

**ASPECTOS DE *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (RHABDITIDA:
HETERORHABDITIDAE) RELACIONADOS À CITOGÊNÉTICA, À
EMBRIOGÊNESE E AO COMPORTAMENTO SEXUAL**

INÊS RIBEIRO MACHADO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MARÇO – 2012

**ASPECTOS DE *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (RHABDITIDA:
HETERORHABDITIDAE) RELACIONADOS À CITOGÊNÉTICA, À
EMBRIOGÊNESE E AO COMPORTAMENTO SEXUAL**

INÊS RIBEIRO MACHADO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para a obtenção
do título de Doutora em Produção Vegetal.

Orientadora: Cláudia de Melo Dolinski

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MARÇO – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 000/2012

Machado, Inês Ribeiro

Aspectos de *heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae) relacionados à citogenética, embriogênese e comportamento sexual / Inês Ribeiro Machado. – 2012.
117 f. : il.

Orientador: Cláudia de Melo Dolinski.

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2012.

Bibliografia: f. 86 – 117.

1. Cópula 2. Divisão celular 3. Cariotipagem 4. Rhabditida 5. Biologia I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 592.57

**ASPECTOS DE *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (RHABDITIDA:
HETERORHABDITIDAE) RELACIONADOS À CITOGÊNÉTICA, À
EMBRIOGÊNESE E AO COMPORTAMENTO SEXUAL**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

Aprovada em 8 de março de 2012.

Comissão Examinadora:

Prof. Carlos Winter (Doutor em Ciências Biológicas) – USP

Prof^a Telma Nair Santana Pereira (Ph.D em Melhoramento de Plantas) – UENF

Prof. Ricardo Moreira de Souza (Ph.D. em Fitopatologia) – UENF

Prof^a Claudia Dolinski (Ph.D. em Fitopatologia) – UENF
Orientadora

DEDICO E OFEREÇO

A Deus, pela Sua Onipresença na minha vida e principalmente durante a conquista dos resultados desta tese;

E aos meus pais: Nédia América R. Esteves e Ignácio Cardoso Machado, pelo incentivo e apoio diários em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

À minha família, pelo apoio, confiança e compreensão,

A UENF, pela oportunidade de realização do curso,

Aos meus orientadores, Ricardo e Cláudia, pela amizade, confiança no meu trabalho e orientação dadas durante todo meu trajeto na pesquisa desde a Iniciação Científica. Os meus sinceros agradecimentos por cada ensinamento passado ao longo desses anos que me tornaram a cientista e profissional que sou;

A CAPES, pela concessão da bolsa;

A FAPERJ, pela concessão da bolsa Doutorado Sanduíche que me possibilitou terminar os trabalhos da tese e, além disso, me ajudou a crescer ainda mais como profissional;

Aos professores das disciplinas cursadas, pelos conhecimentos transmitidos;

Aos colegas do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF);

A Liliana Parente pelos mais de 10 anos de amizade e cumplicidade durante a nossa caminhada na UENF;

A Ramon Santos de Minas pela amizade, apoio e cumplicidade durante todo o curso;

A Rose Emília de Queiroz pela amizade e apoio dedicados durante o Doutorado Sanduíche em Portugal;

A Graziela Silveira, pela amizade recente, mas sempre constante no meu dia-a-dia, por seu apoio incondicional e carinho;

A Rose, Tchulas, Clóvis e Rita, minha “família” em Portugal, por ter tornado minha “caminhada” menos difícil longe de meu país e de minha cultura;

Aos amigos e colegas da Nematologia: Thiago, Carla, Vicente, Denise, Guilherme, Anália, Felipe, Ramon, Renata, Alexandre, Rogério, Rafael, Livia, Liliana e Priscila, Lucas e Daniel;

Aos professores: Carlos Winter (USP), Flávio Lara (FIOCRUZ) e Nelson Simões (UAC-PT), pela contribuição primordial nos trabalhos dessa tese;

Ao grupo de pesquisa do CIRN (Centro de Investigação e Recursos Naturais) na Universidade dos Açores em Portugal: Vera, Mafalda, Alexandra, Duarte, Mário, Prof^a Carla e Bala pela convivência e amizade;

Às minhas amigas de academia e UENF, que se tornaram muito presentes em minha vida e que tornam minha caminhada sempre menos “dura”: Gleice Lima e Graziela Silveira, Shênia Silva e Suelen Alvarenga, Liliana Parente Ribeiro;

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
1-Introdução.....	1
2- Revisão de Literatura.....	4
3- Trabalhos.....	40
Characterization of chromosome number of the entomopathogenic nematode <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae),.....	40
Abstract	41
Introduction.....	42
Materials and Methods.....	44
Results and Discussion.....	44
References.....	47
Early embryogenesis of <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 from the Amazonian rainforest in Monte Negro-RO.....	50
Abstract.....	50

Introduction.....	52
Materials and Methods.....	54
Results and Discussion.....	55
References.....	61
Mating behavior and pheromone detection studies in an <i>in vitro</i> culture of <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae).....	65
Abstract.....	65
Introduction.....	67
Material and Methods.....	68
Results.....	71
Discussion.....	75
References.....	80
4-Resumo e conclusões.....	85
5- Referências Bibliográficas.....	86

RESUMO

MACHADO, Inês Ribeiro; D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2012. Aspectos biológicos de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae) relacionados à citogenética, à embriogênese e ao comportamento sexual. Orientadora: Claudia de Melo Dolinski. Coorientador: Carlos Winter.

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são usados no controle biológico de diversos insetos-praga do solo. No entanto, é de grande importância o conhecimento sobre a biologia da espécie de nematoide justamente para que se possa haver uma otimização no controle biológico que quer fazer. Em relação a estudos básicos, *Caenorhabditis elegans* é a espécie de nematoide melhor descrita. *Heterorhabditis baujardi* LPP7 já foi testado em laboratório no controle da mosca-das-frutas, carrapato bovino e gorgulho da goiaba. No entanto, existe pouca informação relacionada a estudos básicos sobre a referida espécie. O objetivo geral no presente trabalho foi estudar os aspectos biológicos relacionados à citogenética (através da caracterização do número

de cromossomos), à embriogênese (através do estudo das divisões assimétricas do embrião e suas etapas), ao comportamento sexual envolvendo o acasalamento e possíveis substâncias que possam auxiliar no encontro do macho e da fêmea deste nematoide para acasalamento. Em relação ao número de cromossomos, *H. baujardi* LPP7 demonstrou possuir 7 cromossomos bivalentes e mitóticos e essa característica do número de cromossomos pareceu ser conservada dentro desse gênero. Em relação ao estudo das fases de divisão do embrião da referida espécie, esta provavelmente está muito próxima filogeneticamente de *C. elegans*. No que diz respeito ao comportamento sexual, para facilitar os estudos, o comportamento sexual de *H. baujardi* LPP7 se dividiu em 3 etapas: Pré-cópula, Cópula e Pós-cópula. O tempo de cada etapa foi avaliado com 8 repetições e se concluiu que o macho da espécie em questão gasta muito mais tempo na fase pós-cópula, depositando o “plug” ou tampão copulatório, do que na cópula propriamente dita. Foi observado também que a fêmea pode copular com vários machos. Possivelmente o maior tempo gasto pelo machos na pós-cópula se deva ao instinto do macho em tentar passar seus genes para as futuras gerações, garantindo com isso sua prole. No ensaio de detecção de possíveis feromônios, foi utilizada uma placa de 5 cm de diâmetro como câmara de migração com 6 compartimentos onde 20 machos foram colocados no centro e 20 fêmeas virgens foram postas em uma das extremidades. Foi dada a possibilidade de escolha dos machos de irem em direção às fêmeas ou não. O oposto foi feito para dar a opção de escolha às fêmeas virgens. De 20 machos colocados no centro da placa, 1 ou 2 foram em direção às fêmeas virgens. Quando o oposto foi feito, o mesmo foi observado. Após repetições dos testes, não foi detectada a existência de nenhuma possível substância que possa atrair machos até fêmeas ou vice-versa para o acasalamento. É possível que o acasalamento entre machos e fêmeas de *H. baujardi* LPP7 possa ser resultado de encontros ao acaso. Como o macho de *H. baujardi* LPP7 tem um tempo de vida curto, ele está sempre procurando pela fêmea e tentando acasalar com tudo que está em sua frente como juvenis e outros machos. Além disso, a referida espécie já garantiu sua prole na primeira geração através da autofecundação das hermafroditas diferentemente da maioria das espécies do gênero *Steinernema*.

Palavras-chave: cópula, divisão celular, cariotipagem, Rhabditida, biologia básica.

ABSTRACT

MACHADO, Inês Ribeiro, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2012. Biological aspects of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae) related to cytogenetics, embryogenesis and sexual behavior. Major advisor: Ph.D: Claudia de Melo Dolinski. Co-advisor: Ds: Carlos Winter.

Entomopathogenic nematodes (NEPs) are used in biological control of various insect pests of the soil. However, it is very important the knowledge about the biology of the species of nematode precisely so that it can be an optimization in biological control you want to do. For basic studies, *Caenorhabditis elegans* is the best described species to nematodes. *Heterorhabditis baujardi* LPP7 has been laboratory tested to control the fruit fly, cattle tick and the weevil-guava. However, little information is related to basic studies on the species. The overall objective of this work was to study the biological aspects related to cytogenetics (by characterizing the number of chromosomes), embryogenesis (through the study of asymmetric divisions of the embryo and its stages), sexual behavior involving mating and possible

substances that might assist in meeting the male and female for mating this nematode. Regarding the number of chromosomes, *H. baujardi* LPP7 has demonstrated seven bivalents and mitotic chromosomes, and this characteristic number of chromosomes appeared to be conserved within the genus *Heterorhabditis*. Compared to the study of the division phases of the embryo of the species, this is probably too close to phylogenetic *C. elegans*. As regards sexual behavior, to facilitate the studies, the sexual behavior of *H. baujardi* LPP7 was divided into three stages: Pre-mating, Mating and post-copulation. The time for each step was evaluated using eight replicates and concluded that the male of the species in question spends more time with the post-copula, depositing the "plug" or copulatory plug, than in copulation itself. It was also observed that the female may mate with several males. Possibly the longest time spent by males in the post-mating is due to the male instinct to try to pass their genes to future generations, thereby ensuring their offspring. In the detection of possible pheromones, was used a plate of 5 cm in diameter as the migration chamber with 6 compartments where 20 males were placed in the center and 20 virgin females were put into one end. It was given the possibility of choice of the males toward the females go or not. The opposite was done to give a choice to virgin females. Of 20 males placed in the center of the plate, one or two were toward virgin females. When the opposite was done, the same was observed. After repetition of the tests was not detected the existence of any possible substance that could attract males to females or vice versa for mating. It is possible that mating between *H. baujardi* LPP7 males and females may be the result of random encounters. As the male of *H. baujardi* LPP7 has a short lifetime, he is always looking for female and trying to mate with everything in front of him and other males as juveniles. Furthermore, the species had already secured their offspring in the first generation of selfing by hermaphrodites unlike most species of the genus *Steinernema*.

KeyWords: copulation, cell division, karyotyping, Rhabditida, basic biology.

1- INTRODUÇÃO

As interações entre nematoides e insetos provavelmente ocorrem há 300 milhões de anos, desde o período Carbonífero (Ferraz, 1998). Existem mais de 30 famílias de nematoides associadas a insetos, incluindo parasitas de animais e plantas que utilizam insetos como vetores. Contudo, apenas nove dessas possuem potencial como agente de controle biológico (Kaya e Stock, 1988). Dentre estas, mais atenção tem sido dada a duas famílias: Steinernematidae, que compreende os gêneros, *Steinernema* Travassos e *Neosteinernema* Nguyen e Smart, e Heterorhabditidae, com o gênero *Heterorhabditis* Poinar (Adams et al., 2006).

