

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PRISCILLA ALVES RIBEIRO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE NEMATOIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS

Monte Carmelo - MG

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PRISCILLA ALVES RIBEIRO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE NEMATOIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS

Trabalho de Conclusão apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo, como requisito necessário para a obtenção do grau de Engenheira Agrônoma.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina Silva Siquieroli

Monte Carmelo - MG

2018

PRISCILLA ALVES RIBEIRO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS

Trabalho de Conclusão apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo, como requisito necessário para a obtenção do grau de Engenheira Agrônoma.

Monte Carmelo, 13 de dezembro de 2018

Banca Examinadora

Prof^{ta}. Dr^a. Ana Carolina Silva Siquieroli
Orientadora

Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira
Membro da Banca

Prof^{ta}. Dr^a. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho
Membro da Banca

Monte Carmelo - MG

2018

SUMÁRIO

RESUMO	
1 INTRODUÇÃO.....	5
2 OBJETIVO.....	7
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
3.1 Nematoides entomopatogênicos no controle biológico de pragas.....	7
3.2 Caracterização molecular de nematoides entomopatogênicos.....	9
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1 Multiplicação dos isolados.....	11
4.2 Caracterização molecular.....	11
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
6 CONCLUSÃO.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) estão sendo cada vez mais estudados para o controle de pragas por possuírem boa capacidade de adaptação a novos ambientes e capacidade de se disseminar, em busca de um hospedeiro. Além disso, alguns produtos químicos apresentam sinergismo com NEP, possibilitando reduções na quantidade de produto aplicado, tempo e custo de aplicação. Estudos visando caracterizar a variabilidade genética dos isolados de NEPs estão aumentando à medida que o controle biológico vem se firmando como estratégia importante para a agricultura. As variações moleculares encontradas nas linhagens naturais dos NEPs estão permitindo a manutenção de isolados com características cada vez mais adequadas às condições específicas de cada aplicação, além de aproveitar a variabilidade natural para a seleção de indivíduos mais virulentos e resistentes. O objetivo do trabalho foi caracterizar molecularmente dois isolados de nematoides entomopatogênicos de potencial uso no controle biológico de pragas, obtidos do banco de entomopatógenos do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Monte Carmelo. As sequências de nucleotídeos obtidas dos isolados foram comparadas com as sequências de oito outras espécies do gênero *Heterorhabditis* depositadas no banco de dados Genbank, através do programa BLASTn. As identidades das sequências foram calculadas por meio do GenBank BLASTn, e as distâncias genéticas e a árvore filogenética foram calculadas utilizando o programa MrBayes v. 3.1.2. Para o alinhamento múltiplo foi utilizado o programa Clustal X. As sequências obtidas foram de 846 e 832 nucleotídeos de comprimento, referentes aos isolados MC01 e NEPET 11, respectivamente. A espécie semelhante mais próxima é *H. amazonensis* (DQ665222.1), com 95% e 94% de máxima identidade e com as maiores pontuações máximas, 1373 e 1349 bits, para MC01 e NEPET 11, respectivamente. A análise filogenética baseada nas sequências da região 18S do rDNA dos isolados de *Heterorhabditis* MC01 e NEPET 11 mostra a formação de um grupo monofilético com alto valor de PP (99,94%) compreendendo as espécies *H. amazonensis* (DQ665222.1), e os isolados MC01 e NEPET 11. Baseando-se nas técnicas moleculares empregadas neste trabalho, foi possível diagnosticar a espécie dos isolados MC01 e NEPET 11 como *H. amazonensis*.

Palavras-Chave: Controle biológico, NEPs, 18S rDNA.

1 INTRODUÇÃO

O termo entomopatogênico refere-se à capacidade de causar patogenicidade em insetos via liberação de toxinas ou outras substâncias de caráter inseticida (ALMENARA et al., 2012). Associados de modo específico e simbiótico a bactérias, em especial aos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, as quais são patogênicas aos insetos, alguns nematoides tornaram-se capazes de invadir e matar um grande número de espécies de insetos, caracterizando o hábito entomopatogênico (DELL'ACQUA, 2011), sendo utilizados em larga escala pelo homem na agricultura (GARCIA, 2006).

Os gêneros representativos de nematoides entomopatogênicos associados a bactérias são dois: *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) e *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae) (KAMITANI, 2010).

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae são agentes de controle biológico promissores e particularmente efetivos, quando aplicados a insetos que habitam ou passam parte do seu ciclo de vida no solo (DELL'ACQUA, 2011).

Vários aspectos favorecem o uso de NEPs no controle de pragas, como a boa capacidade de se locomoverem no solo à procura de hospedeiros para os quais são atraídos por diferencial no teor de CO₂ e, possivelmente, por componentes fecais; ou por terem uma extensa lista de hospedeiros, o que ajuda a sobrevivência em condições ambientais nem sempre favoráveis; ou ainda, pela possibilidade de multiplicação e armazenamento em laboratório antes de serem aplicados (GARCIA, 2006).

O uso indiscriminado de produtos fitossanitários na agricultura moderna tem ocasionado sérios problemas ambientais os quais afetam diretamente a biota e as ações dos potenciais inimigos naturais nas zonas de cultivo. Com isso, a busca por novos e menos impactantes mecanismos de controle de pragas, tornou-se frequente (MOLINA et al., 2005).

Os NEPs associados às bactérias simbióticas, representam um sistema único de controle biológico de insetos (MOLINA et al., 2005), causando septicemia e morte do hospedeiro em 24 a 48 horas (ANDALÓ et al., 2006).

O ciclo desses nematoides consiste na fase de ovo, quatro estádios juvenis e um estágio adulto. De acordo com Sáenz e López (2011) o JI penetra no inseto por meio de aberturas naturais (boca, ânus, espiráculos). Uma vez na hemocele do inseto, liberam as bactérias simbióticas, que se multiplicam e secretam toxinas e metabólitos secundários letais

ao inseto, promovendo a morte deste em até 48 horas. Essas bactérias produzem antibióticos os quais impedem o desenvolvimento de outras bactérias, além de pigmentos que conferem ao inseto hospedeiro já morto, coloração característica na cutícula (*Heterorhabditis*: coloração marrom-avermelhada com bioluminescência; *Steinernema*: coloração bronzeada sem bioluminescência) (ANDALÓ et al., 2006). As células bacterianas e os tecidos do hospedeiro funcionam como um meio rico para crescimento e reprodução de *Heterorhabditis*. Os nematóides podem desenvolver-se por duas ou três gerações dentro do hospedeiro e então emergem no solo em duas semanas. No gênero *Steinernema*, na primeira geração formam-se machos e fêmeas, enquanto no gênero *Heterorhabditis*, formam-se apenas fêmeas hermafroditas. A partir da segunda geração, formam-se machos e fêmeas (GARCIA, 2006).

