

Nematoides entomopatogênicos: as duas faces de uma simbiose

Entomopathogenic nematodes: two sides of a symbiosis

Daniela Peres Almenara^{1,2}, Maira Rodrigues de Camargo Neves¹, Fernando Luiz Kamitani¹ e Carlos E. Winter¹

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP

Resumo. Nematóides entomopatogênicos são aqueles capazes de matar insetos. Essa propriedade inseticida é decorrente de um tipo bastante peculiar de simbiose estabelecida entre o verme e uma bactéria, sendo este último organismo o responsável pela morte do inseto em si. Além de oferecer dados interessantes para a compreensão biológica dos mecanismos envolvidos na manutenção de uma simbiose, os nematóides entomopatogênicos representam uma ferramenta potencial para controle de insetos-pragas da agricultura e até mesmo de aracnídeos, como carrapatos. Adicionalmente, o estudo de bactérias entomopatogênicas vem permitindo a identificação de diferentes compostos bioativos de origem microbiana.

Palavras-chave. *Entomopatogênico; nemátode; simbiose; Photorhabdus; Heterorhabditis.*

Abstract. Entomopathogenic nematodes are those capable of killing insects. This insecticide property is due to a rather peculiar kind of symbiosis established between the worm and bacteria, the latter being the main responsible for the death of the insect. Besides offering interesting data to understand the biological mechanisms involved in symbiosis, the entomopathogenic nematodes represent a potential tool to control insect pests in agriculture and even arachnids like ticks. Additionally, the study of entomopathogenic bacteria is leading to the identification of different bioactive compounds of microbial origin.

Keywords. *Entomopathogenic; nematode; symbiose; Photorhabdus; Heterorhabditis*

² Contato do autor:

almenara@usp.br

Recebido 19out10

Aceito 10mar11

Publicado

Nematoides Entomopatogênicos (NEPs)

Tradicionalmente, organismos parasitas são definidos como aqueles que vivem em associação com outro organismo (hospedeiro) do qual retiram meios para sua sobrevivência e reprodução, normalmente causando danos à saúde da espécie parasitada. É esta a definição encontrada, por exemplo, nos livros didáticos e nos dicionários. Parasitar, portanto, seria a simbiose (associação biológica) na qual um organismo vive junto de outro para tirar proveito, explorar. Por essa razão o termo é empregado não somente em Biologia, mas também pejorativamente, na língua portuguesa, para classificar as pessoas que não trabalham e vivem às custas de outras.

Uma idéia bastante difundida é a de que um parasita eficiente seria aquele que causa pouco dano ao hospedeiro, numa forma de “preservar” seu ambiente de vida pelo máximo de tempo possível (Ebert & Herre, 1996). No entanto, estudos mais recentes questionam essa afirmação ao demonstrar uma crescente complexidade dentro deste hábito de vida (ver a excelente discussão de Maynard-Smith, 1998). Uma questão fundamental no estudo da interação parasita-hospedeiro é a reconstrução da história deste tipo de associação ou, em termos mais biológicos, desta simbiose. É importante reunir dados na tentativa de definir

se os parasitas e seus hospedeiros estão coevoluindo, ou seja, sofrendo alterações selecionadas em ambos os organismos durante toda a sua história evolutiva (a mudança de um acarreta mudanças no outro, e vice-versa) ou, alternativamente, se as características observadas hoje são frutos de uma mudança exclusiva em uma das espécies, promovida por uma pressão seletiva decorrente da própria simbiose ou de outro fator ambiental. Neste segundo cenário, a evolução das espécies pode até estar relacionada de forma que as espécies se encontrem coadaptadas, mas não está atrelada a mecanismos de coevolução. Nem sempre espécies coadaptadas coevoluíram, pois poderiam estar evoluindo independentemente e só depois estabelecer a simbiose, como discutido por Ridley (2006).

Uma simbiose bastante distinta diz respeito ao hábito de vida e reprodução dos chamados nematoides entomopatogênicos (NEPs), pertencentes a dois gêneros diferentes, *Heterorhabditis* e *Steinernema*. O termo entomopatogênico pode ser definido como capacidade de matar ou causar patologia em insetos e é aplicado amplamente em biologia para os organismos que liberam toxinas e outras substâncias com atividade inseticida. Entre as espécies entomopatogênicas mais estudadas encontram-se os fungos que secretam substâncias ativas contra diferentes ordens de inseto e alguns aracnídeos (Ortiz-Urquiza e cols., 2010;