Estas duas famílias se caracterizam pela relação simbiótica com bactérias (*Xenorhabdus* spp. para *Steinernema* spp. e *Photorhabdus* spp. para *Heterorhabditis* spp.), as quais causam doença e matam os insetos em menos de 48 horas. Por isso, são chamados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) (Poinar, 1990; Forst e Clarke, 2002).

NEPs foram testados contra um grande número de insetos-praga com resultados satisfatórios (Koppenhofer, 2000). Muitos fatores podem influenciar no sucesso do uso de nematoides como inseticidas biológicos. No entanto, o conhecimento e combinação da biologia e ecologia do nematoide com a praga alvo é essencial para o sucesso do controle biológico (Hazir et al., 2003). Isso fica evidente quando se observa os diferentes resultados obtidos em ensaios de

laboratório e a campo para os mesmos nematoides e hospedeiros (Efron et al., 2001; Wilson e Gaugler, 2004).

Em relação a estudos básicos, *Caenorhabditis elegans* Maupas foi inicialmente mais utilizado em estudos citológicos, o que levou à descoberta da correlação entre cromossomos e desenvolvimento embrionário e o desenvolvimento sexual, masculino ou feminino (McClung, 1902). Nematoides são particularmente adequados para estudos comparativos porque eles mostram uma rica diversidade de mecanismos na determinação do sexo, possuem genomas relativamente pequenos, planos corporais simples e vivem em uma variedade de contextos ecológicos (Pires-daSilva, 2007).

Estima-se que existam cerca de 500.000 espécies de nematoides (Sudhaus, 1976), mas a maioria delas não possui a biologia básica caracterizada. *C. elegans* é indiscutivelmente a melhor caracterizada em termos biológicos entre os metazoários. Esse conhecimento fornece uma base para estudos comparativos e para entender a grande variação encontrada no Filo Nematoda (Pires-daSilva, 2007).

De acordo com Lewis et al. (2006), só recentemente NEPs têm sido objeto de estudos básicos, onde são considerados como organismos-modelo para estudos sobre biologia parasitária em geral. NEPs são excelentes modelos para esta finalidade, uma vez que compartilham a característica de ter um juvenil de terceiro estágio infectante e ativo (J1), assim como outras espécies de nematoides parasitas. Além disso, possuem vantagens experimentais únicas em relação a muitos animais parasitas, pois são fáceis e baratos de se manter em laboratório, vivem de semanas a meses na fase infectante e possuem um grande grupo de espécies que facilitam os estudos comparativos (Lewis et al., 2006).

H. baujardi LPP7 vem sendo utilizado com sucesso no controle biológico de algumas pragas, como o gorgulho da goiaba, mosca-das-frutas e carrapato bovino. No entanto, alguns dados sobre a biologia desse agente de controle biológico ainda são desconhecidos. Esforços para explicar e corrigir algumas falhas no controle biológico servem de impulso para se conhecer cada vez mais a ecologia e biologia básica dos agentes de controle biológico (Gaugler et al., 1997).

O objetivo geral no presente trabalho foi estudar aspectos biológicos de *Heterorhabditis baujardi* Phan, Subbotin, Nguyen & Moens LPP7 relacionados à

citogenética (através da caracterização do número de cromossomos), à embriogênese (através do estudo das divisões assimétricas do embrião e suas etapas), ao comportamento sexual envolvendo o acasalamento e possíveis substâncias que possam auxiliar no encontro do macho e da fêmea deste nematoide para o acasalamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Nematoides entomopatogênicos (NEPs)

O uso de NEPs no controle biológico de pragas foi por alguns anos ligado ao controle de pragas com estágio no solo (Ishibashi e Choi, 1991). No entanto, resultados de pesquisa nas últimas duas décadas indicam que NEPs também têm potencial para suprimir pragas de insetos acima do solo, em determinadas condições (Trdan et al., 2008; Laznik et al., 2011).

Esses nematoides possuem uma fase de vida-livre que não se alimenta e possuem uma série de atributos, como: são altamente virulentos, podem ser facilmente cultivados *in vitro*, têm alto potencial reprodutivo e possuem um amplo espectro de hospedeiros (Gaugler, 1981; 1988). No entanto, podem ser bastante específicos, não causando mortalidade indiscriminada (Peters, 1996). São seguros para vertebrados, plantas e outros organismos não alvos (Poinar, 1989; Akhurst, 1990), são isentos de registro nos Estados Unidos (Gorsuch, 1982), são facilmente aplicados usando equipamentos de irrigação (Georgis, 1990) e são compatíveis com muitos pesticidas (Forschler, 1990; Hara, 1983; Rovesti, 1988; 1990; Zimmerman, 1990).

Os NEPs possuem duas ou mais gerações, produzindo novos JIs que emergem do cadáver. Os dois gêneros não são estreitamente relacionados (Blaxter et al., 1998). Portanto, semelhanças nos padrões de infectividade, o ciclo de vida e de associação com uma bactéria simbiote são consideradas como o resultado da evolução convergente (Poinar, 1993).

Uma diferença é o modo reprodutivo desses dois gêneros de nematoides. Espécies do gênero *Heterorhabditis* são heterogônicos, tendo modos de

reprodução automítica, ou seja, com hermafroditas na primeira geração e anfimíticos (com machos e fêmeas) na segunda geração (Strauch et al., 1994; Kehel Raifer e Glazer, 2000).

Espécies do gênero *Heterorhabditis* possuem adultos que são hermafroditas na primeira geração, permitindo a reprodução desses nematoides a partir da infecção de um único juvenil e são capazes de utilizar a reprodução sexual após a primeira geração (Han e Ehlers, 2000). Espécies do gênero *Steinernema* possuem o modo de reprodução apenas anfimítico (Poinar, 1990), embora haja, pelo menos, uma exceção (Griffin et al., 2001; Stock et al., 2004).

Ciclo de vida dos NEPs e suas diferentes fases de desenvolvimento

O ciclo de vida geral dos NEPs é iniciado pelos JIs, que são ambientalmente resistentes e que normalmente habitam o solo. Depois de perceber a presença de um inseto-hospedeiro, os JIs entram na hemocele do inseto através das aberturas naturais, tais como a boca ou ânus, ou usando um “dente” quitinoso para penetrar na cutícula e, em seguida, regurgitam suas bactérias simbiotes intestinais (Ciche e Ensign, 2003).

Após a liberação das bactérias simbiotes *Xenorhabdus* spp. em espécies do gênero *Steinernema* ou *Photorhabdus* spp. em espécies do gênero *Heterorhabditis*, estas matam o hospedeiro. Com isso, ocorre o desenvolvimento dos nematoides que se alimentam da “sopa bacteriana” e dos tecidos digeridos do hospedeiro. A morte do inseto ocorre rapidamente (geralmente em aproximadamente 48h), e os JIs se desenvolvem. As bactérias simbiotes que se proliferam no hemoceloma se preservam no inseto-cadáver, produzindo antibióticos de amplo espectro e/ou sinais ou nutrientes essenciais para o crescimento e reprodução dos nematoides (Ciche et al., 2001; Richardson et al., 1988).

Fêmeas de *Heterorhabditis* ou hermafroditas na primeira geração vão ovipositar e permitir o desenvolvimento da primeira fase juvenil (J1) dentro do útero. O desenvolvimento dos JIs, enquanto consomem a cavidade corporal materna e, em última instância, causando o matricídio (nascimento intrauterino dos JIs causando a morte materna, é um processo também chamado “endotoquia matricida”) (Johnigk e Ehlers, 1999b). Após o matricídio os juvenis se diferenciam

em machos e fêmeas que irão copular e gerar juvenis que sairão do inseto por emergência completando o ciclo (Figura 1).

Segundo Ciche et al. (2008), a fase “endotokia matricida” ocorre em todos os hermafroditas maternos e também nas fêmeas de nematoides resultando no desenvolvimento dos JIs contendo a bactéria simbiote, e fica claro que a endotokia matricida é uma adaptação para a transmissão simbiote.

A determinação do sexo e o desenvolvimento de indivíduos automíticos e anfimíticos em *Heterorhabditis* são influenciados pela densidade bacteriana e por mecanismos ainda desconhecidos (Strauch et al., 1994).

Os ovos que são estabelecidos fora do útero são predeterminados para se desenvolver em machos, fêmeas ou hermafroditas (na segunda geração no caso do gênero *Heterorhabditis*). Embora as proporções das populações de anfimíticos versus autoanfimíticos sejam uma consequência da falta ou abundância de alimento durante a fase J1 (Strauch et al., 1994), a incubação precoce de J1 desenvolve machos, e a incubação da meia-fase de J1 produz fêmeas, e o estágio de desenvolvimento atrasado de incubação produz mais JIs. Assim, a proporção destas populações é influenciada pela densidade bacteriana, mas o calendário de desenvolvimento parece ser independente de bactérias (Johnigk e Ehlers, 1999a).

Na fase atrasada de desenvolvimento dos JIs (12/24 h) cada gênero pode ser distinguido através da observação de estruturas específicas do sexo. Fenótipos masculinos podem ser identificados com base na morfologia das gônadas primordiais (Strauch et al., 1994).

Além disso, segundo os mesmos autores, o desenvolvimento é amplamente dependente da presença de bactérias simbiotes específicas de cada nematoide. Na presença de nutrientes suficientes e bactérias simbiotes, os JIs irão se desenvolver através do estágio J4 para o estágio adulto reprodutivo, que são as hermafroditas, no caso do gênero *Heterorhabditis* e em adultos anfimíticos no caso da maioria dos steinernematídeos.

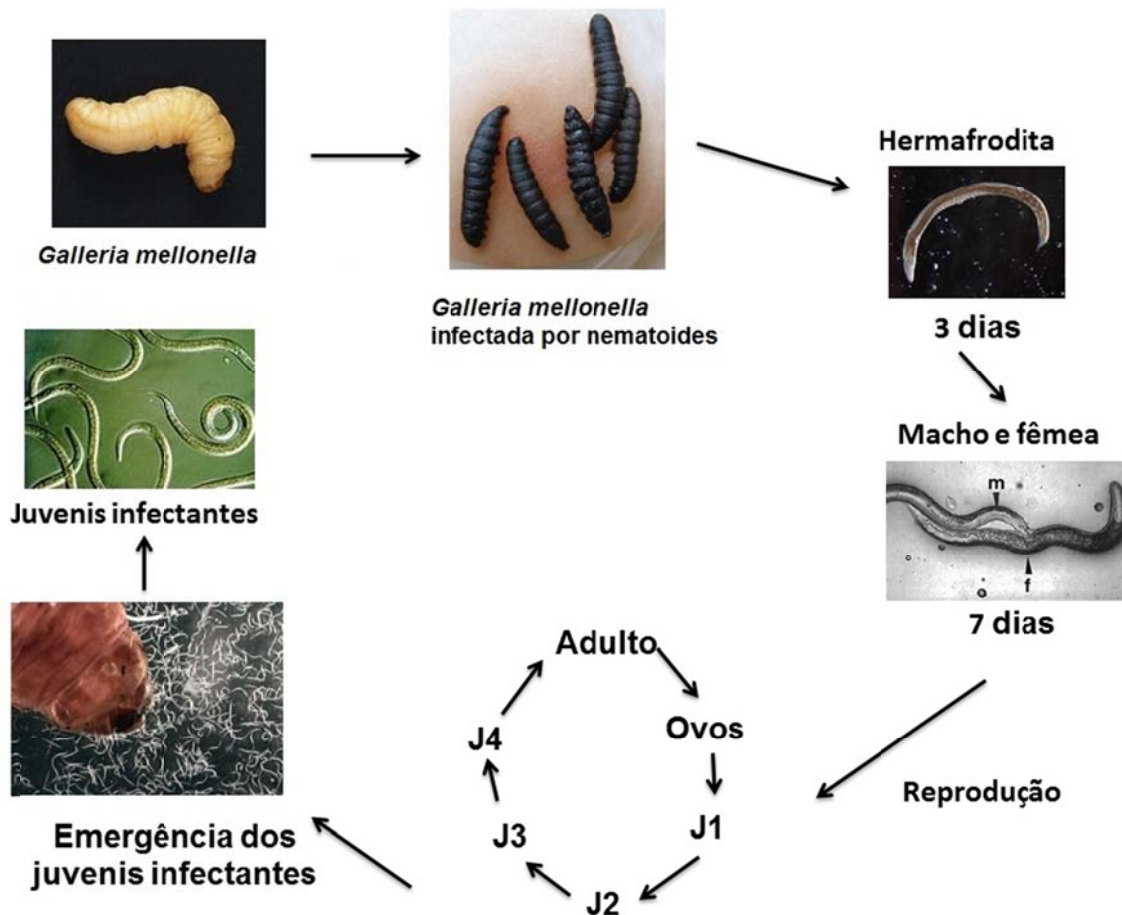


Figura 1. Ciclo de vida de *Heterorhabditis baujardi* LPP7.