O potencial do uso dos NEPs no controle biológico é conhecido em diferentes ordens de insetos e em diferentes cultivos agrícolas, a exemplo no controle das ninfas de cigarrinha e do bicudo da cana-de-açúcar (LEITE et al., 2005; GIOMETTI et al., 2011); da cochonilha da raiz em cafeeiro (ALVES et al., 2009); da lagarta da espiga do milho (ANDALÓ et al., 2010); da lagarta-elasma na cultura do milho (MAGNABOSCO, 2018); dentre outras pragas em demais culturas. No Brasil uma das iniciativas de sucesso foi o emprego de juvenis infectantes de *H. indica* no controle *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), uma praga da cultura do milho (GARCIA et al., 2008). Este processo de controle biológico pode ser uma ótima alternativa ao produtor no controle de pragas, uma vez que o uso dos nematoides tende a reduzir os custos e o consumo de agrotóxicos no campo.

Estudos visando caracterizar a variabilidade genética dos isolados de NEPs estão aumentando à medida que o controle biológico vem se firmando como estratégia importante para a agricultura. As variações moleculares encontradas nas linhagens naturais dos NEPs estão permitindo a manutenção de isolados com características cada vez mais adequadas às condições específicas de cada aplicação, além de aproveitar a variabilidade natural para a seleção de indivíduos mais virulentos e resistentes (ALMENARA et al., 2012).

Até 1980, estudos relacionados à taxonomia de NEPs eram confusos e as descrições de novas espécies eram duvidosas. Com a utilização de técnicas moleculares, na década de 1990, as identificações em nível de espécie começaram a tornarem-se mais confiáveis (DELL'ACQUA et al., 2013).

Para Minas (2012) o sequenciamento de DNA, no caso específico dos NEPs, é de extrema importância para a definição das espécies. O uso de marcadores moleculares permite discriminar posições taxonômicas específicas que atuam como ponto de partida na investigação da identidade de um nematoide cuja espécie não é definida.

Ao contrário da taxonomia descritiva, em que são necessários diversos indivíduos e estes devem estar bem preservados, considerando, também, o estágio de desenvolvimento, as técnicas moleculares conferem uma identificação rápida, precisa e altamente sensível, não estando sujeita às variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento do nematoide e a outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo (DELL'ACQUA et al., 2013).

Segundo Dolinski e Moino Jr (2006) o gênero *Heterorhabditis* encontra-se amplamente distribuído no mundo. No Brasil, amostragens de solo e isolamento de NEPs realizados em Rondônia, Amazonas, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, apontam uma maioria de isolados do gênero *Heterorhabditis*.

Andaló et al. (2006) descreveram *H. amazonensis* a partir de indivíduos coletados em uma área florestal da cidade de Benjamin Constant, no norte do estado do Amazonas, e em 2009, os autores identificaram duas populações de nematoides obtidas em Lavras, Minas Gerais, como sendo *H. amazonensis*. De modo semelhante, isolados de *Heterorhabditis* foram coletados em áreas de cultivo e de fragmentos de vegetação nativa na região de Monte Carmelo, em Minas Gerais, e em regiões do estado do Rio Grande do Sul, correspondendo aos isolados MC01 e NEPET 11, respectivamente.

2 OBJETIVO

Teve-se como objetivo caracterizar molecularmente dois isolados de nematoides entomopatogênicos de uso potencial no controle biológico de pragas, obtidos do banco de entomopatógenos do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Nematoides entomopatogênicos no controle biológico de pragas

Os NEPs estão sendo cada vez mais estudados para o controle de pragas por possuírem boa capacidade de adaptação a novos ambientes e capacidade de se disseminar, em busca de

um hospedeiro. A associação mutualística entre alguns nematoides e bactérias resulta em morte rápida dos insetos parasitados (FERRAZ, 1998). Além disso, alguns produtos químicos apresentam sinergismo com o nematoide, possibilitando reduções na quantidade de produto aplicado, tempo e custo de aplicação (KOPPENHÖFER; KAYA, 1998).

O uso dos NEPs nos sistemas agrícolas para controle de insetos tem crescido e com variações no grau de sucesso. Os nematoides no terceiro estágio infectivo (JI) podem viver livremente, procurando no solo um hospedeiro suscetível. Durante esse estágio os nematoides não se alimentam nem se multiplicam. Uma vez penetrando em um inseto hospedeiro, os nematoides liberam a bactéria simbiote, a qual em combinação com toxinas produzidas pelos nematoides mata o hospedeiro dentro de três dias. As bactérias e tecidos degradados do hospedeiro fornecem fontes de nutrientes para o desenvolvimento dos nematoides. Assim, eles passam duas gerações dentro do hospedeiro em um período de dez dias, dependendo da temperatura e do inóculo inicial (ADAMS; NGUYEN, 2002).

Desde a década de 1930 os NEPs são estudados e explorados para o controle de pragas agrícolas. No entanto, somente a partir dos anos 2000 é que os experimentos com NEPs e controle biológico de pragas e vetores ganharam impulso (ALMENARA et al., 2012).

A primeira espécie de NEPs encontrada no Brasil foi descrita por Pereira em 1937 e, até os anos 2000, esta era a única espécie descrita. Andaló et al. (2006) descreveram *Heterorhabditis amazonensis*. Dolinski et al. (2008), identificaram isolados de *H. baujardi* e *H. indica*. Todas as espécies isoladas na região Amazônica (ALMENARA, 2011).