Campos e cols., 2010; Toledo e cols., 2010). Embora os fungos sejam mais estudados e aplicados como fonte natural de inseticidas, Nematoides Entomopatogênicos são os que melhor mostram a complexidade deste hábito de vida. Estes nematoides apresentam, durante seu ciclo de vida (Figura 1), uma forma larval de resistência conhecida

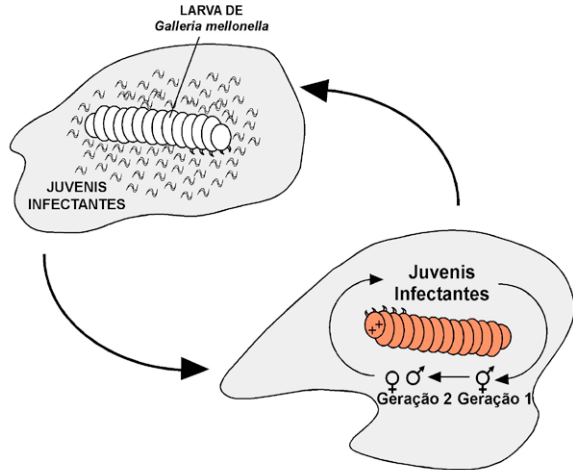


Figura 1. Ciclo de vida de nematoides do gênero *Heterorhabditis*

como Juvenil Infectante (JI), encontrada livre no solo. Este JI possui duas cutículas superpostas e seus orifícios naturais (boca e ânus) encontram-se fechados, de forma a evitar dessecação e conferir maior tempo de sobrevivência. Dentro de seu tubo digestivo, os JIs carregam uma monocultura de bactérias (Figura 2A). Estas bactérias pertencem a uma única espécie (uma para cada espécie de nematoide) e permanecem com crescimento e metabolismo controlado dentro do intestino do JI, até que este encontre um inseto para infectar. Os JIs infectam este inseto adulto ou larva, penetrando em orifícios como boca, ânus ou espiráculos ou ainda perfurando regiões menos resistentes do exoesqueleto. Algumas espécies de NEPs possuem um dente córneo na região anterior do corpo que facilita a penetração (Figura 2B). Uma vez no hemoceloma (principal cavidade do corpo do inseto), os JIs liberam as bactérias neles contidas, iniciando uma infecção. Essas bactérias rapidamente matam o inseto (normalmente entre 24 e 48 horas -Ciche & Ensign, 2003). As bactérias são, de fato, as responsáveis pela morte do inseto: quando inoculadas artificialmente, são necessárias menos de 10 células para atingir a dose letal para 50% dos insetos ($LD_{50} < 10$) (Milstead, 1979). Além disso, nematoides livres de suas bactérias simbiotes são muitíssimas vezes menos eficientes para ocasionar a morte do seu hospedeiro (Han e Ehlers, 2000).

Assim que são liberadas no inseto, as bactérias colonizam seus tecidos mas mantêm o tubo digestivo dos mesmos intacto, de modo a evitar a contaminação por outras bactérias ali presentes. Esses nematoides alimentam-se dos nutrientes liberados na digestão dos tecidos do inseto e também das próprias bactérias que proliferam no cadáver do inseto. De maneira semelhante ao que ocorre com fungos entomopatogênicos, os nematoides e suas bactérias são capazes de infectar diferentes ordens de insetos. Em condições de laboratório esses nematoides são capazes

de infectar artrópodes de outras ordens, como carrapatos (Monteiro e cols., 2010).

Heterorhabditis e *Photorhabdus*

Heterorhabditis é o gênero de nematoides entomopatogênicos mais frequentemente encontrado no Hemisfério Sul. Este gênero é o único da família Heterorhabditidae. São nematoides da ordem Rhabditida, a mesma que inclui o organismo-modelo *Caenorhabditis elegans*, primeiro animal a ter seu genoma sequenciado (TCESC, 1998).

O ciclo de vida de espécies de *Heterorhabditis* ocorre dentro do cadáver do inseto infectado. Após a entrada no inseto, o JI se desenvolve em uma fêmea hermafrodita, capaz de se autofertilizar. Esta fêmea retém os ovos no interior de seu corpo até que eles eclodam e as larvas rompam os tecidos e a cutícula da mãe, matando-a, um fenômeno conhecido como Endotoquia Matricida. Livres no interior do cadáver do inseto, os juvenis de segunda geração, recém-liberados se alimentam e se desenvolvem em fêmeas e machos. Estes adultos se reproduzem e esse ciclo envolvendo fêmeas e machos se repete até que se esgotem os nutrientes do inseto infectado (Poinar Jr, 1990). Quando isso ocorre, juvenis do estágio 1 (J1), sem recursos para a reprodução de novas gerações, passam por um estágio J2 modificado que levará esses indivíduos a um estágio equivalente ao J3, o estágio JI. Os nematoides desse estágio retêm sempre um inóculo de bactéria em seu intestino, e são liberados para o meio externo, onde permanecem até nova infecção.