Com base nas relações mutualísticas entre NEPs e as bactérias dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, o ciclo de vida pode ser dividido em três fases: forética, patogênica e saprófita. No entanto, NEPs possuem variáveis relações com os seus simbiotes, e um sucesso reprodutivo de um complexo nematoide-bactéria dependerá da sua patogenicidade e da susceptibilidade de um hospedeiro potencial (Ciche et al., 2006).

- Fase forética

A fase forética é caracterizada pela quiescência da bactéria e da atividade do nematoide que funciona como um vetor para a bactéria simbiote. As bactérias estão bem protegidas do meio ambiente no intestino dos JIs até estes realizarem a infecção entrando no inseto e liberando a bactéria na hemocele (Poinar, 1966; Poinar et al., 1977).

- Fase patogênica

Na fase patogênica, os JIs carregam as suas bactérias simbiotes para um inseto-hospedeiro em potencial. Uma vez que o nematoide entra na hemocele, o complexo nematoide-bactéria enfrenta o mecanismo de defesa humoral e celular do inseto, que podem mediar o encapsulamento e a melanização de invasores (Peters e Ehlers, 1997).

- Fase saprofítica

Uma vez que o inseto hospedeiro é morto, se inicia a fase saprofítica. Durante esta fase os nematoides e bactérias começam a se reproduzir no cadáver. O percurso de desenvolvimento tomado pelos nematoides durante essa fase depende largamente da disponibilidade de bactérias e de nutrientes (Ciche et al., 2006).

2.1.1- O nematoide *Heterorhabditis baujardi* LPP7

O nematoide *H. baujardi* linhagem LPP7 é proveniente da Floresta Amazônica (Monte Negro-RO) e foi identificado com base na morfologia e biologia molecular (Dolinski et al., 2008). Vários estudos foram realizados com a finalidade de se avaliar o potencial dessa espécie como agente controlador de insetos-praga e resultados positivos foram obtidos.

Dolinski et al. (2006) testaram a virulência de nove espécies de NEPs contra larvas do gorgulho da goiaba, *Conotrachelus psidii* Marchall (Coleoptera: Curculionidae), em laboratório e em casa de vegetação. Em laboratório as maiores mortalidades alcançadas foram observadas para *H. baujardi* linhagem LPP7, *H. indica* isolado Hom1 e *H. indica* isolado LPP1. Em casa de vegetação foi testado apenas *H. baujardi* linhagem LPP7, nas concentrações de 500, 1000 e 2000 JI/ 50 mL, sendo que as concentrações de 1000 e 2000 JI/ 50 mL por vaso alcançaram uma mortalidade de 60% das larvas do besouro (Del Valle, 2008).

Segundo Lara et al. (2008), *H. baujardi* linhagem LPP7 pode suportar pressões em equipamento de irrigação de até 340 psi sem ser afetado em sua viabilidade, capacidade de infecção e busca de larvas de *Galleria mellonella* L.

Segundo os mesmos autores, essa linhagem pode suportar temperaturas de até 35°C sem ser afetado em sua viabilidade, patogenicidade e capacidade de deslocamento até larvas de *G. mellonella*.

Del Valle (2008) utilizando cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com *H. baujardi* LPP7 determinou a persistência e o padrão de distribuição desses JIs no tempo e no espaço quando aplicados ao solo em duas concentrações. Segundo o autor, a persistência dos JIs emergidos dos cadáveres foi de seis semanas após a aplicação. Após este período, significativa queda na persistência dos JIs foi observada. O maior número de JIs foi recuperado aos 90 cm dos locais de aplicação, nos primeiros 10 cm de profundidade e na quinta semana após aplicação. O mesmo autor também avaliou a melhor proteção dentre as cinco proteções de cadáveres de *G. mellonella* infectados por *H. baujardi* linhagem LPP7. A cobertura de insetos-cadáveres que se destacou foi em cápsulas de gelatina, mas esta não apresentou diferenças com a testemunha.

Minas et al. (2011) avaliaram o potencial de oito linhagens de nematoides entomopatogênicos utilizadas separadamente e em combinações, visando ao controle biológico de larvas L3 da mosca-do-Mediterrâneo, *Ceratitis capitata* Wiedemann, em laboratório. Como resultado, larvas L3 de *C. capitata* foram susceptíveis quando expostas a diferentes linhagens de nematoides isoladamente. O nematoide *H. baujardi* linhagem LPP7 causou 85% de mortalidade no 1º ensaio e 83% no segundo.

2.2 – Aspectos gerais sobre citogenética de nematoides

O Filo Nematoda é altamente diversificado em espécies e é o segundo grupo de metazoários mais abundante na Terra (Platt, 1994). Estima-se que os nematoides compreendam cerca de 90% de todos os organismos multicelulares. Lamshead (1993) previu que o número de espécies de nematoides seja maior do que cem milhões, embora apenas 26.646 espécies tenham sido descritas até 2001 (Hugot et al., 2001). Esta plasticidade evolutiva sugere uma plasticidade genética subjacente e tem fascinado os biólogos (Coghlan, 2005).

É importante conhecer a estrutura do genoma de espécies de outros nematoides para se ter uma idéia melhor de como a evolução do genoma ocorre dentro deste Filo (Ahn e Winter, 2006). A maioria dos nematoides que tiveram

seus genomas sequenciados possuía uma variação de 50-250 Mb (Leroy et al., 2003). Entre genomas de nematoides que estão sendo sequenciados, tamanhos variam de 53 Mb para *Haemonchus contortus* (Leroy et al., 2003) e 240 Mb para *Trichinella spiralis* Owen (Hammond e Bianco, 1992). Poucos nematoides têm genomas tão grandes como os de mamíferos, como o genoma de *Parascaris univalens* Hertwig com Mb ~ 2100 Mb (Niedermaier e Moritz, 2000).

Estudos genéticos sobre nematoides parasitas foram predominantemente confinados a um número limitado de estudos de genética de população. No entanto, existe um recente interesse em utilizar tais abordagens para se investigar a epidemiologia de parasitas e a evolução da resistência a drogas (Blouin et al. 1995., Anderson 2001; Nejsun et al. 2005; Troell et al. 2006; Criscione et al. 2007; Gilleard e Beech 2007).

As informações recentes sobre cariótipos em nematoides estão fragmentadas, e a base de dados de cariótipos é conhecida em apenas aproximadamente 1,1% das espécies já identificadas. Os cromossomos supranumerários foram relatados em populações selecionadas de apenas 11 platelmintos, 1 acantocéfalo e 4 nematoides que representam 3,6; 7,7 e 1,3% respectivamente do número total de espécies analisadas citogeneticamente dentro dos respectivos grupos (Spakulova e Casanova, 2004).

O fato da mesma espécie de nematoide atacar mais de uma espécie de planta cultivada, sugere que os parasitas apresentam grande variabilidade genética e alta capacidade de adaptação. Nas populações de fitonematoides ocorrem a reprodução por anfimixia (fertilização cruzada) e a partenogênese meiótica e/ou mitótica, e a variabilidade parece ser consequência de alterações gênicas, bem como de polimorfismos cromossômicos. Nos trabalhos sobre polimorfismo cromossômico, é sugerida a ocorrência de poliploidia e aneuploidia em espécies de nematoides (Cotten, 1959, 1960; Netscher, 1969; Triantaphyllou, 1962, 1970).

De acordo com Triantaphyllou (1985), os polimorfismos numéricos de cromossomos estão associados com a partenogênese meiótica e mitótica e são considerados mecanismos importantes no processo evolutivo desses organismos. Nos fitonematoides, a anfimixia e a partenogênese podem ocorrer para o mesmo gênero e em algumas espécies encontram-se populações com os dois tipos de

reprodução. A partenogênese, por sua vez, pode ser mitótica ou meiótica, encontrando-se, às vezes, ambas na mesma espécie (Tihohod, 1993).

Os diferentes tipos de reprodução dos nematoides podem ser conhecidos por meio de métodos citogenéticos que avaliam a oogênese, podendo auxiliar também em estudos taxonômicos. No Brasil, até o presente, há um único trabalho em citogenética para descrição da nova espécie, *Meloidogyne paranaensis* Carneiro com número de cromossomos $2n=50-52$ (Carneiro et al., 1996). As populações de *M. javanica* Carneiro do Paraná e do Mato Grosso do Sul possuem 44 e 42 cromossomos, respectivamente, nas células da zona germinativa.

Mulvey (1960) observou que a oogênese de uma população de *M. javanica* da Georgia (U.S.A) possui oócitos com 18 ou mais cromossomos, sendo a maioria com pelo menos 27 cromossomos. Diversas populações da mesma espécie foram estudadas por Triantaphyllou (1962), sendo obtidos números de cromossomos variados: 48 nos Estados Unidos; 46 na Rodésia, na Grécia e em uma população da Austrália; 44 em uma população da Inglaterra e outra da Austrália, e 43 em uma população da Inglaterra. Baseado no fato de que Mulvey (1960) relatou $n=10$ para *M. hapla* Chitwood e *M. incognita* Kofoid e White, Triantaphyllou (1962) sugeriu a condição poliploide para *M. javanica*. Os números de cromossomos encontrados para *M. javanica* neste trabalho (44 e 42) mostram que as populações brasileiras têm o mesmo grau de ploidia das analisadas por Triantaphyllou. Além disso, a variação no número de cromossomos observada nas populações brasileiras e nas demais permite concordar com o autor, quando sugere que a aneuploidia estabeleceu-se durante a evolução desses organismos, associada à poliploidia. O autor ainda sugere que a reprodução partenogenética favorece o estabelecimento dessas anomalias.

Segundo Triantaphyllou e Hirschmann (1980) a evolução também é caracterizada em um processo citogenético. White (1978) apontou que para compreender os processos envolvidos na diferenciação das populações, espécies e categorias superiores, é preciso saber o que está acontecendo no cariótipo. Um grande número de características citogenéticas pode ser levado em consideração quando se trata da evolução de um grupo de organismos. No entanto, naquela época a informação disponível sobre citogenética era muito limitada. As informações eram principalmente sobre método de reprodução, tipo de

amadurecimento de gametócitos, número de cromossomos e, ocasionalmente, sobre o tamanho e a morfologia dos cromossomos.

Segundo Triantaphyllou e Hirschmann (1980) certas características anatômicas e do desenvolvimento do esôfago e do sistema reprodutivo, avaliadas em um estudo de base comparativa, parecem oferecer interpretações razoáveis dos caminhos da evolução de alguns nematoides fitoparasitas. Os dados citogenéticos obtidos recentemente para um número de espécies de diversos grupos também podem ser úteis na elucidação das relações evolutivas (Berge et al., 1973; Triantaphyllou, 1971).

Segundo White (1978), os processos citogenéticos associados à evolução ocorrem devido às mutações genéticas, mutações cromossômicas (incluindo rearranjos estruturais), mudanças na quantidade de DNA associadas ao locus gênicos e mudanças na quantidade de DNA satélite (heterocromatina constitutiva). Os dois últimos processos são os mais importantes para se entender as relações filogenéticas entre nematoides.