O potencial do uso dos NEPs no controle biológico é conhecido em diferentes ordens de insetos e em diferentes cultivos agrícolas, com melhores resultados em insetos que possuem ao menos uma fase do seu desenvolvimento na superfície do solo ou em galerias (MAGNABOSCO, 2018).

No Brasil, um exemplo de sucesso do uso de NEPs como agente de controle biológico, foi descrito por Garcia et al. (2008) com o emprego de juvenis infectantes de *H. indica* no controle de lagarta de *S. frugiperda*.

A cultura do milho é atacada por inúmeras pragas, dentre as quais recebe destaque a lagarta de *S. frugiperda* de ocorrência em toda a safra, causando severas injúrias à cultura e levando a redução na produção. As pupas de *S. frugiperda* ficam protegidas no solo e estão relativamente seguras de inimigos naturais, no entanto, os nematoides entomopatogênicos por estarem amplamente difundidos no solo, as têm como alvo de fácil acesso. Diferentes trabalhos relatam o uso de NEPs para o controle de pré-pupa e pupa de *S. frugiperda* e *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho, atingindo altos

índices de mortalidade (FEASTER; STEINKRAUS, 1996; ANDALÓ et al., 2010; MERTZ, 2013).

O uso de NEPs está intimamente relacionado ao sucesso de programas de controle, devido à adaptação do nematoide ao ambiente e a especificidade ao inseto alvo (KAYA; GAUGLER, 1993; ANDALÓ et al., 2009), como o que ocorre com *S. scapterisci* Nguyen & Smart que é eficaz no controle de paquínhas e grilos, mas não é eficaz no controle de outros insetos-praga (NGUYEN e SMART, 1991). Assim, o uso de espécies nativas de nematoides pode ser eficaz quando utilizado sobre insetos específicos e que vivem no solo ou em ambientes críticos (KOPPENHOFER, 2000; ARTHURS et al., 2004).

Os nematoides podem ser aplicados através da pulverização ou mesmo por sistemas de irrigação por gotejamento ou dispersão (WENNEMANN et al., 2003; GARCIA et al., 2008), a fim de atingir as pupas no solo, visando à aplicação inundativa do patógeno na área; no entanto, após a aplicação, é possível verificar a permanência do nematoide no solo por longo período de tempo (NAVON et al., 2002), o que possibilita a mortalidade da praga por diversos anos de cultivo. Assim, o patógeno é liberado de forma inoculativa, o que reduz os custos com o controle da praga.

3.2 Caracterização molecular de nematoides entomopatogênicos

Nos últimos anos tem se intensificado os estudos relacionados à identificação e caracterização de NEPs, porém sua taxonomia ainda se mostra complexa, de modo que se torna cada vez mais difícil a identificação das espécies com base na identificação morfológica. Isto se deve porque a irregularidade observada nos dados morfológicos das fêmeas de primeira e segunda geração resulta principalmente de variações marcantes na qualidade e quantidade de nutrientes obtidos dos insetos parasitados (MINAS, 2012).

As técnicas de estudo do DNA diferem substancialmente quanto à complexidade, quantidade de amostra necessária, custo, tipo de informação gerada e aplicabilidade. Além disso, possuem a vantagem de ser um processo rápido e altamente sensível, não estão sujeitas a variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento do nematoide e a outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo (DELL'ACQUA, 2011).

A natureza repetitiva da organização dos genes do rDNA os tornaram alvos adequados para a amplificação do DNA por PCR e permitem estudos moleculares para a identificação

dos organismos. Os genes rDNA estão organizados em unidades que possuem sequências codificadoras altamente conservadas (18S, 5.8S e 28S) e sequências intercalares, que em geral variam dentro e entre populações (ITS1 e ITS2, e ETS) (ELDER; TURNER, 1995).

A técnica de amplificação do DNA ribossômico (rDNA) por reação da polimerase em cadeia (PCR) permite a amplificação de regiões específicas do DNA, como o espaço interno transcrito (ITS), a qual tem sequências intercalares que variam dentro e entre populações, localizado entre regiões altamente conservadas, como as regiões correspondentes aos genes 18S e 28S que também são alvos de estudos e servem como marcadores para comparação entre espécies diferentes (DELL'ACQUA, 2011).

A utilização de marcadores moleculares tem sido importante para a investigação taxonômica de um NEP, sendo a sequência do 18S do DNA ribossômico, o marcador mais popular para identificação de nematoides desconhecidos. Para as espécies dos gêneros de *Heterorhabditis* e *Steinernema* o marcador molecular de melhor representação é a sequência de DNA da região do espaço interno transcrito do gene ribossomal (ITS rDNA). Esse marcador apresenta variações substanciais entre as espécies de *Heterorhabditis* e *Steinernema*. Outro marcador que prova ser útil para a discriminação em nível da espécie são as regiões da subunidade 28S ribossomal (MINAS, 2012).

Perfis de fragmentos de rDNA restritos a região ITS ocorrem para várias espécies de *Heterorhabditis* e *Steinernema*, e podem ser facilmente gerados a partir das sequências ITS depositadas em bancos de dados públicos, como GenBank. Os padrões de bandas dos nematoides resultam da comparação com aqueles previstos a partir de espécies previamente analisadas. Quando idênticos, sugerem que pertençam à mesma espécie, até que uma análise mais aprofundada indique o contrário (MINAS, 2012).

Adams et al. (1998) sugeriram a utilização da região do ITS1 dos genes ribossômicos do gênero *Heterorhabditis* como uma fonte confiável de caracteres ortólogos para estabelecimento de relações de parentesco entre táxons próximos. Dolinski et al. (2008) diferenciaram isolados de nematoides entomopatogênicos, muito semelhantes entre si do ponto de vista morfológico e próximos taxonomicamente, empregando o sequenciamento das regiões variáveis dos ITS1 e ITS2. Assim, o sinal filogenético nas sequências de rDNA permite a reconstrução da filogenia dos nematoides, e conseqüentemente, a identificação até o nível de espécie (HOLTERMANN, 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Multiplicação dos isolados

Os dois isolados de nematoides entomopatogênicos analisados (MC01 e NEPET 11) foram obtidos do banco de entomopatógenos do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo. O isolado MC01 foi coletado em áreas de cultivo e de fragmentos de vegetação nativa na região de Monte Carmelo, Minas Gerais, e o isolado NEPET 11 em regiões do estado do Rio Grande do Sul.