Trabalhos recentes com *Heterorhabditis* indicam que a transmissão de bactérias para as formas juvenis ocorre a partir das bactérias do intestino das fêmeas hermafroditas. As bactérias atravessam as células intestinais do corpo da fêmea e ficam disponíveis para os juvenis recém-eclodidos. Desse modo, pode-se dizer que o fenômeno da endotoquia matricida é responsável por garantir que somente as bactérias simbiotes sejam transferidas para a prole (Ciche e cols, 2008). Nas gerações seguintes, a proliferação exclusiva da bactéria simbiote é controlada pela secreção de toxinas e metabólitos secundários.

As bactérias simbiotes de *Heterorhabditis* pertencem ao gênero *Photorhabdus*. É um gênero que compreende bactérias móveis, gram negativas, geralmente bioluminescentes, pertencentes à família Enterobacteriaceae, subdivisão γ das Proteobacteria (Fischer-Le Saux e cols., 1999). Esta família de bactérias engloba uma série de espécies de importância médica e veterinária, incluindo os

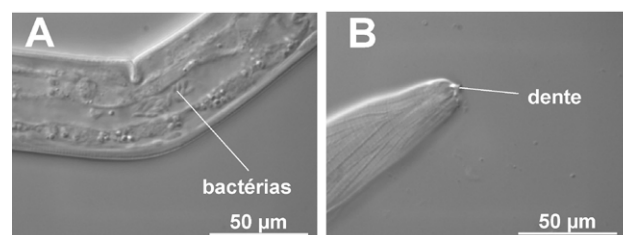


Figura 1. Fotomicrografia de contraste de interferência (Nomarski) de Juvenis Infectantes de *Heterorhabditis indica* (LPP1). (A) *Photorhabdus* sp. retida no interior do intestino. (B) Região anterior com destaque para o dente córneo.

patógenos humanos *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Yersinia* spp. O gênero *Photorhabdus* é o único que possui espécies bioluminescentes terrestres, embora esta característica não seja obrigatória. Espécies de *Photorhabdus* podem ser mantidas em laboratório, dissociadas do nematoide entomopatogênico. Quando estas bactérias entram na fase estacionária da sua curva de crescimento, elas secretam ativamente diversos produtos para o meio de cultura, incluindo lipases, fosfolipases, proteases e antibióticos (Forst e cols., 1997). Estes produtos são, provavelmente, os mesmos secretados na hemolinfa dos insetos.

Na natureza, as estratégias utilizadas pelos JIs para infectar insetos não são padronizadas. JIs de *Heterorhabditis* apresentam comportamento do tipo “cruiser”, pois vagam pela água intersticial do solo até encontrar um inseto. Já em JIs de espécies do gênero *Steinernema* é comum o comportamento de emboscada, quando o JI se posiciona de forma a interceptar um inseto que se movimenta próximo. Já no laboratório, a maioria dos estudos envolvendo *Heterorhabditis* e *Photorhabdus* utilizam o lepidóptero (ordem que inclui borboletas e mariposas) *Galleria mellonella* como inseto a ser infectado. A dose que mata 50% das larvas de *Galleria* (DL_{50}) é de cinco unidades formadoras de colônias de *Photorhabdus* (5 UFC). Há uma forte correlação entre a taxa de crescimento bacteriano e o tempo decorrido para a morte das larvas de lepidópteros (Clarke, 2008). Estes dados sugerem fortemente que os produtos do metabolismo bacteriano liberados no inseto têm o papel de matar e digerir os tecidos dos insetos, além de prevenir a infecção por fungos e outras bactérias oportunistas.

Heterorhabditis bacteriophora e sua bactéria simbiote *Photorhabdus luminescens* são as espécies entomopatogênicas mais estudadas. No Brasil, algumas linhagens de nematoides entomopatogênicos de duas outras espécies, *Heterorhabditis baujardi* e *Heterorhabditis indica* (Dolinski e cols., 2008), já foram isoladas e são mantidas em laboratório, juntamente com as linhagens de bactérias simbiotes correspondentes. Esses isolados foram obtidos a partir de JIs presentes em amostras de solo da cidade de Monte Negro, no estado de Rondônia

Nematoides entomopatogênicos e controle biológico

A propriedade dos nematoides entomopatogênicos de infectar diferentes ordens de insetos despertou grande interesse da comunidade científica para uma possível aplicação no controle biológico de pragas, principalmente aquelas cujo estágio larval ocorre no solo.