A maioria dos nematoides tem o número de cromossomos haploides $n = 4-12$ (Walton, 1959). O cariótipo de apenas aproximadamente 300 espécies foi estudado. No entanto, os nematoides mostram uma grande variação cariotípica (Spakulová e Casanova, 2004). O menor número haploide é $n = 1$ em *Parascaris univalens*, mas números muito altos são observados em espécies poliploides na infraordem Tylenchomorpha (Coghlan, 2005).

Por exemplo, a raça de *Meloidogyne hapla* Chitwood foi sequenciada como diploide e tem $n = 14$, mas outra raça de *M. hapla* é poliploide com $2n=45-48$ (Triantaphyllou, 1984). Muitos nematoides da infraordem Tylenchomorpha incluindo *M. hapla*, são partenogenéticos, nos quais embriões não fertilizados se desenvolvem dentro de novos indivíduos. As espécies animais que se reproduzem dessa forma parecem ser suscetíveis à poliploidização (Otto e Whitton, 2000). A raça *M. hapla* sequenciada tem o dobro de cromossomos do que a maioria dos nematoides da subordem Rhabditina. Isso pode revelar traços de uma duplicação do genoma antigo em Tylenchomorpha. Em contraste com os nematoides da infraordem Tylenchomorpha, a maioria dos nematoides da subordem Rhabditina tem $n=5-6$ (Blaxter, 2000). Com efeito, ambas as espécies *C. elegans* e *C. briggsae* (Dougherty and Nigon, 1949) têm cromossomos $n=6$, apesar de seus cromossomos terem sido submetidos a aproximadamente 4000

rearranjos, havendo uma clara divergência (Stein et al., 2003). A falta de cisões ou fusões sugere que poderia ter ocorrido seleção para um número de cromossomos estáveis na subordem Rhabditina (Coghlan, 2005).

De acordo com Curran (1989) o número de cromossomos é conservado entre as espécies dentro dos gêneros *Heterorhabditis* (n=7). No entanto, *Steinernema* sp. tem 5 cromossomos com exceção do NC 513 *Steinernema* grupo de isolados (n=3). Ahn e Winter (2006) relataram que *Ocheius tipulae* Lam and Webster tinham um complemento haploide de cromossomos 6, confirmando que rhabditinos também têm um cariótipo muito conservador.

O cariótipo metáfase do tipo selvagem de *C. elegans* é composto por 12 cromossomos em hermafroditas, cinco pares de autossomos e dois cromossomos sexuais, e 11 cromossomos em machos, que têm um cromossomo sexual único. Estágios de mitose são mais facilmente visualizados em embriões em desenvolvimento, onde os cromossomos apresentam muitas das características de cromossomos holocêntricos que os distinguem dos cromossomos monocêntricos. Na metáfase, cada cromossomo como um todo se encontra dentro do eixo, paralelo ao equador do fuso, enquanto que na anáfase os cromossomos inteiros se movem para as bordas em direção ao pólo do fuso (Albertson e Thomson, 1982).

De acordo com Dernburg (2001), cromossomos holocêntricos se ligam aos microtúbulos ao longo de seu comprimento inteiro sem um *locus* definido e se movem para o pólo da placa metafásica. Essa façanha pode ser obtida por mecanismos distintos em organismos holocêntricos diferentes. Os microtúbulos de *Parascaris univalens* se juntam durante a meiose. Isso parece ser restrito a uma grande região heterocromática perto de um final do par de cromossomos solitários, tornando-os cromossomos monocêntricos meióticos (Goday e Pimpinelli, 1989).

2.3- A embriogênese relacionada à filogenética do Filo Nematoda

Sendo um dos animais mais diversos do planeta, os nematoides são ideais para estudos evolutivos. Eles são adaptados a quase todos os nichos ecológicos desde o ambiente marinho, solos áridos a úmidos e até tecidos de animais (Maneesakorn et al., 2011).

Nematoides são bons modelos para exploração da evolução da morfologia e desenvolvimento (Fitch, 1997; Sternberg and Félix, 1997; Dolinski et al., 1998; Félix, 1999, Sommer et al., 1999; Félix et al., 2000). Tais organismos têm uma enorme importância em investigações sobre o desenvolvimento embrionário animal.

O desenvolvimento embrionário foi descrito para muitas espécies de nematoide, o que conduz a vários conceitos-chave no desenvolvimento da biologia. A praticidade para estudos genéticos fez de *C. elegans* um dos modelos biológicos mais estudados e hoje dominantes nas pesquisas de biologia moderna (Hope, 2002).

O Filo Nematoda possui muitas vantagens, pois além de possuírem espécies diferentes (as estimativas variam de dezenas de milhares até vários milhões), os embriões podem se desenvolver fora do corpo materno desde a primeira clivagem, eles são transparentes, embora em graus variáveis. Outra vantagem é que os juvenis recém-eclodidos parecem ter essencialmente células específicas de espécies que são invariantes com 600 células, aproximadamente (isso para as espécies até o momento testadas). Além disso, a disponibilidade dos embriões torna esse Filo atraente para muitos estudos. Muitas linhagens de nematoides podem ser cultivadas em laboratório em placas de ágar simples (Schierenberg e Schulze, 2008).

Análises moleculares confirmam a validade de *C. elegans* como um modelo adequado para estudos comparativos. A conclusão do sequenciamento do genoma do *C. elegans*, o primeiro organismo multicelular a ser seqüenciado, tem revelado uma variedade de mecanismos evolutivamente conservados deste modelo e tem estimulado análises moleculares em outras espécies de nematoide (Hope, 2002).

A embriogênese constitui todo o processo de desenvolvimento que ocorre após a fase de fertilização até a eclosão do J1. Este processo em *C. elegans* é

relativamente rápido, ocorrendo normalmente durante 11,5 horas à temperatura de 25° C. Normalmente, os núcleos e os nucléolos são claramente visíveis. No entanto, os limites das células são por vezes difíceis de identificar em DIC (Diogo e Mota, 2001).

O desenvolvimento embrionário de organismos multicelulares a partir do ovo envolve uma série de divisões visivelmente desiguais, em que uma célula dá origem por divisão a duas células filhas, uma relativamente maior do que a outra, e assim sucessivamente (Wood, 1988). A embriogênese baseada em *C. elegans* possui três fases:

Após a fertilização ocorre a primeira divisão assimétrica do ovo. A célula mãe dá origem a duas células filhas: uma célula maior e anterior denominada AB e uma célula menor e posterior denominada P1 (Wood, 1988). Depois de concluída a 1ª divisão, a célula AB inicia a 2ª divisão, dando origem a duas células desiguais: a célula ABp, que constitui o pólo dorsal do embrião e a célula ABa que constitui o polo anterior do embrião. Após esta divisão a célula P1 divide-se para formar a célula EMS e P2 (Wood, 1988). Durante esta fase ocorre uma série de divisões assimétricas da qual resultam as células fundadoras e as células da linha germinativa. As células fundadoras dão origem a determinados tecidos presentes no adulto. Isto é possível através da determinação da linhagem de células durante a embriogênese, de tal modo que é possível traçar a origem de todas as células e tecidos presentes no adulto (Sulston, 1988). As células da linhagem germinativa são células precursoras das gônadas (Wood, 1988).

A segunda fase inclui a gastrulação, que é a conclusão da proliferação da maioria das células e o começo da diferenciação de tecidos. A terceira fase inclui a morfogênese, assim como a conclusão da diferenciação de células embrionárias. O aspecto vermiforme se desenvolve em grande parte por alteração da forma e organização das células da hipoderme. Este processo é denominado de morfogênese (Diogo e Mota, 2001).

Desde o início dos estudos com embriogênese o nematoide *C. elegans* tem sido o organismo mais estudado em detalhes embriogênicos, principalmente em relação às linhagens das células iniciais e arranjo dos blastômeros (Sulston et al., 1983). Naquela época, esses detalhes foram encontrados sendo similares ao modelo clássico do gênero *Ascaris* (Boveri, 1899) e outros representantes estudados do Filo (Skiba e Schierenberg, 1992). O pressuposto implícito na época

após esse estudo era de que o padrão de desenvolvimento embrionário era muito similar entre os nematoides (Schierenberg, 2006).

No entanto, logo depois essa concepção foi considerada inadequada devido a uma análise de uma variedade de espécies de nematoides juntamente com os dados de pesquisadores russos. Esses dados só se tornaram disponíveis com a tradução para inglês do livro de Malakhov (1994) sobre nematoides. Nesse livro havia demonstrações de variações importantes existentes nas etapas cruciais do início da embriogênese (Goldstein, 2001).

Frequentemente as peculiaridades estruturais das espécies de nematoides ou até mesmo de grupos específicos com grande tamanho corporal, estruturas ou apêndices gonodais se desenvolvem apenas durante a fase pós-embrionária. Além disso, a maioria das variações têm sido descobertas durante a embriogênese inicial (Schierenberg, 2006).

Um dos maiores objetivos dos estudos embriogênicos é entender os mecanismos das mudanças fenotípicas (Gerhart and Kirschner, 1997; Hartwell et al., 1999; Wilkins, 2002). No entanto, tais mudanças são de grande relevância para estudos filogenéticos (Brauchle et al., 2009).

Como nematoides pertencem a um Filo antigo e diversificado (De Ley e Blaxter, 2002; Meldal et al., 2007) e muitas espécies podem ser cultivadas em laboratório, eles parecem ser excelentes candidatos para o estudo da evolução dos processos de desenvolvimento. Nas últimas décadas, várias tentativas foram feitas para compreender melhor as relações filogenéticas entre os nematoides (Schulze e Schierenberg, 2008).

Vários estudos demonstraram que os embriões de diferentes espécies de nematoides se desenvolvem de diferentes maneiras (Félix, 1999; Goldstein, 2001; Goldstein et al., 1998; Malakhov, 1994; Schierenberg, 2006).

De acordo com Schierenberg (2006), é incontestável que a diversidade morfológica dos juvenis recém-eclodidos, como por exemplo, a estrutura da boca, faringe, cauda e as uniformidades do contraste do plano básico do corpo com muitas modificações até a formação do nematoide é gerada a partir de uma célula-ovo.

As primeiras divisões do desenvolvimento embrionário inicial foram descritas para um grande número de nematoides em grande parte do Filo (Malakhov, 1994; Goldstein et al., 1998; Voronov e Panchin, 1998; Dolinski et al.,

2001; Schierenberg, 2005; Lahl et al., 2006). No entanto, até o estágio de 50 células são principalmente restritas a membros da ordem Rhabditida e Plectida (Skiba e Schierenberg, 1992; Spieler e Schierenberg, 1995; Hasegawa et al., 2004; Laugsch e Schierenberg, 2004).

Linhagens celulares completas só foram descritas para *C. elegans* (Sulston et al., 1983), *Pellioditis marina* Bastian (Houthoofd et al., 2003), *Rhabditophanes* sp. Fuchs (Houthoofd et al., 2007) e *Halicephalobus gingivalis* Stefanski (Houthoofd e Borgonie, 2007). Além disso, *C. elegans* é o único metazoário em que seu desenvolvimento tem sido descrito completamente em nível celular (Sulston e Horvitz, 1977, Sulston et al., 1983; Deppe et al., 1978, Kimble e Hirsh, 1979).

Alguns estudos demonstraram que, em algumas circunstâncias, a linhagem padrão pode ser mudada (Priess e Thomson, 1987; Wood, 1991), mas ainda não estava claro naquela época a importância da linhagem padrão para o desenvolvimento normal do nematoide (Voronov e Panchin, 1998).

No entanto, o estudo da diversidade natural da embriogênese realizado nas diferentes espécies de nematoides pode ser útil no entendimento do papel da linhagem celular no desenvolvimento do nematoide (Sulston et al., 1983; Skiba e Schierenberg, 1992). Por exemplo, o desenvolvimento dos membros da ordem Enoplida, classe atual Enoplea (De Ley et al., 2006) é completamente diferente de todos os outros nematoides, pois o padrão da clivagem inicial não é consistente, podendo se sugerir que a linhagem celular não é fixa (Cherdantsev et al., 1972; Malakhov e Akimushkina, 1976) de seus destinos celulares (Voronov et al., 1986, Voronov e Panchin, 1995).