Para obtenção de fêmeas de 1ª geração foi realizada a multiplicação a partir dos nematoides contidos nas suspensões armazenadas em câmara climatizada B.O.D. a $16 \pm 2^\circ\text{C}$, inoculando 1 mL da suspensão em um total de 10 larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), criadas de acordo com metodologia de Potrich et al. (2007).

Após inoculação, as larvas foram incubadas em B.O.D a temperatura constante de 26°C por tempo necessário para ocorrer a infecção, morte das larvas, e estas, apresentarem o sintoma da infecção. A avaliação da mortalidade das larvas e sintoma da infecção pelo nematoide foi realizada ao 7º e 14º dia de incubação.

Fêmeas hermafroditas dos isolados foram obtidas por meio do corte e abertura das larvas mortas de *T. molitor* imersas em solução de cloreto de sódio 0,8% (NaCl 0,8%), e individualizadas.

4.2 Caracterização molecular

Para extração do DNA dos isolados MC01 e NEPET 11 foram maceradas três fêmeas hermafroditas em 25µL de suspensão que provoca lise, composta por proteinase K 800 µg mL⁻¹, β- mercaptoetanol 1% (v/v), NaCl 0,2M e Tris HCl pH 8,0 0,2M; diluída em 25µL de água destilada. As amostras foram levadas ao termociclador Amplitherm Thermal Cycles, incubadas a 65°C por 2 h e a 99°C por 5 minutos. Após resfriamento, foram mantidas à -20°C .

Em seguida as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 10 mM de dNTP; 10 mM de cada primer (18S e 26S); 5 unidades de Taq DNA polimerase; tampão de PCR 10X; e DNA genômico (84,6 ng do isolado MC01 e 64,9 ng do isolado NEPET 11). O fragmento de DNA correspondente à região ITS foi amplificado com os primers 18S: 5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3' (*forward*) e 26S: 5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3' (*reverse*).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Amplitherm Thermal Cyclers® nas seguintes condições: 94 °C por 7 minutos, seguido de 35 ciclos de 60 segundos a 94 °C, 60 segundos a 55 °C e 60 segundos a 72 °C, e uma etapa final para extensão de 10 minutos a 72 °C.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose (1%) em tampão TBE 1X (Tris base 1M, Ácido Bórico e EDTA 500 mM), utilizando corante fluorescente para DNA Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia) na concentração 1:10. Para estimar o tamanho dos fragmentos foi utilizado marcador Norgen Biotek de 100 pares de base. Os géis foram submetidos à luz ultravioleta em um sistema de fotodocumentação de géis L-PIX (Loccus Biotecnologia) para visualização e análise.

Os produtos da PCR foram sequenciados em equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando-se 60 ng de DNA-molde e 4,5 pmol do primer 18S usado na amplificação. O sequenciamento foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares, Alvorada, RS.

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de oito outras espécies do gênero *Heterorhabditis* depositadas no banco de dados Genbank, National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponível online no website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> através do programa BLASTn. Estas incluem sequências dos genes rRNA 18S, 5.8S e 28S, e das regiões ITS1 e ITS2 (com números de acesso correspondentes) de: *H. amazonensis* (DQ665222.1); *H. floridensis* (DQ372922.1); *H. taylorae* (EF043443.1); *H. mexicana* (EF043444.1); *H. sonorensis* (KC633187.1); *H. baujardi* (MF535519.1); *H. indica* (MG914076.1); e *H. noenieputensis* (KY024497.1).

As identidades das sequências foram calculadas por meio do GenBank BLASTn, e para as distâncias genéticas e árvore filogenética foi realizada análise bayesiana utilizando o programa MrBayes v. 3.1.2. (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Para o alinhamento múltiplo foi utilizado o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação da região ITS do rDNA dos isolados de *Heterorhabditis* produziu fragmentos com tamanhos de ~1100 pares de base (pb) (Figura 1). Pelas análises do programa BLASTn, as sequências obtidas foram de 846 e 832 nucleotídeos de comprimento, referentes aos isolados MC01 e NEPET 11, respectivamente.

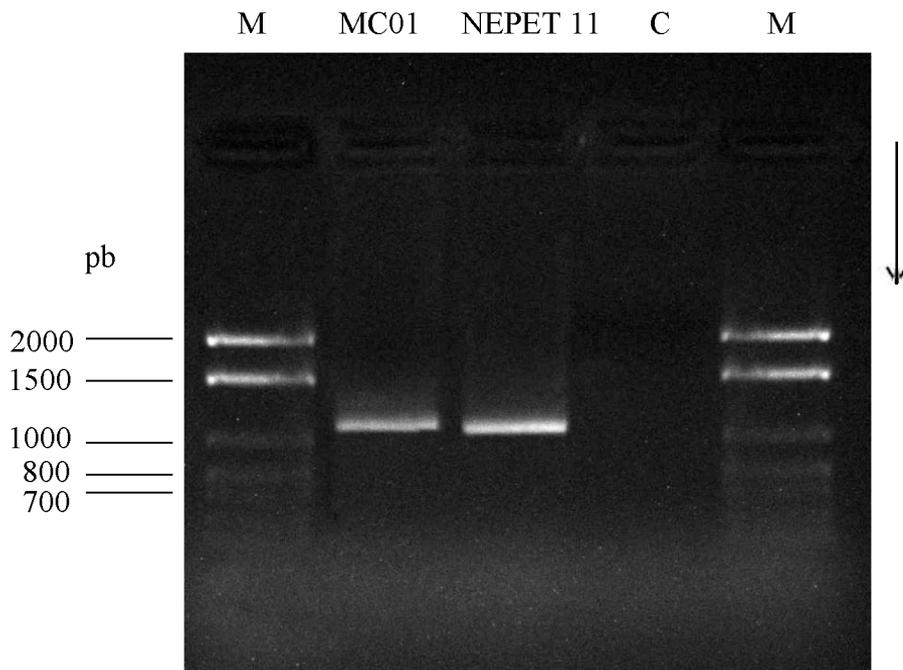


Figura 1 – Fragmentos amplificados por PCR da região ITS do rDNA 18S de isolados de *Heterorhabditis*. M - marcador molecular de 100 pb; MC01 e NEPET 11 - isolados de *Heterorhabditis*; C - controle. A seta indica a direção da corrida.