De fato, em países do hemisfério norte, a utilização de nematoides entomopatogênicos para controle de pragas agrícolas remonta ao final do século XIX (Ehler, 1990). Atualmente, existem empresas especializadas na produção em massa de NEPs e de formulações prontas para a aplicação. Um dos estudos mais recentes envolvendo a aplicação de NEPs no campo diz respeito ao controle de uma larva de mariposa que ataca culturas de amêndoas. A espécie de nematoide empregada é *Steinernema carpocapsae*, abundante na América do Norte e a eficiência obtida foi bas-

tante significativa, atingindo até 78% de morte para larvas e pupas (Chambers e cols., 2010). Também recentemente, verificou-se sucesso no emprego de NEPs para o controle de um besouro praga de palmeiras (Dembilio e cols., 2010) e outro que ataca culturas de cerejas e maçãs (Pereault e cols., 2009). Fatores como a redução do emprego de pesticidas são importantes argumentos a favor do emprego de NEPs em controle biológico. No entanto, o alto custo de produção e aplicação restringe esse uso a culturas de alto valor comercial como algumas frutas (Gaugler, 2002).

Embora a utilização de NEPs tenha baixo potencial de impacto ecológico quando comparado, por exemplo, a inseticidas químicos, é de fundamental importância que a espécie de nematoide utilizada seja compatível com a cadeia ecológica presente no solo, evitando riscos de desequilíbrio na flora natural do ambiente. Além disso, todos os possíveis impactos negativos encontram-se limitados à área tratada, uma vez que a mobilidade dos JIs é baixa e a continuidade do ciclo reprodutivo depende da presença do inseto. Diante dessas considerações, a identificação e caracterização de espécies nativas são de grande importância para o emprego de NEPs em controle biológico.

A primeira descrição de uma espécie entomopatogênica brasileira foi feita por Pereira em 1937 e, até recentemente, esta era a única espécie descrita. Em 2006, Andaló e colaboradores descreveram *Heterorhabditis amazonensis*, e em 2008, Dolinski e colaboradores identificaram os isolados de *H. baujardi* e *H. indica*, todos eles na região Amazônica. Este trabalho despertou a atenção para o uso de NEPs para controle biológico em território nacional.

No Brasil, uma das iniciativas de sucesso foi o emprego de juvenis infectantes de *H. indica* no controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), uma praga de milho (Garcia e cols., 2008). Análises conduzidas no campo mostram que esta espécie de NEP encontrada no Brasil produz resultados semelhantes àqueles decorrentes do controle utilizando *Steinernema*, embora no caso de *Heterorhabditis* as quantidades de JIs aplicadas sejam maiores. Também já foram conduzidos experimentos com *Heterorhabditis* spp. para o controle do “bicho da goiaba” (*Conotrachelus psidii*), uma larva de besouro responsável por grande prejuízo econômico na produção dessa fruta (Dolinski e cols., 2006).

Para fins de aplicação, os NEPs podem ser produzidos em grandes quantidades tanto *in vivo* quanto *in vitro*. No caso das infecções *in vivo*, o inseto mais utilizado é *Galleria mellonella*, que apresenta um rendimento de $0,5 \times 10^5$ – 4×10^5 JIs por larva infectada, dependendo da espécie de nematoide (Grewal e cols., 2001). Existem diferentes técnicas para cultivo *in vitro*, muitas delas ainda em fase de aperfeiçoamento. A cultura em meio sólido, proposta por Bedding em 1984 permite rendimento em torno de 10^6 JIs por grama de meio, enquanto as técnicas empregando meio líquido e fermentadores podem resultar em aproximadamente 500 JIs /ml (Isláz-Lopez e cols., 2005). Formulações contendo NEPs podem ser aplicadas com os pulverizadores tradicionais, utilizados na aplicação rotineira de defensivos agrícolas.

***Photorhabdus* e compostos bioativos**

Estudos com diferentes sistemas de interação bactéria-hospedeiro levaram à descrição de diversos mecanismos e vias responsáveis pela manutenção dessa relação e à descoberta de várias moléculas envolvidas em patogenicidade, virulência e controle da resposta imune do inseto. O gênero de bactéria entomopatogênica *Photorhabdus* está se destacando como modelo para estudos de relações bactéria-hospedeiro (Clarke, 2008).