Como a grande maioria das variações foram descobertas durante o início da embriogênese, Schierenberg (2006) concentrou-se na fase inicial entre a ativação da célula-ovo e a gastrulação. A posição filogenética assumida por todos os táxons mencionados foi deduzida na figura do artigo de Schierenberg (2006). Para facilitar a referência na atribuição da espécie a um clado específico, a relação Filogenética é dada de acordo com Blaxter et al. (1998).

Várias informações relacionadas à embriogênese foram analisadas tomando-se como base o cladograma de Blaxter et al. (1998) como polaridade, clivagem, linhagem germinativa, linhagens celulares, padrão de formação dos

blastômeros, ciclos celulares, contribuição materna, comunicação célula a célula, especificidade celular e gastrulação.

Análises das linhagens celulares embrionárias também foram realizadas por Schierenberg e Schulze (2008) em uma variedade de espécies dos clados 6-12, enquanto que para os clados restantes existem estudos para apenas algumas linhagens (Malakhov, 1994; Voronov, 1999).

Tomando-se como base os dados das sequências moleculares, uma filogenia moderna de nematoides foi sugerida por Blaxter et al. (1998) e ampliada e modificada por De Ley e Blaxter (2002), com cinco clados em três subclasses. A partir de um conjunto maior de espécies, 339 tiveram por completa a pequena subunidade de sequências de DNAr. As sequências foram analisadas onde se revelou uma estrutura com 12 dicotomias consecutivas que subdividem o Filo Nematoda em 12 clados (Holterman et al., 2006).

As razões para que apenas alguns nematoides não fossem cultivados em laboratório, é porque o desenvolvimento de alguns embriões é lento e estes não são muitas vezes, suficientemente transparentes (Schierenberg e Schulze, 2008). Uma exceção é o caso da espécie *Romanomermis culicivorax* Ross e Smith, pertencente à família atual Mermithidae (De Ley et al., 2006), cujo desenvolvimento ocorre razoavelmente rápido e na qual uma densidade moderada de grânulos de vitelos permite um estudo detalhado das linhagens celulares (Schulze e Schierenberg, 2008).

Em vários aspectos *R. culicivorax* se difere das espécies descritas acima. O embrião possui um citoplasma colorido (até o momento o único que contém essa característica entre os nematoides estudados) segregado à célula somática fundadora S2. O citoplasma desse nematoide lembra o mioplasma colorido de alguns embriões de animais marinhos chamados ascídeos (Jeffery, 2001). No entanto, o blastômero parece dar lugar à hipoderme completa, que eventualmente cresce sobre o restante do embrião.

Este processo com duplicações repetidas de grupos de células parece ser fundamentalmente diferente da forma como a qual é gerada a hipoderme em *C. elegans*. Outra grande diferença para os representantes dos clados 6–12 é que em *R. culicivorax*, outro blastômero inicial gera o trato digestivo completo, ou seja, a faringe e intestino (Schierenberg e Schulze, 2008).

Embora o estágio de quatro células de *Plectus* seja semelhante ao de *C. elegans*, algumas peculiaridades mostram que essas características parecem ser típicas para toda a família Plectidae. Em contraste com todos os outros táxons já mencionados, a gastrulação desse gênero se inicia mais cedo do que o estágio de oito células. Esse processo poderá ser interpretado como uma mudança heterocrônica dando às células fundadoras do intestino a habilidade prematura para ingressar na divisão. No entanto, em outros nematoides apenas suas células filhas ou netas ainda podem fazê-lo.

A migração da célula precursora EMS em *Diploscapter* Cobb pode ser compreendida da mesma forma. Mesmo sendo uma geração celular anterior da célula precursora do intestino, esta célula se torna competente para migrar e/ou apresentar células vizinhas de moléculas de superfície. Essas células vizinhas são necessárias durante todo o processo (Schierenberg e Schulze, 2008).

Uma segunda característica dos nematoides pertencentes ao gênero *Plectus* Cobb é sua simetria bilateral inicial e proeminente que é formada dentro das linhagens individuais através de divisões celulares com a restrita orientação do eixo da esquerda para direita (Lahi et al. 2003).

Em contraste com os nematoides estudados acima, o gênero *Tobrilus* Cobb possui uma grande blastocele rodeada por uma única camada de blastômeros, semelhante às fases de blástula em outros invertebrados, como ouriços-do-mar e também vertebrados. Em torno do estágio de sessenta e quatro células, um pequeno número de células começa a invaginar para dentro da blastocele, semelhante ao ouriço-do-mar.

A movimentação e divisão dos blastômeros internalizados resultaram em sua contínua extensão e uma correspondente diminuição no tamanho da blastocele. Parece que estas células invaginadas, se formam não só no intestino, mas também na faringe. A partir da fase de 128 células, uma terceira camada de blastômeros invagina e se estende entre a massa compacta de células centrais e a ectoderma circundante (Schierenberg 2005).

Segundo Schierenberg e Schulze (2008), as observações relatadas demonstram que ocorreu uma mudança dentro do Filo Nematoda, principalmente na forma como as três diferentes camadas germinativas são geradas. Parece provável que a gastrulação observada em *Tobrilus* represente um estado

plesiomórfico e que o padrão normal de geração das camadas germinativas em outros nematoides seja uma condição derivada, ou seja, um estado apomórfico. Segundo Dolinski et al. (2001), o conhecimento sobre a evolução da classe Secernentea, classe atual Chromadorea (De Ley et al., 2006) pode oferecer uma visão geral dos padrões divergentes da embriogênese inicial com a finalidade de proporcionar um contexto filogenético para o modelo *C. elegans* que tem sido utilizado para estudos moleculares.

Tais filogenias podem fornecer um quadro para mapeamento da evolução da diversidade de alguns caracteres de desenvolvimento inicial para 70 espécies e 19 famílias da classe Secernentea, classe atual Chromadorea (De Ley et al., 2006). Com exceção do eixo de clivagem, existe uma diversidade na embriogênese inicial em Secernentea relacionada a mudanças no tempo, ou seja, heterocronia, na qual é considerado mais um parâmetro para a classificação evolucionária de nematoides (Skiba e Schierenberg, 1992).

Utilizando grupos para comparações, Dolinski et al. (2001) concluíram que dentro da ordem Rhabditida, classe atual Chromadorea (De Ley et al., 2006), o padrão romboide de quatro células, como encontrado em *C. elegans*, é um ancestral paralelo que deve ter evoluído mais de uma vez de forma independente nos ramos individuais dos nematoides.

A embriogênese inicial em nematoides como em *C. elegans* e muitas outras espécies deste Filo apresenta vários acontecimentos característicos. Tais acontecimentos incluem a presença visível de uma linhagem germinativa a partir do diferente começo da geração das linhagens somáticas via clivagens assimétricas. A ausência de uma celoblastula é um único tipo de gastrulação com a migração de apenas duas células precursoras do intestino (Schierenberg, 2005).

O estudo de desenvolvimento do nematoide de vida-livre *Tobrilus diversipapillatus* difere deste padrão em dois aspectos. O primeiro aspecto é a falta de clivagem assimétrica e linhagens celulares diferentes. O segundo aspecto é a presença de uma celoblastula proeminente formada. Essa gastrulação lembra o padrão clássico encontrado em todo reino animal. Essas peculiaridades do desenvolvimento são consideradas plesiomórficas e, portanto, a ordem Triplonchida ao qual pertence o gênero *Tobrilus* pode ocupar uma posição filogenética na base do Filo Nematoda (Schierenberg, 2005).

O nematoide da família Neodiplogastridae, *Pristionchus pacificus* Sommer, teve o seu desenvolvimento embrionário inicial estudado para uma comparação com organismo-modelo já bastante estudado, *C. elegans* (Vangestel et al., 2008). No estudo, foram analisados diversos parâmetros do desenvolvimento inicial incluindo: sequência de divisão, arranjo espacial dos blastômeros, padrões do ciclo celular da linhagem AB e contato célula a célula em diferentes estágios celulares do embrião. Os autores mostraram que o desenvolvimento embrionário inicial é quase idêntico ao de *C. elegans*, havendo uma pequena diferença na terceira linhagem AB de *P. pacificus* que é diferente de *C. elegans* (Vangestel et al., 2008).

Dentro da ordem Rhabditida, análises comparativas anteriores mostraram diferenças marcantes na embriogênese inicial entre algumas dentre muitas espécies (Félix, 1999; Goldstein, 2001; Malakhov, 1994; Schierenberg, 2006). As diferenças incluem mecanismos para estabelecer o eixo ântero-posterior do embrião de uma célula (Goldstein et al., 1998) e atribuem destinos celulares (Wiegner e Schierenberg, 1998) ou padrões de linhagens de células embrionárias (Skiba e Schierenberg, 1992; Vangestel et al., 2008).

Linhagens de células embrionárias de *Rhabditophanes* sp. (Fuchs, 1930) família atual Alloionematidae (De Ley et al., 2006) foram comparadas célula a célula de maneira detalhada com linhagens celulares conhecidas como *C. elegans*, *Pellioditis marina*, família atual Rhabditidae (De Ley et al., 2006) e *Halicephalobus gingivalis* Stefanski, família atual Panagrolaimidae (De Ley et al., 2006) mostrando diferenças na sequência de divisão inicial e gastrulação.

A similaridade da linhagem entre *Rhabditophanes* sp. e *C. elegans* é 93,6%, o que indica que 517 das 552 células terminais determinadas têm uma célula equivalente terminal com a mesma história de linhagem celular de *C. elegans*. É notório que existe uma conservação de *C. elegans* como uma linhagem de células policlonais com uma forte assimetria da esquerda para direita (Houthoofd et al., 2008).

Brauchle et al. (2009) investigaram a embriogênese a partir de uma célula de embrião até quatro células em 34 espécies de nematoides do gênero Rhabditida e relacionaram estas espécies com *C. elegans*. Os autores encontraram 40 características celulares biológicas que demonstravam diferenças fenotípicas entre essas espécies. Através do rastreamento de mudanças

evolutivas em uma filogenia molecular verificou-se que essas características evoluíram várias vezes e de forma independente uma da outra.

Neste estudo, para ilustrar a diversidade existente, primeiro foi descrito um subconjunto de eventos precoces embrionários em *C. elegans* (Cowan e Hyman, 2004; Gönczy e Rose, 2005; Nigon et al., 1960) e, em seguida, foram apontadas as principais diferenças observadas em outras espécies. Em embriões de *C. elegans*, os corpúsculos polares, que são extrudados com uma meiose completa, encontraram-se quase que exclusivamente associados ao lado anterior (Goldstein e Hird, 1996).

Houthoofd et al. (2008) afirmaram que uma das características únicas do modelo biológico *C. elegans* é seu desenvolvimento invariável onde a linhagem de células gera um número fixo de células com um tipo celular fixo. Os mesmos autores concordaram que ainda não está claro como o desenvolvimento embriogênico evoluiu dentro do Filo Nematoda para chegar às linhagens de células complexas e sem variação como ocorre em *C. elegans*.

Durante este período, a membrana do embrião unicelular era contrátil. No entanto, logo após fertilização ocorreu a junção do DNA paterno ao centrôssomo (Albertson, 1984b). Então, as duas células do embrião que se formaram em seguida deixaram de ser assimétricas resultando em uma pseudoclivagem profunda no meio do embrião (Brauchle et al., 2009).

Esta dinâmica da membrana refletiu na reorganização da actomiosina durante o ciclo da primeira célula. Os dois pronúcleos se aglutinaram e, em seguida, o zigoto se dividiu assimetricamente. Uma manifestação das diferentes identidades de células no estágio de duas células é o centrôssomo circular nos blastômeros anterior AB, em relação ao centrôssomo em forma de disco no blastômero posterior P1 (Brauchle et al., 2009).