As porcentagens de identidade do alinhamento entre as sequências dos isolados de *Heterorhabditis* estudados e aquelas depositadas no GenBank (Tabela 1) indicam que a espécie semelhante mais próxima é *H. amazonensis* (DQ665222.1), com 95% e 94% de máxima identidade e com as maiores pontuações máximas, 1373 e 1349 bits, para MC01 e NEPET 11, respectivamente. As espécies mais divergentes são *H. indica* (MG914076.1) e *H. noenieputensis* (KY024497.1), com identidades de 87% e 86%, respectivamente.

Tabela 1 - Valores de máxima identidade (%) e pontuação máxima (bits) entre as sequências de nucleotídeos dos isolados de *Heterorhabditis* estudados e as depositadas no GenBank, pelo programa BLASTn.

Espécie GenBank	Nº de Acesso	Máxima Identidade		Pontuação Máxima	
		(%)		(bits)	
		MC01	NEPET 11	MC01	NEPET 11
<i>H. amazonensis</i>	DQ665222.1	95	94	1373	1349
<i>H. floridensis</i>	DQ372922.1	93	93	1288	1264
<i>H. taysearae</i>	EF043443.1	92	92	1262	1238
<i>H. mexicana</i>	EF043444.1	92	92	1256	1238
<i>H. sonorensis</i>	KC633187.1	92	92	1240	1221
<i>H. baujardi</i>	MF535519.1	94	93	1151	1094
<i>H. indica</i>	MG914076.1	87	87	859	880
<i>H. noenieputensis</i>	KY024497.1	86	86	846	863

A análise filogenética por inferência bayesiana baseada nas sequências da região 18S das espécies do gênero *Heterorhabditis* depositadas no GenBank (Tabela 1) e dos isolados MC01 e NEPET 11, indica que os isolados tratam-se de grupos irmãos entre si, e ambos são, conjuntamente, o grupo irmão de *H. amazonensis* (DQ665222.1) com grande suporte estatístico pelos valores de probabilidade posterior (PP) dados em porcentagem (%) (Figura 2).

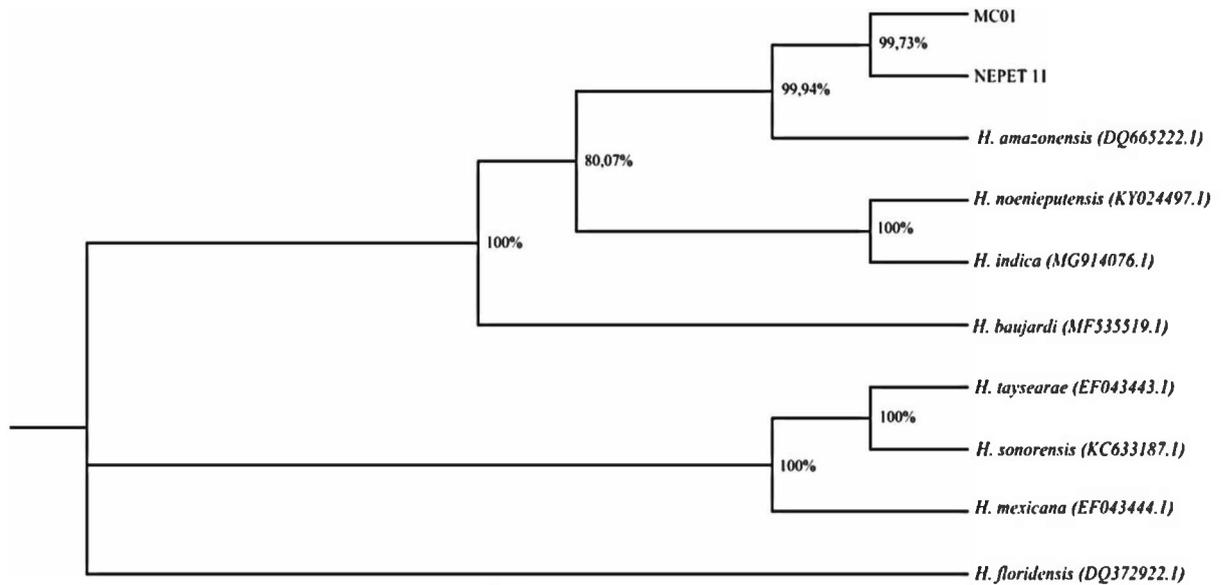


Figura 2 - Árvore filogenética bayesiana de espécies de nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* construída a partir das sequências da região 18S do rDNA. Número de acesso das espécies de *Heterorhabditis* depositadas no Genbank entre parênteses. Os números fornecidos nos nós de ramificações são valores de probabilidade posterior (PP) dados em porcentagem (%).

Na árvore filogenética (Figura 2), observa-se a formação de um grupo monofilético com alto valor de PP (99,94%) compreendendo as espécies *H. amazonensis* (DQ665222.1) e os isolados MC01 e NEPET 11.

Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser confirmados pelo alinhamento múltiplo da sequência de *H. amazonensis* (DQ665222.1) com as sequências obtidas dos isolados MC01 e NEPET 11 (Figura 3).

```

MC01      TC GAGAGGASTGGGAAATGCTATATCSGGRC TTTCGGGCTCTGGTATGAT
DQ665222.1 TC GAGAAGAGTGGGGAC TGCTATATCSGGGCTTTCGGGCTCTGGTATGAT
NEPET     TC GAGAAGAGTGGGGAC TGCTATATCSGGRC TTTCGGGCTCTGGTATGAT
.....

MC01      GGA AACCATTTTAATCTAATGGCTTGAACCGGGCGAAAGTCGTAACAAG
DQ665222.1 GGA AACCATTTTAATCGCAATGGCTTGAACCGGGCGAAAGTCGTAACAAG
NEPET     GGA AACCATTTTAATCGCAATGGCTTGAACCGGGCGAAAGTCGTAACAAG
.....

MC01      GTATCTGTARGTGAACCTGCARATGGATCATCGTCGATACCTTATARGAA
DQ665222.1 GTATCTGTAGGTGAACCTGCARATGGATCATCGTCGATACCTTATAGGTA
NEPET     GTATCTGTAGGTGAACCTGCARATGGATCATCGTCGATACCTTATAGKTA
.....

MC01      TATGCTTTGATCACAGATGCTGATAATCATGGAATCAAGCTTGTTCTTG
DQ665222.1 TATGCTTTGATCACAGATGCTGATAATCATGGAATCAAGCTTGTTCTTG
NEPET     TATGCTTTGATCMCSASATGCTGATAATCATGGAATCAAGCTTGTTCTTG
.....

MC01      ATTTCCGTCGGTGTCTCACCCWTC TAACCTCTCGGASAGGTGTCTATTC
DQ665222.1 ATTTCCGTCGGTGTCTCACCCWTC TAAGCTCTCGGAGAGGTGTCTATTC
NEPET     ATTTCCGTCGGTGTCTCACCCWTC TAASCCTCTCGGAGAGGTGTCTATTC
.....

MC01      TTGATTGGAGCCGATTTGAGTGACGGCAATGATAATTGGGTATGCTCCCC
DQ665222.1 TTGATTGGAGCCGATTTGAGTGACGGCAATGATAATTGGGTATGCTCCCC
NEPET     TTGATTGGAGCCGATTTGAGTGACGGCAATGATAATTGGGTATGCTCCCC
.....

MC01      GTAAGGGTAGAGCATAAGAC TTAATGAGCTGATCTASGCTGTGCGCTCA
DQ665222.1 GTAAGGGTAGAGCATAAGAC TTAATGAGCTGATCTAGGCTGTGCGCTCA
NEPET     GTAAGGGTAGAGCATAARAC TTAATGAGCTGATCTAGGTSGTGCGCTCA
.....

MC01      CCAAAAACCCATCKATAGTTGGTGGCTAARTGATGAGACTTTGTCAAAAT
DQ665222.1 CCAAAAACCCATCGATAGTTGGTGGCTAAGTGTGAGACTTTGTCAAAAT
NEPET     CCAAAAACCCATCKATAGTTGGTGGCTAARTGATGAGACTTTGTCAAAAT
.....

MC01      CRC TAATCTGCTATGCGGGGAGCC TTAATGAGTTGTTCTGTGCTCAC TTGAC
DQ665222.1 CRC TAATCTGCTATGCGGGGAGCC TTAATGAGTTGTTCTGTGCTCAC TTGAC
NEPET     CRC TAATCTGCTATGCGGGGAGCC TTAATGAGTTGTTCTGTGCTCAC TTGAC
.....

MC01      CGACACAACCGCCAGTATCGGTAAATCTCTCCCAATTAAC TTGTTTCTA
DQ665222.1 CGACACAACCGCCAGTATCGGTAAATCTCTCCCAATTAAC TTGTTTCTA
NEPET     CGACACAACCGCCAGTATCGGTAAATCTCTCCCAATTAAC TTGTTTCTA
.....

MC01      GTA AAGGC TATTGAGTAGTTGTGGAACATTAKCCTTAKCGATGGATCGGT
DQ665222.1 GTA AAGGC TATTGAGTAGTTGTGGAACATTAGCCTTAGCGATGGATCGGT
NEPET     RTA AAGGC TATTGAGTAGTTGTGGAAMATTAKCCTTAKCRATGGATCGGT
.....

MC01      TGATTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCAAGCTGCGTTATTTGCCACGAA
DQ665222.1 TGATTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCAAGCTGCGTTATTTGCCACGAA
NEPET     TGATTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCAAGCTGCGTTATTTGCCACGAA
.....

MC01      TTGCAKACGCTTAGAGTGGTGAATTTTGAACGRCAGCGCCGTTGGGTT
DQ665222.1 TTGCAKACGCTTAGAGTGGTGAATTTTGAACGRCAGCGCCGTTGGGTT
NEPET     TTGCAKACGCTTAKAGTGGTGAATTTTGAACGRCAGCGCCGTTGGGTT
.....

MC01      TTCCCTTCGGCACGCTCGGCTCASGGTTGTTAATAGACTTCGGTATTGC
DQ665222.1 TTCCCTTCGGCACGCTCGGCTCASGGTTGTTAATAGACTTCGGTATTGC
NEPET     TTCCCTTCGGCACGCTCGGCTCASGGTTGTTAATAGACTTCGGTATTGC
.....

MC01      TTGGAAGGC GGCRMKACCGTGAACCARACRGTGATAGTGCTAAATTGYG
DQ665222.1 TTGGAAGGC GGCAATACCGTGAACCAACGGTGATAGTGCTAAATTGTG
NEPET     TTGKAAGGYGGCRATACCSTGAACCAAGACRGTGATAGTGCTAAARTGYG
.....

MC01      -TGCA TGCCCCGTTACAGGGGAGAAATGGTGGAYAAATGAASTTCTCTTAA
DQ665222.1 GTGCATGCCCCGTTACAGGGGAGAAATGGTGGTAAATGAAC TTTCTCTTAA
NEPET     GTGCATGCCCCGTTACATGGGAGAAATGGTGGATYAATGAASTTCTCTTAA
.....

MC01      AGMYCGA-SAGTAKTACGCTTACCTTATGGATRTGCATGTATGAA----
DQ665222.1 AGCCGAGAAAGTATTAGGTTTACCTTATGGATRTGCATGTATGAAATA
NEPET     GACCGGA-SAGTAGTACGYTTACCTTAT-----
.....

```

Figura 3 - Alinhamento seqüências MC01, NEPET e *H. amazonensis* (DQ665222.1) obtido pelo programa ClustalX.

Andaló et al. (2006), ao descreverem a espécie *H. amazonensis*, observaram que as relações filogenéticas da região ITS da espécie, juntamente com as espécies *H. baujardi*, *H. floridensis*, *H. indica* e *H. mexicana*, compreendem um grupo monofilético chamado de grupo indica, em que *H. indica* é um grupo irmão do grupo formado por *H. amazonensis*, *H. baujardi*, *H. mexicana* e *H. floridensis*, e *H. amazonensis* é um grupo irmão do grupo formado por *H. baujardi*, *H. floridensis* e *H. mexicana*.