O genoma de *Photorhabdus luminescens* da linhagem TT01 (aproximadamente $5,6 \times 10^6$ pares de bases) já foi completamente sequenciado. Ele contém 4389 genes para proteínas, que codificam um número muito grande de toxinas, maior que o de outras bactérias patogênicas descritas. Muitas destas toxinas são secretadas, responsáveis provavelmente pela morte do inseto parasitado (Duchaud e cols., 2003). Também, graças à análise do genoma, foi detectada a presença de 22 *loci* genéticos que contêm genes codificadores para policetídeo sintases (PKSs), peptídeo sintases não-ribossômicas (NRPSs) e quimeras dessas duas enzimas, que, em outras bactérias, já foram caracterizadas como componentes de vias de síntese moléculas com atividade antibiótica (McDaniel e cols., 1999; Fischbach e Walsh, 2006). No total, 6% do genoma parecem estar envolvidos na biossíntese de pequenas moléculas bioativas, derivadas do metabolismo dessas enzimas. Esses dados são bastante significativos; o gênero *Streptomyces*, uma fonte clássica de moléculas antibióticas, por exemplo, tem apenas 3% do genoma relacionado à síntese desse tipo de metabólito. (Clarke, 2008). Muitos produtos bioativos explorados comercialmente são derivados da atividade de enzimas do tipo PKS ou NRPS (Bumpus e Kelleher, 2008). Também já foram realizados os sequenciamentos dos genomas de *P. asymbiotica* (Wilkinson e cols, 2009) e *P. temperata*, estando os últimos resultados em fase de finalização e análise. *P. asymbiotica* é a única espécie desse gênero de bactérias associada a casos de infecções oportunistas em humanos (Gerrard e cols., 2006).

As primeiras toxinas de *Photorhabdus* caracterizadas (toxinas Tc e Mcf) são exemplos de proteínas envolvidas no controle da resposta imunológica do inseto infectado, através da indução de apoptose nas células do sistema imune. Essa propriedade tóxica também foi verificada em células de mamíferos (Waterfield e cols., 2001; Daborn e cols., 2002; Au e cols., 2004; Dowling e cols., 2004; Waterfield e cols., 2005). Os trabalhos de Brugirard-Ricaud e cols. (2004a, 2004b) caracterizaram a proteína efetora LopT, capaz de impedir processos fagocíticos fundamentais para o estabelecimento de uma resposta imunológica completa por parte do inseto hospedeiro. Além disso, bactérias do gênero *Photorhabdus* produzem compostos que inibem a enzima fosfolipase A2 do inseto infectado. Esta enzima está envolvida na biossíntese de eicosanóides reguladores da resposta imunológica celular (Kim e cols., 2005; Stanley, 2006).

Dentre os metabólitos secundários previstos nas análises genômicas, apenas 3 foram caracterizados até o momento. Primeiramente, Derzelle e colaboradores (2002) identificaram e caracterizaram um grupo de genes

envolvidos na biossíntese de um antibiótico b-lactâmico do grupo dos carbapenenos (carbapenens), comumente empregados contra bacilos gram-negativos, cocos gram-positivos e microorganismos anaeróbios (Bradley e cols., 1999).

Também foi demonstrada a biossíntese de um pigmento do tipo antraquinona (Brachmann e cols., 2007). É o primeiro exemplo de biossíntese de antraquinonas por bactérias gram-negativas. A função desse pigmento em *P. luminescens* ainda não é conhecida, mas sabe-se que a molécula apresenta uma atividade antibiótica fraca.

O terceiro *locus* analisado está relacionado à biossíntese de estilbenos e encontra-se presente em diversas linhagens diferentes de *Photorhabdus* (Joyce e cols., 2008). Estilbenos são moléculas sintetizadas normalmente por plantas, com efeitos biológicos variados, tais como: antibióticos (Willians e cols., 2005), antiinflamatórios (Kim e cols., 2008), antitumorais (Surh, 2003; Cao e cols., 2008), e neuroprotetores (Orhan e cols., 2008). Entre os estilbenos mais conhecidos está o resveratrol, encontrado na casca da uva. Esta molécula apresenta efeitos bastante benéficos para a saúde humana e sua possível biossíntese por bactérias representaria um importante resultado dos pontos de vista biotecnológico e farmacêutico (Katsuyama e cols., 2008). A atividade nematocida de estilbenos já foi demonstrada. O trabalho de Hu e colaboradores (1999) descreveu a purificação, a partir de culturas de *Photorhabdus luminescens*, do 3,5-dihidroxi-4-isopropil-estilbeno e mostrou sua atividade contra nematoides de diferentes espécies, incluindo a espécie modelo *Caenorhabditis elegans*. Outros estilbenos já se mostraram ativos contra o nematoide *Bursaphelenchus xylophilus*, causador de patologia para espécies de árvores do gênero *Pinus* e relacionado a importantes perdas econômicas para a indústria de madeira de reflorestamento (Kohn e cols., 2007). Também já foi identificada, em *P. luminescens* TT01, uma via relacionada à biossíntese de um estilbeno com atividade antibiótica (Willians e cols., 2005).