Estas diferentes formas são provavelmente consequência das diferentes forças dineína-dinactina-dependentes nos centrôssomos (Severson e Bowerman, 2003). Durante a próxima rodada de divisão celular, AB sempre se divide primeiro e é perpendicular ao eixo AP. Enquanto que P₁ se divide ao longo do eixo AP, levando ao típico arranjo romboide ou em forma de diamantes dos blastômeros no estágio de quatro células (Brauchle et al., 2009).

Com a finalidade de comparar a conservação evolutiva entre os nematoides *C. elegans* e *Diploscapter coronatus* Cobb durante embriogênese,

Lahl et al. (2009) mostraram diferenças no estágio de duas células e quatro células desses embriões. Em *C. elegans* uma rotação do complexo nuclear/centrossomo é encontrada somente na célula posterior P1. Em *D. coronatus* o isolamento das células indica que a rotação ocorre de uma forma autônoma de células em ambos os blastômeros, resultando em um arranjo linear de quatro células. Em *D. coronatus* um embrião linear de quatro células é formado. Esse arranjo também tem sido descrito em uma variedade de outros nematoides na literatura clássica, podendo se questionar se isso representa um padrão original ou é mais uma característica derivada. Em vez de um arranjo do embrião com blastômeros em quatro células em formato romboide, algumas espécies de nematoides apresentam um agrupamento linear ao longo do eixo ântero-posterior (Malakhov, 1994; Dolinski et al., 2001). Tal arranjo também é encontrado em *D. coronatus*, onde não só P1, mas também a célula AB forma um eixo de clivagem orientado longitudinalmente. Isso significa muito mais do que apenas uma variação de um padrão comum (Lahl et al., 2009).

2.3.1- Embriogênese comparativa do nematoide *R. culicivora* com outros organismos do Filo Nematoda

O estabelecimento da polaridade celular, linhagem celular e especificação de estruturas celulares já foram analisados detalhadamente no embrião de *C. elegans*. No entanto, estudos comparativos feitos com outros nematoides já revelaram diferenças marcantes entre espécies. Por exemplo, em *Acrobeloides nanus* de Man os blastômeros iniciais são pluripotentes e parecem competir por um destino principal. No entanto, células que adotam um programa de desenvolvimento pela perda de blastômeros podem ser substituídas por células vizinhas (Wiegner e Schierenberg, 1998, 1999).

Este e outros achados indicam que diferentes caminhos podem levar essencialmente ao mesmo resultado que é o nematoide formado. Como nematoides pertencem a um Filo antigo e diversificado (De Ley e Blaxter, 2002; Meldal et al., 2007) e muitas espécies podem ser cultivadas em laboratório, eles parecem ser excelentes candidatos para o estudo da evolução dos processos de desenvolvimento. Nas últimas décadas, várias tentativas foram feitas para se compreender melhor as relações filogenéticas entre os nematoides.

Tomando como base os dados da sequência do DNA, uma moderna filogenia de nematoides foi sugerida por Blaxter et al. (1998), ampliada e modificada por De Ley e Blaxter (2002). Recentemente foi feito um esquema demonstrando as relações entre os nematoides. Foram analisadas mais de 300 sequências SSU completas de DNAr de um grupo maior de espécies de nematoides. Essas sequências revelaram uma estrutura de doze dicotomias consecutivas que subdividiu o Filo Nematoda em doze clados (Holterman et al., 2006).

Estudos sobre o desenvolvimento de *Acrobelloides nanus* levaram a algumas descobertas inesperadas (Wiegner e Schierenberg, 1998, 1999). A embriogênese geral ocorre cerca de cinco vezes mais lenta do que em *C. elegans* (Lahl et al., 2009).

A embriogênese de representantes de clados 6-12 tem sido estudada por muitos pesquisadores (Sulston et al., 1983; Skiba e Schierenberg, 1992; Malakhov, 1994; Lahl et al., 2003; Houthoofd et al., 2003, 2007) e inclui o clássico modelo do organismo *Ascaris* (Boveri, 1899; Müller, 1903). Todos os nematoides mostram essencialmente o mesmo padrão de clivagem inicial comum à linhagem germinativa gerando um pequeno número de células somáticas fundadoras. Também o destino de distribuição parece ser semelhante entre esses táxons (Schulze e Schierenberg, 2008).

2.3.2- Estabelecimento da polaridade

Todos os embriões de nematoides estudados expressam uma clara polaridade inicial que pode ser facilmente visualizada pela primeira clivagem inicial assimétrica gerando uma célula anterior maior e uma posterior menor. Entretanto, a maneira de como essa polaridade é estabelecida parece variar não apenas entre *C. elegans* e espécies partenogênicas, mas também entre os outros nematoides (Lahl et al., 2006).

Em *C. elegans* uma pequena fração dos embriões mostra uma inversão da polaridade (Albertson, 1984a; Lahl et al., 2006), indicando uma entrada de espermatozoide na parte distal em vez do pólo próximo ao oócito (Lahl et al., 2006).

Analisando células-ovo não clivadas que tinham sido impedidas experimentalmente de serem estabelecidas, se percebe que apesar da ausência de espermatozoides em *A. nanus*, 98% dos embriões expressam uma polaridade ântero-posterior definida, embora com a orientação oposta em relação a *C. elegans*. Isso sugere uma diferença também nesta espécie partenogenética (Lahl et al., 2006).

Observações semelhantes têm sido feitas por Goldstein et al. (1998) em espécies hermafroditas do gênero *Acrobeloïdes* onde a posição de localização do esperma não tem qualquer relação sistemática com a polaridade embrionária. Eles sugeriram que em nematoides como os do gênero *Acrobeloïdes*, pela classificação atual pertencente à subordem Tylenchina (De Ley et al., 2006), independente do modo de reprodução, possuem um mecanismo diferente de *C. elegans*, que evoluiu para estabelecer a polaridade embrionária. Essa diferença coloca essas diferentes espécies em clados diferentes (Lahl et al., 2006).

Diferente é o caso de *D. coronatus*, onde a fixação do eixo de polaridade parece ser aleatória. Em relação às variações entre *A. nanus* e *D. coronatus* na formação da polaridade inicial não foi observada no final uma grande distorção temporária de ovócitos no tubo ovariano. Foram apresentadas evidências em certos insetos em que a distorção de células-ovo não fertilizados no ovipositor é insuficiente para ativar esses zigotos e estabelecer uma polaridade primária (Went e Krause, 1973).

Como os ovos de *Plectus* sp. estão presos em um estágio de uma célula impedida de ser vista, os autores não foram capazes de estudar em detalhe o estabelecimento da polaridade nesta espécie (Lahl et al., 2006). Olhando para o padrão de rearranjos intracelulares, Goldstein et al. (1998) sugeriram para uma outra espécie partenogenética de *Plectus* que com relação ao eixo de especificação do núcleo do oócito pode ocorrer uma demora sobre a função do núcleo do espermatozoide em *C. elegans*.

Embora seja uma hipótese sugestiva, parece ser demonstrado que espécies partenogenéticas fazem uso do mesmo mecanismo em geral para a especificação do eixo como encontrado em *C. elegans*. Isso ocorre através da interação entre os núcleos associados aos centrossomos, o que nesses casos, teriam que vir a partir do ovócito em vez do esperma e do córtex (Wallenfang e Seydoux, 2000; Cowan e Hyman, 2004). Se essa informação fosse verdadeira,

teria que se criar um evento de polarização agindo antes dos núcleos de oócitos e/ou centrossomos para se mover para uma posição periférica.

Em conjunto com a meiose, foi observado um movimento nuclear. No entanto, em contraste com *C. elegans*, nas espécies partenogenéticas estudadas como *D. coronatus*, *A. nanus* e *Plectus* sp. a região de formação do corpo polar não coincide com a futura região posterior ou anterior do ovo.

Uma mudança nas condições ambientais como, por exemplo, dentro ou fora da mãe ou do hospedeiro é, aparentemente, obrigatória para o início da clivagem. Isso ocorre em uma grande variedade de espécies de nematoides de vida-livre, como por exemplo, *Enoplus* sp. (Malakhov, 1994) e nematoides parasitas de humanos como, por exemplo, *Ascaris* sp. (Boveri, 1899). Embora seja provável que tal estratégia possa ser favorável para espécies parasitas, onde a infecção de novos hospedeiros é necessária, a vantagem para as espécies de vida livre é menos evidente e pode indicar uma estratégia que se adequa às condições ambientais para a postura dos ovos (Lahl et al., 2006).

Segundo Lahl et al. (2006), os ovos de *Plectus* sp. dentro da mãe reversivelmente são presos antes da primeira divisão. Isso indica que pelo menos nesta espécie partenogenética um bloqueio meiótico exista como em *C. elegans*. Esse bloqueio meiótico é liberado através de um sinal mediado pelos espermatozoides (Miller et al., 2001; Hajnal e Berset, 2002).

Os representantes partenogenéticos expressam variações distintas nos seus esforços para compensar as funções que em outras espécies são retomadas pelo esperma. Isso apoia a ideia de que o programa de desenvolvimento básico contém um considerável grau de plasticidade e que a partenogênese surgiu várias vezes de forma independente no Filo Nematoda (Lahl et al., 2006).

2.4- Reprodução em nematoides

O Filo Nematoda é muito diversificado e ocupa diferentes habitats desde os de vida livre que se alimentam de bactérias no solo até os parasitas obrigatórios de plantas e animais. Essa diversidade tem permitido a evolução de muitos diferentes tipos de reprodução e muitas características comportamentais relacionadas à reprodução. Geralmente discussões sobre comportamento reprodutivo só ficavam nos casos onde a troca genética ocorre entre os sexos. No

entanto, os nematoides têm desenvolvido mecanismos interessantes e não usuais para manter sua população tanto através da reprodução sexuada quanto da assexuada (Huettel, 2004).

Nos nematoides, a maioria dos caracteres sexualmente dimórficos são restritos à reprodução e ao sistema nervoso. Esses caracteres são bem desenvolvidos apesar de diferenças no tamanho corporal e produção de feromônio (Bone e Shorey, 1978) e duração de vida também ter sido observadas (McCulloch e Gems, 2003).

Todos os modos conhecidos de reprodução ocorrem em nematoides e, muitas vezes tanto a reprodução sexuada e assexuada ocorre dentro de um gênero. Em algumas espécies, onde a taxa sexual é a mesma entre machos e fêmeas, a reprodução ocorre geralmente através do acasalamento e troca sexual do material genético (Huettel, 2004).

Os nematoides em sua maioria possuem reprodução sexual convencional, com sexos morfologicamente distintos. Machos e fêmeas são diferenciados por vários caracteres além do tamanho e mobilidade de seus gametas: machos produzem gametas pequenos e móveis (geralmente em profusão), enquanto que as fêmeas produzem menos gametas, maiores e imóveis. Já as hermafroditas produzem ambos os gametas, e se reproduzem principalmente por autofecundação (Pires-daSilva, 2007).

A reprodução sexual realizada por machos e fêmeas é chamada anfimixia, onde os gametas são produzidos tanto pelo macho quanto pela fêmea e se fundem sofrendo meiose para formar o zigoto. Durante a meiose, os cromossomos diploides ($2n$) são reduzidos à metade para cromossomos haploides (n) através das divisões de redução nos espermatócitos em machos e oócitos em fêmeas. Os cromossomos são recombinados quando o núcleo do espermatozoide e do óvulo se unem voltando ao número de cromossomos diploides ($2n$). Os descendentes recebem metade dos cromossomos de cada parte, macho e fêmea. A combinação destes dois conjuntos de cromossomos permite a troca recíproca de genes, o que aumenta a variabilidade na descendência. A reprodução anfimítica é muito comum em muitas espécies de nematoides parasitas de animais, de plantas e de vida-livre (Huettel, 2004).

Como os nematoides se reproduzem principalmente por fertilização interna, todo um conjunto de sinais, estruturas corporais e comportamentos

evoluíram para o reconhecimento direcionado a um eficiente acasalamento e fertilização (Pires-daSilva, 2007).