A análise filogenética da região 18S do rDNA, construída no presente trabalho, apresentou semelhanças com as análises filogenéticas conduzidas por Andaló et al. (2006). As espécies *H. baujardi*, *H. indica* e *H. amazonensis*, que fazem parte do grupo monofilético indica, descrito pelos autores; no presente trabalho, também formaram um grupo monofilético, com PP de 100%, compreendendo *H. baujardi*, *H. indica*, *H. amazonensis*, *H. noenieputensis*, MC01 e NEPET 11 (Figura 2).

Embora os valores de identidade gênica das sequências de nucleotídeos dos isolados MC01 e NEPET 11 e as depositadas no GenBank para o gênero *Heterorhabditis*, calculados pelo programa BLASTn, apontam *H. indica* (MG914076.1) e *H. noenieputensis* (KY024497.1) como as espécies mais distantes geneticamente dos isolados estudados (Tabela 1); pela análise bayesiana, *H. indica* (MG914076.1) e *H. noenieputensis* (KY024497.1) formam grupos irmãos, com PP de 80,07%, do grupo composto por *H. amazonensis* (DQ665222.1), MC01 e NEPET 11 (Figura 2).

Essa divergência em relação à proximidade das espécies *H. indica* (MG914076.1) e *H. noenieputensis* (KY024497.1) aos isolados estudados, pode servir como parâmetros comparativos da confiabilidade dos diferentes métodos empregados para estudo de caracterização molecular de indivíduos.

Segundo Verli (2014), o alinhamento das sequências de nucleotídeos, além de ser o primeiro passo, é um importante ponto para a análise filogenética, sendo requerido por todos os métodos para a construção da árvore. Quando preciso, garante maior confiabilidade nas análises posteriores.

Diante disto, Ono, Chiari e Pereira (2014) explicam que embora o programa BLASTn forneça um parâmetro de confiança (valores de identidade) que permite avaliar a significância das diferenças entre uma sequência de nucleotídeos obtida e aquelas depositadas em um banco de dados; o programa realiza alinhamentos apenas de locais específicos da sequência. Dessa forma, para fins de uma caracterização refinada, torna-se necessário o uso de programas que realizem um alinhamento global, considerando o comprimento total da sequência, tais como os programas de alinhamentos múltiplos, a exemplo do Clustal X.

Para Marouelli (2009) a análise filogenética representa uma hipótese das relações de ancestralidade comum entre grupos, inferida a partir de caracteres tais como morfológicos, fisiológicos, moleculares. A ideia de usar dados moleculares na inferência filogenética sugere que esta pode ser deduzida a partir de um modelo de substituições de nucleotídeos, que ocorrem em uma taxa proporcional à velocidade em que nucleotídeos homólogos divergem a partir de uma ancestral comum. A quantidade de informação fornecida pelo DNA é enorme, pois cada par de bases em uma sequência de nucleotídeo é considerado um caráter separado.

Segundo Dolinski e Moino Jr (2006) o gênero *Heterorhabditis* encontra-se amplamente distribuído no mundo. No Brasil, amostragens de solo e isolamento de NEPs realizados em Rondônia, Amazonas, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, apontam uma maioria de isolados do gênero *Heterorhabditis*. No entanto, Dell'Acqua (2011) afirma que a diversidade de espécies do gênero é pouco conhecida, comparada ao gênero *Steinernema*, para o qual já foram descritas mais de 60 espécies ao redor do mundo, enquanto pouco mais de 14 espécies foram descritas como pertencentes ao gênero *Heterorhabditis*. Essa baixa diversidade genética pode estar relacionada, entre outros fatores, a reprodução dos nematoides, que, para *Heterorhabditis*, ocorre por partenogênese na primeira geração, podendo levar a uma conservação genética e menor diversidade de espécies. Magnabosco (2018) aponta que os nematoides do gênero *Heterorhabditis* apresentam maior abundância em regiões tropicais e subtropicais, podendo ser encontrados também em regiões temperadas, porém, são poucos os estudos a respeito da diversidade genética destes nematoides em zonas tropicais.

Nesse sentido, os trabalhos de caracterização molecular destes indivíduos possibilitam determinar variações encontradas nas linhagens naturais dos NEPs, e assim permitir a manutenção de isolados com características cada vez mais adequadas às condições ambientais e condições de uso destes, além de aproveitar a variabilidade natural para a seleção de indivíduos mais virulentos e resistentes (ALMENARA et al., 2012).

6 CONCLUSÃO

As técnicas moleculares empregadas permitiram a caracterização molecular de dois isolados de nematoides entomopatogênicos do banco de entomopatógenos do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Uberlândia, campus Monte Carmelo. Baseando-se nessas técnicas, foi possível identificar a espécie dos isolados MC01 e NEPET 11 como *H. amazonensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, B. J. Species concepts and the evolutionary paradigm in modern nematology. **Journal of Nematology**, v. 30, n. 1, p.211-998.
- ADAMS, B.J.; NGUYEN, K.B. **Taxonomy and systematics**. In: GAUGLER, R. (Ed.). Entomopathogenic nematology. New Jersey: Rutgers University, 2002. p.1-34.
- ALMERARA, D.P.; NEVES, M.R.C.; KAMITANI, F.L.; WINTER, C.E. Nematoides entomopatogênicos: as duas faces de uma simbiose. **Revista da Biologia**. v.6, p. 1-6, 2011.
- ALMENARA, D.P.; ROSSI, C.; NEVES, M.R.C.; WINTER, C. E. **Nematoides Entomopatogênicos**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT), 2012. 40p.
- ALVES, V. S. et al. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a cochonilha da raiz do cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, Lavras, v. 76, n. 1, p.67-73, 2009.
- ANDALÓ, V.; NGUYEN, K. ; MOINO JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology**, v. 8, p.853-867, 2006.
- ANDALÓ, V.; MOREIRA, G.F.; MOINO JR, A. Studies of two new populations of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematropica**, v.39, p.199-211, 2009.
- ANDALÓ, V.; SANTOS, V.; MOREIRA, G.F.; MOREIRA, C.C.; MOINO JR, A. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. **Ciência Rural**, v.40, p.1860-1866, 2010.
- ARTHURS, S.; HEINZ, K.M.; PRASIFKA, J.R. An analysis of using entomopathogenic nematodes against above-ground pests. **Bulletin of Entomological Research**, v.94, p.297-306, 2004.
- DELL'ACQUA, R. **Identificação molecular e morfométrica de nematoides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) e eficiência de *Heterorhabditis* spp. no controle de *Bradysia* sp. (Diptera: Sciaridae) em cultivo protegido de crisântemo**. 2011.--. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, Instituto Biológico, São Paulo, 2011.
- DELL'ACQUA, R.; TOMAZINI, M.D.O.; HARAKAVA, R.; OLIVEIRA, C.M.G.; ROSA, J.M.O.; LEITE, L.G. Caracterização molecular de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) dos estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Nematologia Brasileira**, v. 37, p. 66-74, 2013.
- DOLINSKI, C.; KAMITANI, F.L.; MACHADO, I.R.; WINTER, C.E. Molecular and morphological characterization of *Heterorhabditid* entomopathogenic nematodes from the