A caracterização de metabólitos secundários na linhagem MN7, isolada no Brasil, ainda está em fase de realização. Purificações preliminares indicam a presença de um estilbeno, cuja atividade biológica está sendo testada pelo nosso grupo, no laboratório de Biologia Molecular de Nematoides (<http://www.icb.usp.br/~cewinter/>) em colaboração com o Laboratório de Química de Produtos Naturais (<http://www2.iq.usp.br/docente/majokato/>) do Instituto de Química, ambos da Universidade de São Paulo.

Como mostramos nesta revisão, os nematoides entomopatogênicos que inicialmente foram utilizados para controle de pragas, tornaram-se modelos biológicos bastante interessantes. O estudo aprofundado desta simbiose particular permitiu desvendar mecanismos que vão da imunologia de invertebrados à fisiologia de bactérias e interação patógeno-hospedeiro (Eleftherianos e cols., 2010). Os desdobramentos dos resultados resumidos nesta curta revisão permitem prever a utilização futura dos nematoides entomopatogênicos como modelos para estudos em outros campos do conhecimento biológico.

Bibliografia

- Andaló, V.; Nguyen, K.B.; Alcides, M. (2006). *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematology*. 8, 853-867.
- Au, C.; Dean, P.; Reynolds, S.E.; French-Constant, R. H. (2004). Effect of the insect pathogenic bacterium *Photorhabdus* on insect phagocytes. *Cellular Microbiology*. 6, 89-95.
- Brachmann, A.O.; Joyce, S.A.; Jenke-Kodama, H.; Schwär, G.; Clarke, D.J.; Bode, H.B. (2007). A type II Polyketide Synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *Chemical Biochemistry*. 14, 1721-1728.
- Bradley, J.S.; Garau, J.; Bode, H.; Rolston, K.V.; Wilson, S.E.; Quinn, P.J. (1999). Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11, 93-100.
- Brugirard-Ricaud, K.; Duchaud, E.; Givaudan, A.; Girard, P.A.; Kunst, F.; Boemare, N.; Brehélin, M.; Zumbühl, R. (2004a). Site-specific antiphagocytic function of the *Photorhabdus luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cellular Microbiology*. 7, 363-371.
- Brugirard-Ricaud, K.; Givaudan, A.; Parkhill, J.; Boemare, N.; Kunst, F.; Zumbühl, R.; Duchaud, E. (2004b). Variation in the effectors of the type III secretion system among *Photorhabdus* species as revealed by genomic analysis. *Journal of Bacteriology*. 186, 4376-4381.
- Bumpus, S.B.; Kelleher, N.L. (2008). Accessing natural product biosynthetic processes by mass spectrometry. *Current Opinion Chemical Biology*. 12, 475-482.
- Campos, R.A.; Boldo, J.T.; Pimentel, I.C.; Dalfovo, V.; Araújo, W.L.; Azevedo, J.L.; Vainstein, M.H.; Barros, N.M. (2010). Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genetic and Molecular Research*. 9, 1421-1430.
- Cao, T.M.; Durrante, D.; Tripathi, A.; Liu, J.; Tsai, S.; Kellog, G.E.; Simoni, D.; Lee, R.M. (2008). Stilbene derivatives that are colchicine site microtubule inhibitors have antileukemic activity and minimal systemic toxicity. *American Journal of Hematology*. 83, 390-397.
- Chambers, U.; Bruck, D.J.; Olsen, J.; Walton, V.M. (2010). Control of overwintering filbertworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae with *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Economic Entomology*. 103, 416-422.
- Clarke, D.J. (2008). *Photorhabdus* : a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cellular Microbiology*. 10, 2159-2167.
- Ciche, T.A.; Kim, K.S.; Kaufmann-Daszczuk, B.; Nguyen, K.C.Q.; Hall, D.H. (2008). Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Applied Environmental Microbiology*. 74, 2275-2287.