As gônadas didélficas são provavelmente ancestrais para as fêmeas, no entanto, os machos geralmente têm um único testículo que se estende anteriormente (Hyman, 1951). Machos são delgados e têm vários sensores e estruturas copulatórias como espículos, gubernáculos e bursa na cauda que são utilizados para localizar a vulva e inseminar a hermafrodita em *C. elegans* (Pires-daSilva, 2007). O testículo do nematoide pode ser sob a forma dos testículos telogônicos generalizados, na qual as células germinativas são produzidas a partir de um único terminal celular. Outra forma existente de testículos são os testículos hologônicos, em que a proliferação das células germinativas ocorre ao longo de todo o comprimento do testículo (Justine, 2002).

Nos nematoides entomopatogênicos do gênero *Steinernema* após a entrada dos juvenis infectivos em seu hospedeiro, estes se desenvolvem em fêmeas anfimíticas (com aparelho genital feminino) ou em machos sendo a reprodução anfimítica ocorrendo em todas as gerações. No entanto, no gênero *Heterorhabditis*, diferente do gênero *Steinernema*, após a entrada do juvenil no inseto, estes se desenvolvem em hermafroditas com fenótipo de fêmea na primeira geração. As hermafroditas se autofecundam e esse tipo de reprodução é conhecido como um tipo de partenogênese, chamado pseudogamia. Essa reprodução dará origem aos juvenis que irão se diferenciar em machos e fêmeas de segunda geração. Após a diferenciação, fêmeas e machos maduros irão acasalar (reprodução anfimítica) e irão gerar juvenis que darão sequência ao ciclo com a saída destes do hospedeiro (Poinar Jr, 1990).

Músculos sexuais específicos e neurônios estão envolvidos na postura de ovos em hermafroditas, no acasalamento, cópula e comportamento locomotor nos machos (Pires-daSilva, 2007).

O sistema reprodutor feminino inclui um ou dois ovários, um receptáculo seminal, um ou dois úteros, uma vagina e uma vulva. Parece não haver órgãos sensoriais associados com a genitália feminina em nematoides. A fertilização interna através dos ductos genitais femininos é a regra geral em nematoides (Justine, 2002).

O aparelho reprodutor masculino geralmente inclui um testículo (raramente dois) que corre ao longo da maior parte do comprimento do

nematoide. O testículo tem uma zona distal de formação das células germinativas contendo as espermatogônias, que é uma zona que contém espermátócitos e espermátides, uma vesícula seminal e um ducto deferente que contém os espermatozoides (Justine, 2002).

Algumas espécies de nematoides se reproduzem assexuadamente e este modo de reprodução é chamado partenogênese. Em nematoides partenogenéticos não ocorre a presença de machos ou estes podem ocorrer raramente. Existem três tipos de partenogênese: apomixia, apomixia facultativa e automixia. A apomixia é o mais comum tipo de reprodução assexuada e a produção dos gametas ocorre através da mitose. Na reprodução mitótica, os cromossomos diploides se replicam nos oócitos localizados nos ovários da fêmea e permanecem $2n$ através da duplicação dos cromossomos. O núcleo se divide em dois núcleos idênticos, então não há troca de material genético (Huettel, 2004).

O segundo tipo de reprodução assexuada, a apomixia facultativa é também mitótico. Machos podem ser produzidos, mas geralmente só em resposta a estresse ambiental. Esses machos são geralmente não funcionais, mas em raros casos podem ser capazes de realizar trocas genéticas. Como no caso do gênero *Meloidogyne* em que o macho aparece em condições adversas (Huettel, 2004).

O terceiro tipo de partenogênese é chamado automixia. Nesse tipo de reprodução, as fêmeas produzem os oócitos que se dividem pela metade e cada oócito filho tem o número de cromossomos haploides (n). Através da recombinação meiótica, um oócito chamado corpo polar (n) e outro oócito chamado célula-filha (n) se fundem para formar o zigoto ($2n$).

Espécies de *C. elegans* possuem dimorfismo sexual, pois o macho aparece raramente (Kimble e Hirsh., 1979; Sulston e White., 1980). As hermafroditas são maiores, têm dois braços de gônada (didélficas), um par de órgãos onde o esperma está armazenado (espermatecas) e uma vulva (Kimble e Sharrock, 1983).

2.4.1- Comportamento sexual de nematoides

- Comportamento de Pré-cópula e cópula

Mudanças evolutivas no modo de reprodução dos metazoários exigem mudanças não apenas no desenvolvimento de tecidos reprodutivos, mas também no comportamento relacionado à reprodução (Garcia et al., 2007).

De acordo com Huettel (2004) o acasalamento dos nematoides tem sido relatado em muitas pesquisas. Segundo esse mesmo autor, um dos primeiros relatos foi feito por Anderson e Darling (1946) que observaram o comportamento sexual do nematoide parasita de planta *Ditylenchus destructor* Thorne.

Os relatos feitos por Huettel (2004) nesse estudo incluíram o comportamento de pré-cópula, tempo médio para a cópula ocorrer, ou seja, se a cópula não ocorresse no prazo de determinado tempo, esta não acontecia mais. Outras observações no estudo também foram feitas como a duração do estado receptivo das fêmeas e macho. Especulações em relação à função da bursa também foram feitas, os autores discutiram se ela servia para segurar ou não a fêmea durante a cópula. Eles também registraram a quantidade média de espermátides que foram injetadas pelo macho durante a cópula.

Em outro estudo, fêmeas de *Radopholus similis* Cobb e *Radopholus citrophilus* Huettel foram abordadas por machos e estes começaram a sondar o seu corpo antes do acasalamento ocorrer (Huettel et al., 1982). Os autores verificaram se o macho e a fêmea tinham a parte anterior direcionada no mesmo sentido durante o acasalamento. Informações sobre o tempo de duração do acasalamento e sobre a função da bursa antes e depois do acasalamento também foram relatadas.

Lauritis et al. (1983) em estudos feitos com os nematoides parasitas de plantas sedentários *Heterodera glycines* Ichinohe constataram se havia ou não sincronismo no tempo de maturação do macho e da fêmea para o estágio adulto migratório. Eles verificaram que essa informação era importante para que o acasalamento ocorresse. Huettel e Rebois (1982) estudaram a mesma espécie e verificaram o comportamento de pré-cópula e tempo de acasalamento. Existem fêmeas de *H. glycines* que são frequentemente rodeadas por inúmeros machos.

Huang e Becker (1999) também verificaram a orientação da extremidade anterior do macho e da fêmea durante o acasalamento do ectoparasita *Belonolaimus longicaudatus* Rau. Algumas informações novas como a taxa sexual de fêmeas e machos foram dadas neste estudo e também o tempo de duração da transferência do esperma. Também foram feitas descrições sobre o comportamento de pré-cópula.

Lewis et al. (2002) constataram que existem muitas diferenças no comportamento de acasalamento de dois nematoides entomopatogênicos, *Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, apesar desses nematoides compartilharem muitas características morfológicas e de história de vida. Durante a pesquisa, os autores avaliaram o tempo médio de atração do macho pela fêmea e a orientação da extremidade anterior do macho e da fêmea durante o acasalamento. Observações no comportamento sexual de *Steinernema carpocapsae* Weiser indicaram que o macho quando é atraído pela fêmea tem o comportamento de ser enrolar em volta dela próximo à região da vulva para que a cópula ocorra.

Luque et al. (2010) também verificaram que um comportamento semelhante também foi observado no nematoide parasita de animal *Hedruris spinigera* Baylis. O macho dessa espécie também se enrola em volta do corpo da fêmea durante a cópula.

Observações do comportamento copulatório de *H. bacteriophora* mostraram que é muito similar ao de *C. elegans*. Na referida espécie, o macho procura a vulva da fêmea dando voltas no corpo da fêmea. Depois que encontra a vulva o macho insere seus espículos e logo depois o esperma. A fase final é a colocação do “plug” ou tampão do macho na fêmea (Barr e Garcia, 2006). A posição para o acasalamento em *Heterorhabditis bacteriophora* é diferente de *Steinernema carpocapsae*, o macho se alinha paralelamente ao corpo da fêmea e não se enrola em torno dela como em *S. carpocapsae*.

Em outro nematoide de vida-livre *Rhabditis pellio* Schneider, o comportamento copulatório de machos e fêmeas envolveu o macho movendo seu corpo inteiro ao longo da fêmea antes da cópula ocorrer (Somers et al., 1976). Os machos também estenderam e retraíram seus espículos, o mesmo comportamento foi observado em *Radopholus* (Huettel et al., 1982). Durante a pré-cópula e a cópula ambos os machos e fêmeas continuaram a se alimentar. Este

comportamento contínuo de alimentação durante o acasalamento também tem sido relatado por Chin e Taylor (1969) em *Cylindrocorpus longistona* e *Cylindrocorpus curzii*. Em *Cruznema lambdiensis* só as fêmeas se alimentavam durante a cópula (Ahmad e Jairajpuri, 1981).

Existem menos informações sobre comportamento copulatório em nematoide parasitas de animal do que nematoide parasitas de plantas e de vida-livre justamente porque a cópula ocorre dentro de um órgão específico do animal que é o hospedeiro (Huettel, 2004).

Observações no comportamento copulatório de *Nematospiroides dubius* (= *Heligmosomoides polygyrus*) Bayhs foram relatadas por Sommerville e Weinstein (1964). Os nematoides acasalaram com suas extremidades anteriores em direções opostas. O macho usou sua papila lateral e ventral da bursa para prender a fêmea. Os espículos uma vez inseridos na vulva guiam o esperma para dentro do útero. No nematoide parasita de carneiro *Haemonchus* spp., o acasalamento interespecífico ocorre entre espécies próximas relatadas.

No estudo com *H. contortus* Bud e *H. placei* Place em infecções naturais e testes experimentais, os híbridos podem ser distinguidos pelo comprimento dos espículos (Lichtenfels et al., 1988). A hibridização indicaria que um sinal fraco quimiosensorial é produzido dentro dessas espécies próximas relatadas, e o comportamento não é específico o suficiente para prevenir o cruzamento.

Existem alguns comportamentos não usuais em outros nematoides parasitas de animais relatados na literatura. É o caso do nematoide *Anatrichomosa buccalis* Pence et Little, um nematoide parasita de gambás que habita a mucosa bucal do hospedeiro. O macho que não possui estruturas copulatórias move sua extremidade posterior para fêmea até o útero, através da vulva, para depositar seu esperma (Little e Orihel, 1972).

No nematoide marinho *Oncholaimus oxyurus* Heip o acasalamento foi descrito por Chabaud et al. (1983) como um evento diferente. A fêmea do nematoide desta espécie não possui a vulva. Para colocar o esperma dentro da fêmea, o macho faz punção no seu corpo com seus espículos. Para realizar isso, o macho usa a seta genital e a papila ventral da cauda para se ligar à fêmea. A glândula caudal do macho então secreta o material que segura a fêmea e que permite que a punção ocorra. Depois que a punção ocorre, os espículos se movem separadamente para ampliar o orifício e formar uma cavidade subcuticular

em forma de funil. Uma vez que o esperma entra na fêmea, este se move até o útero através de um órgão de transferência de esperma conhecido como o sistema demariano. O acasalamento dura até 20 minutos, seguido pela retirada dos espículos (Maertens e Coomans, 1978).

- Comportamento de pós-cópula e “plug” copulatório

Chitwood (1929) descreveu uma substância produzida pelos machos de *Rhabditis (Pelodera) strongiloides* Schneider depois da cópula que aderiu à vulva. Ele se referiu a este material excretado como um “saco” copulatório. A partir da primeira descrição, similares “sacos” copulatórios têm sido relatados por outros pesquisadores em muitos nematoides, incluindo o nematoide parasita de plantas *Scutellonema cavenessi* (Demeure et al., 1980), *Neodolichodorus rostrulatus* Siddiqi (Sarr et al., 1987), *H. glycines*, nematoide de vida livre *Acrobeloides* (Jairajpuri e Azmi, 1977), *C. elegans* (Barker, 1994; Liu e Sternberg, 1995) e alguns nematoides marinhos.

