bacteria from entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica*, to kill cabbage butterfly *Pieris brassicae*. **Current Science** 84:1397.

MONTESINOS, E. 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. **International Microbiology**, 6, 245-252

- NGUYEN, K.B., 2009. Morphology and taxonomy of entomopathogenic nematodes. <<http://entnem.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/kbnstein.htm>> (accessed 01.01.2009).
- NGUYEN, K.B., Duncan, L.W., 2002. *Steinernema diaprepesi* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) a parasite of the citrus root weevil *Diaprepes abbreviatus* (L) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Nematology* 34, 159–170.
- NGUYEN, K.B., Smart Jr., G.C., 1995. Scanning electron microscope studies of *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica* 41,183–190.
- NGUYEN, K.B., Maruniak, J., Adams, J.B., 2001. Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. *Journal of Nematology* 33, 73–82.
- NGUYEN, K.B., Malan, A.P., Gozel, U., 2006a. *Steinernema khoisanae* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematology* 8, 157–175.
- NGUYEN, K.B., QIU, L., ZHOU, Y., PANG, Y., 2006b. *Steinernema leizhouense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern China. *Russian Journal of Nematology* 14, 101–118.
- NGUYEN, K.B., SHAPIRO-ILAN, D., MBATA, G., 2008. *Heterorhabditis georgiana* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Georgia, USA. *Nematology* 10, 433–448.
- OROZCO ROUSEL ANTONIO. 2012. Characterization of the entomopathogenic bacterium *photorhadus luminescens sonorensis*, and bioactivity of its secondary metabolites. Dissertação (Mestrado), Department of Entomology, University of Arizona.
- ORTEGA-ESTRADA MARÍA DE JESÚS, DEL RINCÓN-CASTRO M. CRISTINA, BASURTO-RÍOS REGINA, TOLEDO JORGE, AND IBARRA JORGE E. 2012. Phoresis between *serratia marcescens* and *Steinernema carpocapsae* (rhabditida: steinernematidae) during infection of *Galleria mellonella* (lepidoptera: pyralidae) larvae. **Florida Entomologist** (95)1: 120-127
- PANKEWITZ F & HILKER M. 2008. Polyketides in insects: ecological role of these widespread chemicals and evolutionary aspects of their biogenesis. **Biology Rev** 83:209-226.
- PARK, S. H. & Y. S. YU. 1998. Isolation and identification of *Xanthomonas maltophilia* from *Galleria mellonella* larvae. **Keimyung Univ. Bull. I.I.S.** 21(1):37-46
- PARK Y, ALIZA AR & STANLEY D. 2005. A secretory PLA2 associated with tobacco hornworm hemocyte membrane preparations acts in cellular immune reactions. **Arch Insect Biochem Physiol** 60:105-115.
- PETEIRA BELKIS, RODRÍGUEZ MAYRA G., ROSALES CAROLINA & SALAZAR EFRAÍN. 2008. Uso de técnicas moleculares en la identificación de nemátodos entomopatógenos y sus bacterias simbiotas. **Revista digital del instituto nacional de investigaciones agrícolas.** 3 Sep- dic.

POINAR JR., G.O., 1966. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoaplectana* sp. (Steinernematidae: Nematoda). **Nematologica** 12, 105–108.

POINAR JR., G.O., 1990. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. Entomopathogenic **Nematodes in Biological Control**, pp. 23–62. Edited by R. Gaugler & H. K. Kaya. Boston: CRC Press.25

POWELL JR, & WEBSTER JM. 2004. Target Host Finding by *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in the Presence of a Non-Target Insect Host. **J Nematol.** Sep;36(3):285-9.

RASMANN, S.; KÖLLNER, T.G.; DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; GERSHENZON, J.; TURLINGS, T.C.J. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature**, v. 434, p. 732-736.

RATHORE JITENDRA SINGH. 2013. Expression, Purification, and Functional Characterization of Atypical Xenocin, Its Immunity Protein, and Their Domains from *Xenorhabdus nematophila*. **International Journal of Bacteriology**. Vol 2013, Article ID 746862, 9 pages

ROSA JULIANA M. O., DA SILVA NATALI R., LEITE LUIS G., HARAKAVA RICARDO & DE OLIVEIRA CLAUDIO M. G. 2013. Caracterização molecular de nematoides entomopatogênico. **Comunicado técnico, Instituto biológico de São Paulo**. Numero 191. Disponível online: http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=191. Acesso em 26 março de 2014

RIBEIRO, CA. 2002. **Efeito sobre os hemócitos de insetos do factor citotóxico produzido pela bactéria *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae)**. Tese (Doutorado), Universidade dos Açores.

SHEETS JOEL J., HEY TIM D., FENCIL KRISTIN J., BURTON STEPHANIE L., NI WEITING, LANG ALEXANDER E., BENZ ROLAND & AKTORIES KLAUS. 2011. Nematophilus structure and pore formation. **The journal of biological chemistry** Vol. 286, NO. 26, pp.

SALVADORI JULIANA deMARCO. 2011. **Caracterização da patogenicidade de NEPs e de bactérias associadas para o controle biológico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae)**. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SHRESTHA YK, LEE KY. 2012 Oral toxicity of *Photorhabdus* culture media on gene expression of the adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* **Journal of Invertebrate Pathology** 109: 91–96

SCHÜFFLER ANJA, KAUTZ DANIELA, LIERMANN JOHANNES C, OPATZ TILL, & ANKE TIMM. 2009. Allantofuranone, a new antifungal antibiotic from *Allantophomopsis lycopodina* IBWF58B-05A. **The Journal of Antibiotics**. doi:10.1038/ja.2008.21

SUN HO PARK & YEON SU YU. 1999. Isolation and identificaion of a symbiotec bacterium from *Steinernema carpocapsae*. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** 4: 12 -16.

TAILLIEZ PATRICK, PAGE S SYLVIE, GINIBRE NADEGE & BOEMARE NOËL. 2006. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56, 2805–2818.

TAILLIEZ, P., LAROUI, C., GINIBRE, N., PAULE, A., PAGÈS, S. & BOEMARE, N. 2010. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. **Int Journal of Systematic Evol Microbiol.** 60, 1921-1937.

THOMAS, G.M. & POINAR, G.O., JR. 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic and nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology.** 29, 352-360.

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

WEISER, J., 1963. Diseases of insects of medical importance in Europe. Bull. **World Health Org.** 28, 121–127

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

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

YAM KUMAR SHRESTHA & KYEONG-YEOLL LEE. 2011. Oral toxicity of *Photorhabdus* culture media on gene expression of the adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. **Journal of Invertebrate Pathology.** 109 (2012) 91–96.