- Ciche, T.A. ; Ensign, J.C. (2003). For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 1890-1897.
- Daborn, P.J.; Waterfield, N.; Silva, C.P.; Au, C.P.; Sharma, S.; French-Constant, R.H. (2002). A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf) allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *PNAS*. 99, 10742-10747.
- Dembilio, O.; Llácer, E.; Martínez de Altube Mdel, M.; Jacas, J.A. (2010). Field efficacy of imidacloprid and *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) in *Phoenix canariensis*. *Pest Management Science*. 66, 365-370.
- Derzelle, S.; Duchaud, E.; Kunst, F.; Danchin, A.; Bertin, P. (2002). Identification, characterization and regulation of a cluster of genes involved in carbapenem biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *Applied Environmental Microbiology*. 68, 3780-3789.
- Dolinski, C.; Del Valle, E.; Stuart, R.J. (2006). Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control*. 36, 422-427.
- Dolinski, C., Kamitani, F.L., Machado, I.R. and Winter, C.E. (2008) Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil - Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 103, 150-159.
- Dowling, A.J.; Daborn, P.J.; Waterfield, N.R.; Wang, P.; Streuli, C.H.; French-Constant, R.H. (2004). The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy (Mcf) promotes apoptosis in mammalian cells. *Cellular Microbiology*. 6, 345-353.
- Duchaud, E.; Rusniok, C.; Frangeul, L.; Buchrieser, C.; Givaudan, A.; Taourit, S.; Bocs, S.; Boursaux-Eude, C.; Chandler, M. Charles, J-F.; Dassa, E.; Derose, R.; Derzell, S.; Freyssinet, G.; Guadriault, S.; Médigue, C.; Lanois, A.; Powell, K.; Siguier, P.; Vincent, R.; Wingate, V.; Zouine, M.; Glaser, P.; Boemare, N.; Danchin, A.; Kunst, F. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature Biotechnology*. 2, 1307-1313.
- Ebert, D.; Herre, E.A. (1996). The Evolution of parasite diseases. *Parasitology Today*. 12, 96-101.
- Ehler, L.E. (1990). Some contemporary issues in biological control of insects and their relevance to the use of entomopathogenic nematodes. In: Gaugler, R.; Kaya, H.K. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1-19.
- Eleftherianos, I.; French-Constant, R.H.; Clarke, D.J.; Dowling, A.J.; Reynolds, S.E. (2010) Dissecting the immune response to the entomopathogen *Photorhabdus*. *Trends in Microbiology* 18, 552-560.
- Fischbach, M.A.; Walsh, C.T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery and mechanisms. *Chemical Reviews*. 106, 3468-3496.
- Fisher-Le Saux, M.; Viallard, 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., *P. asymbiotica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 49, 1645-1656.
- Forst, S.; Dowds, B.; Boemare, N.; Stackenbrandt, E. (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual Review of Microbiology*. 51, 47-72.
- Garcia, L.C.; Raetano, C.G.; Leite, L.G. (2008). Tecnologia de aplicação para os nematóides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) para controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. *Neotropical Entomology*. 37, 305-311.
- Gaugler, R. (2002). *Entomopathogenic Nematology*. New York, NY, USA: CABI Publishing, 402p.
- Gerrard, J.G.; Joyce, S.A.; Clarke, D.J.; French-Constant, R. H.; Nimmo, G.R.; Looke, D.F.M.; Pearce, L.; Waterfield, N.R. (2006). Nematode symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*.