tropical rainforest in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.2, p. 150-159, 2008.

DOLINSKI, C.; MOINO Jr. A. Utilização de nematoides entomopatogênicos nativos ou exóticos: o perigo das introduções. **Nematologia Brasileira**. v.30. n.2, p. 139-149, 2006.

ELDER, J.F., Jr.; TURNER, B.J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in Eukaryotes. **The Quarterly Review of Biology**. v.70, p. 297-320, 1995.

FEASTER, M.A.; STEINKRAUS, D.C. Inundative biological control of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema riobravise* (Rhabditida: Steinernematidae). **Biological Control**, v.7, p.38-43, 1996.

FERRAZ, L.C.C.B. **Nematóides entomopatogênicos**. In: ALVES, S.B. (Ed.). Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.541-569.

GARCIA, L.C. **Avaliação de tecnologias de aplicação de nematóides entomopatogênicos visando o controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho**. 2006. v, 55 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2006.

GARCIA, L.C.; RAETANO, C.G.; LEITE, L.G. Tecnologia de aplicação para os nematóides *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) para controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. **Neotropical Entomology**, v.37, n.3, p.305- 311, 2008.

GIOMETTI, F. H. C. et al. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera). **Bragantia**, v. 70, n. 1, p. 81-86, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052011000100013>

HOLTERMAN, M.; WURFF, A.V.D.; ELSEN, S.V.D.; MEGEN, H.V.; BONGERS, T.; HOLOVACHOV, O.; BAKKER J.; HELDER. J. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematode and accelerated evolution toward crown clades. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, p. 1792-1800, 2006.

KAMITANI, Fernando Luiz. **Caracterização molecular de isolados de nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis* spp. e seus simbiosites, *Photorhabdus* spp., provenientes de Monte Negro, RO**. 2010. 110 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro, Parasitologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

KAYA, H.K.; GAUGLER R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, v.38, p.181-206, 1993.

KOPPENHOFER, A.M. Nematodes. In: LACEY, L.A.; KAYA, H. K. (Eds.). **Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.283-301, 2000.

KOPPENHÖFER, A.M.; KAYA, H.K. Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to white grub (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Economic Entomology**, v.91, n.3, p.618-623, 1998.

LEITE, L. G. et al. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis sp.* against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 785-790, 2005.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000500010>

MAGNABOSCO, M.E.B. **Nematoides entomopatogênicos visando o controle de *Elasmopalpus lignosellus* na cultura do milho**. 2018. 89f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

MAROUELLI, L.P. **Análise filogenética de acessos do gênero *Heliconia* L. (Heliconiaceae) utilizando marcadores moleculares**. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MERTZ, N.R. **Interações entre nematoides entomopatogênicos, o predador *Calosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae) e espécies vegetais utilizadas na diversificação agrícola para o controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)**. 2013. 138 f. Tese (Doutorado) – Área de concentração em Entomologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

MINAS, R.R. **Caracterização biológica de uma linhagem de nematoide entomopatogênico visando o controle do gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii*) em dois sistemas de cultivo**. 2012. 138 f. Tese (Doutorado) - Curso de Produção Vegetal, Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2012.

MOLINA et al. Patogenicidade, multiplicação e biologia de isolados nativos de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae) provenientes de Lavras, MG. **Nematologia Brasileira**, Lavras, v. 29, n. 1, p.25-30, mar. 2005.

NAVON, A.; NAGALAKSHMI, V.K.; LEVSKI, S., SALAME, L.; GLAZER, I. Effectiveness of entomopathogenic nematodes in an alginate gel formulation against lepidopterous pests. **Biocontrol Science and Technology**, v.12, p.737-746, 2002.

NGUYEN, K.B.; SMART JR., G.C. Pathogenicity of *Steinernema scapterisci* to selected invertebrates. **Journal of Nematology**, v.23, n.7-11, 1991.

ONO, R.Y.; CHIARI, L.; PEREIRA, M. Análise e comparação filogenética de expansinas presentes em *Urochloa decumbens* cv *Basilick*. In: ENCONTRO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO; ENEPE UFGD, 8.; EPEX UEMS, 5., 2014. Dourados. **Anais...** Dourados: ENEPEX, 2014.

POTRICH, T.D.; LORINI, I.; VOSS, M.; STEFFENS, M.C.S.; PAVANI, D.P. Metodologia de criação de *Tenebrio molitor* em laboratório para obtenção de larvas. **Documentos online**, 82, Embrapa – Trigo, Passo Fundo, RS, Brazil, 2007.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572–1574, 2003.

SÁENZ, A.A.; LÓPEZ, J.C.N. Ciclo de vida y patogenicidad del aislamiento nativo *Heterorhabditis* sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v.37, p.43-47, 2011.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4876-4882, 1997.

VERLI, Hugo. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1ed. São Paulo: Editora Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2014. vol.1.

WENNEMANN, L.; CONE, W.W.; WRIGHT, L.C.; PEREZ, J.; CONANT, M.M. Distribution patterns of entomopathogenic nematodes applied through drip irrigation systems. **Journal of Economic Entomology**, v.26, p. 287-291, 2003.