- Emerging Infectious Diseases. 12, 1562-1564.
- Grewal, P.S.; De Nardo, E.A.B.; Aguilera, M.M. (2001). Entomopathogenic Nematodes: potential for exploration and use in South America. *Neotropical Entomology*. 30, 191-205.
- Han, R.C.; Ehlers, R.U. (2000). Pathogenicity, development and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. *Journal of Invertebrate Pathology*. 75, 55-58.
- Hu, K.; Li, J.; Webster, J.M. (1999). Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology*. 1, 457-469.
- Islas-López, M-A.; Sanjuan-Galindo, R.; Rodríguez-Hernández, A-I.; Chavarria-Hernández, N. (2005). Monoxenic production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using culture media containing agave juice (aguamiel) from Mexican maguey-pulguero (*Agave* spp.). Effects of the contents of nitrogen, carbohydrates and fat on infective juvenile production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68, 91-97.
- Joyce, S.A.; Brachmann, A.O.; Glazer, I.; Lango, I.; Schwär, G.; Clarke, D.J.; Bode, H. (2008). Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. *Angewandte Chemie*. 47, 1942-1945.
- Katsuyama, Y.; Funa, N.; Horinouch, S. (2008). Precursor-directed biosynthesis of stilbene methyl esters in *Escherichia coli*. *Biochemistry Journal*. 10, 1286-1293.
- Kohno, T.; Togashi, K.; Fukamiya, N. (2007). The nematicidal activity and the structure-activity relationships of stilbenes. *Natural Products Research*. 21, 606-615.
- Kim, Y.H.; Kwon, H-S.; Kim, D. H.; Cho, H.J.; Lee, H.S.; Jun, J-G.; Park, J.H.Y.; Kim, J-K. (2008). Piceatannol, a stilbene present in grapes, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *International Immunopharmacology*. 12, 1695-1702.
- Kim, Y.; Ji, D.; Cho, S.; Park, Y. (2005). Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* share an inhibitory action against phospholipase A2 to induce host immunodepression. *Journal of Invertebrate Pathology*. 89, 258-264.
- McDaniel, R.; Thamchaipenet, A.; Gustafsson, C.; Fu, H.; Betlach, Me.; Betlach, Ma. ; Ashley, G. (1999). Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products. *PNAS*. 96, 1846-1851.
- Maynard-Smith, J. (1998) *Evolutionary Genetics* – 2ª. edição - Oxford University Press, UK. 285-297.
- Milstead, J.E. (1979). *Heterorhabditis bacteriophora* as a vector for introducing its associated bacterium into the hemocoel of *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 33:324-327.
- Monteiro, C.M.; Prata. M.C.; Furlong, J.; Faza. A.P.; Mendes, A.S.; Andaló, V.; Moino-Junior, A. (2010). *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 106, 821-826.
- Orhan, I.; Tosun, F.; Sener, B. (2008). Coumarin, anthraquinone and stilbene derivatives with anticholinesterase activity. *Z Naturforsch.* 63, 366-370.
- Ortiz-Urquiza, A.; Riveiro-Miranda, L.; Santiago-Álvarez, C.; Quesada-Moraga, E. (2010). Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*. No prelo.
- Pereault, R.J.; Whalon, M.E.; Alston, D.G. (2009). Field efficacy of entomopathogenic fungi and nematodes targeting caged last-instar plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in Michigan cherry and apple orchards. *Environmental Entomology*. 38, 1126-1134.
- Pereira, C. (1927). *Rhabditis hambletoni* n.sp. nema aparentemente semiparasito da broca do algodoeiro (*Gasterocercodes brasiliensis*). *Archivos do Instituto Biológico*. 8, 215-230.
- Poinar Jr, G.O. (1990). Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R.; Kaya, H.K. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, FL, USA, 23-60.
- Ridley, M. (2006) *Evolução* – 3ª. Edição – Artmed. 633-662.
- Stanley, D. (2006). Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annual Reviews Entomology*. 51, 25-44.
- Surh, J-Y. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*. 3, 768-780.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. 282, 2012-2018.
- Toledo, A.V.; de Remes Lenicov, A.M. ; Lopez-Lastra, C.C. (2010). Histopathology caused by the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, in the adult planthopper, *Peregrinus maidis*, a maize virus vector. *Journal of Insect Science*. 10:35.
- Waterfield, N.R.; Bowen, D.J.; Fetherson, J.D.; Perry, R.D.; French-Constant, R.H. (2001). The *tc* genes of *Photorhabdus*: a growing family. *Trends in Microbiology*. 9, 185-191.
- Waterfield, N. R.; Hares, M.; Yang, G.; Dowling, A.; French-Constant, R.H. (2005). Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. *Cellular Microbiology*. 7, 373-382.
- Wilkinson, P.; Waterfield, N.R.; Crossman, L.; Corton, C.; Sanchez-Contreras, M.; Vlisidou, I.; Barron, A.; Bignell, A.; Clark, L.; Ormond, D.; Mayho, M.; Bason, N.; Smith, F.; Simmonds, M.; Churcher, C.; Harris, D.; Thompson, N. R.; Quail, M.; Parkhill, J.; French-Constant, R.H. (2009). *BMC Genomics*. 10, 1-22.
- Willians, J.S.; Thomas, M.; Clarke, D.J. (2005). The gene *stIA* encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Photorhabdus luminescens* TT01. *Microbiology*. 151, 2543-2550.