O “plug” copulatório também pode reduzir a atratividade da fêmea, receptividade (Shine e Mason 2000) e pode funcionar como reservatórios de esperma (Moreira et al., 2007). Essas vantagens que beneficiam os machos superam os custos de produção do “plug”. Essa é razão do “plug” copulatório ser documentado em uma ampla variedade de animais, incluindo insetos (Baer et al., 2001), aracnídeos (Fromhage et al., 2006), répteis (Moreira et al., 2007) e roedores (Ramm et al., 2005).

O “saco” copulatório pode ser produzido tanto pelo macho quanto pela fêmea, dependendo da espécie. Esse material secretado também é conhecido como “plug” ou “tampão” copulatório e parece ser semelhante aos “plugs” copulatórios em outros organismos como insetos e cobras (Parker, 1970; Shine et al., 2000). Em cobras, o “plug” copulatório tem sido descrito como uma barreira física para o acasalamento com outros machos depois da cópula.

Nos nematoides marinhos *Calomicrolaimus compridus* Gerlach a fêmea secreta o “plug” copulatório em duas partes. A glândula dorsal secreta um “plug” de hialina que cobre a vulva e a glândula ventral produz uma secreção granular que fecha a região invaginada da cutícula, onde a vulva está localizada (Gourbault e Vincx, 1988). Foi especulado que o “plug” é produzido também para

ajudar na aderência da fêmea durante a cópula ou para prevenir que esta copule com outros machos (Huttel, 2004).

Em observações de *H. glycines* em raízes *in vitro* feitas por monitoramento em vídeo, o “plug” copulatório foi visto sendo secretado pela própria fêmea depois da inseminação ter ocorrido. Ocorreu sempre um atraso de até 10 minutos antes do “plug” ser expulso da vulva da fêmea. Apesar de outro acasalamento poder ocorrer durante aquele lapso de tempo, isso não foi observado neste estudo.

Em outras espécies de nematoides, são os machos que produzem o “plug” copulatório. Em *Neodolichodorus rostrulatus*, a secreção pode vir dos vasos deferentes do sistema reprodutivo dos machos, especialmente na parte ventral e lateral de suas paredes (Sarr et al., 1987). Grânulos refrativos volumosos foram observados nos vasos deferentes se movendo dentro da cloaca e estes foram secretados presumivelmente para segurar a fêmea no lugar. A secreção foi descrita como uma massa volumosa e amarelada que ficou na fêmea e selou a vulva depois da cópula.

Sarr et al. (1987) propuseram, assim como Chitwood (1929), que o macho poderia liberar outras substâncias que dissolvem o suficiente deste material para liberá-lo da fêmea, mas eles não removem o “plug” copulatório. No entanto, estudos feitos por Barker (1994) sugeriram que é mais provável este “plug” fornecer garantia paternal do que manter os nematoides juntos. O autor encontrou duas linhagens de *C. elegans*, uma que produzia o “plug” e outra que não produzia. Nesse estudo os machos foram comparados para determinar se o “plug” interferia nos acasalamentos secundários. Observações foram feitas para verificar a duração dos acasalamentos e números de encontros entre machos e fêmeas com “plug” ou sem “plug”. A presença do “plug” diminui o número de acasalamentos secundários quando comparado às fêmeas sem “plug” e os machos foram menos atraídos pelas fêmeas que tinham o “plug”.

Estudos recentes mostram que o “plug” não só tem a função de impedir a deposição de esperma por outros machos, mas também pode: atuar como um presente nupcial para a fêmea após a cópula; ajudar a reduzir a perda ou saída de esperma após a inseminação; prevenir a infecção impedindo a entrada de patógenos e também pode estimular a fisiologia reprodutiva da fêmea podendo ter

nutrientes ou tendo propriedades antimicrobianas (Cutter, 2008; Timmermeyer et al., 2010).

Segundo Timmermeyer et al. (2010), o “plug” tem um efeito positivo na produção de ovos e no número de juvenis. Fêmeas com plug produzem 29% mais ovos e conseqüentemente JIs do que fêmeas sem plug. O “plug” atua beneficiando a fêmea e não serve só para impedir a competição entre machos.

2.4.2-Considerações evolucionárias na reprodução sexual dos nematoides

Considerando muitos tipos de reproduções encontradas em nematoides, é preciso refletir sobre o significado evolutivo das diferentes estratégias de acasalamento. Nenhum tipo de acasalamento é necessariamente consistente dentro de um gênero e nem existe uma consistência nos tipos de acasalamento de acordo com os habitats como, por exemplo, espécies parasitas ou de vida-livre. A anfimixia é vista ser a preferida para superar a pressão de seleção, como as novas variedades de hospedeiros, especialmente pelos nematoides parasitas obrigatórios, que devem ter um hospedeiro para completar seu ciclo de vida. A variabilidade genética aumentada é mais prontamente realizada através da anfimixia por causa da segregação e recombinação de genes. Existem várias hipóteses a cerca das vantagens da anfimixia (Kondrashov, 1993). Um dos benefícios imediatos da hipótese propõe que a reprodução anfimítica é vantajosa e que ela aumenta aptidão da progênie, reduz as mutações deletérias e beneficia na seleção, independentemente da troca recíproca de genes. Outra hipótese é a de variação e seleção que propõe a troca recíproca de genes e a que altera a variabilidade e resposta a seleção. Independente do mecanismo envolvido, muitos argumentos apontam as vantagens da anfimixia sobre a apomoxia.

Outra hipótese que sugere que as relações hospedeiro-parasita são melhores mantidas através da anfimixia é o princípio da “Rainha Vermelha” (Van Valen, 1973). O nome do princípio se refere à cena do livro “Alice no País das Maravilhas” ,no qual Alice e a Rainha permanecem no lugar apesar de sempre estarem correndo (Carroll, 1872). Usando esse princípio dentro das relações hospedeiro-parasita, mudanças no hospedeiro necessitariam de uma mudança similar ou uma adaptação do parasita. Por exemplo, se uma espécie hospedeira muda seu mecanismo de defesa então a espécie parasita teria de “correr” para

mudar seu mecanismo de invasão para que esta possa se manter viva. Outros exemplos das vantagens da anfimixia usando a hipótese da “Rainha vermelha” são que a reprodução sexual é vantajosa em interações bióticas (Bell, 1982), pois a segregação e recombinação gênica que ocorrem na reprodução anfimítica podem ajudá-lo a fugir da resposta imune do hospedeiro (Gemmill et al., 1997). Read e Viney (1996) sugerem que se um parasita fosse capaz de gerar novos genótipos através da reprodução sexual anfimítica, então ele poderia mais rapidamente fugir da imunidade genótipo-específica do hospedeiro.

A hipótese da “Rainha Vermelha” foi proposta para nematoides parasitas de animais que produzem machos só sob certas condições de estresse ambiental. Por exemplo, Gemmill et al. (1997) mostraram que juvenis de *Strongyloides ratti* Sandground eram mais propensos a se desenvolver em adultos sexuais de ratos que tivessem adquirido imunidade.

2.4.3- A evolução da reprodução automítica nos nematoides

Muitos nematoides são capazes de realizar reprodução automítica, na qual ocorre a produção de descendência por um único progenitor. Nesse modo de reprodução inclui o hermafroditismo e partenogênese, no qual o desenvolvimento da progênie ocorre a partir de ovos fertilizados e não-fertilizados, respectivamente. O hermafroditismo em nematoides é caracterizado pela produção de esperma e ovócitos por um mesmo indivíduo. Normalmente a morfologia externa dos hermafroditas é morfologicamente idêntica às fêmeas (Van Waerebeke e Remillet, 1973).

Na maioria dos nematoides hermafroditas um único órgão, o ovotestis, produz ambos os ovócitos e espermatozoides. Há cerca de 17.460 espécies de rhabditídeos com um ovotestis em 11 dos 44 gêneros (Sudhaus, 1976; Kiontke e Fitch, 2005; Herrmann et al., 2006).

A presença de um único ovotestis tem sido também encontrada em espécies partenogênicas, onde o esperma serve como um ativador da embriogênese, mas não contribui com o material genético para a próxima geração (Kruger, 1913). Pelo menos em 5 de 17 espécies com ovotestis tem sido confirmada a autofertilização para produção de zigotos por fusão de núcleo e que preenche os critérios para serem hermafroditas como: *C. elegans*, *C. briggsae*,

Oscheius tipulae CEW1 Winter *Pristionchus pacificus* Sommer e *H. bacteriophora* Poinar.

A análise filogenética indica que a interpretação mais parcimoniosa para a evolução de hermafroditismo é que esta evoluiu várias vezes entre os rhabditídeos (Kiontke e Fitch, 2005) e diplogasterídeos (Herrmann et al., 2006). A evolução dos autoférteis (ou seja, do hermafroditismo) parece estar associada a uma adaptação eficaz à baixa densidade populacional, que pode ser causada tanto pelos baixos números absolutos quanto pela baixa mobilidade (Clark, 1978; Ghiselin, 1979). Nos nematoides do gênero *Caenorhabditis*, o hermafroditismo foi proposto por ter evoluído duas vezes (Cho et al 2004; Kiontke et al 2004).

Este modo de reprodução é de grande vantagem para organismos que são pioneiros em novos ambientes, pois assegura a produção de descendência, na ausência de um parceiro para acasalamento. Esta vantagem, no entanto, tem o custo de um aumento no nível da endogamia levando à diminuição da diversidade genética (Pires-daSilva, 2007).

2.5- Feromônios sexuais em nematoides

O termo feromônio refere-se a substâncias liberadas por um organismo que causa respostas fisiológicas ou comportamentais em outro organismo da mesma espécie (Bone e Shorey, 1978). Embora a definição original implique na especificidade das espécies (Karlson e Butenandt, 1959), a comunicação interespecífica entre espécies estreitamente relacionadas também tem sido classificada como uma resposta ao feromônio (Haseeb e Fried, 1988), e a definição mais flexível pode ser adequada para a investigação sobre os feromônios sexuais de nematoides parasitas de plantas.

No primeiro relato de atração química entre nematoides, Greet (1964) usou tubos de ágar com machos e fêmeas do nematoide de vida livre *Panagrolaimus rigidus* Schneider separando-os por uma barreira de celofane onde encontraram ambos os sexos acumulados na barreira. Desde aquele momento, a existência de feromônios que são liberados de um ou ambos os sexos e que atraem nematoides do sexo oposto têm sido documentados para uma variedade de espécies de nematoides parasitas de plantas, parasitas de animais e de vida-livre (Anyia, 1976).

A atração mútua de machos por fêmeas e fêmeas por machos parece ser típica para vários nematoides zooparasitas, incluindo *Trichinella spiralis* Bonner and Etges, *Aspicularis tetraptera* Anya, e *Nippostrongylus brasiliensis* Bone. Bonner e Etges (1967) sugeriram que machos de *T. spiralis* exerceram um efeito repelente a outros machos. Este efeito que também ocorreu entre machos de *Rhabditis pellio* Somers. Tal reação repelente em *R. pellio* poderia ser vantajosa para manter uma distância entre membros competitivos do mesmo sexo para um aumento da probabilidade de acasalamento. Ambos os machos e fêmeas, de *R. pellio* são capazes de acasalar várias vezes. Esta continuada atividade reprodutiva está correlacionada com a constante secreção do feromônio por fêmeas e a resposta ao feromônio pelos machos (Somers et al., 1977).

Estudos sobre feromônios sexuais de nematoides têm sido amplamente revisados (Bone, 1987; Green, 1980, Greet e Perry, 1992; Huettel, 1986), e a maioria dos estudos têm sido feitos em nematoide parasitas de animais, *N. brasiliensis*, e espécies de *Heterodera* e *Globodera*, nesses últimos, os feromônios sexuais incluem voláteis, bem como frações não voláteis (Greet et al., 1968).

Para avaliar a circulação de forma mais eficiente em uma camada de solo, Luc et al. (1969) marcaram *Hemicycliophora paradoxa* Luc com fósforo radioativo e depois seguiram os nematoides pela medição das variações de radioatividade no solo em diferentes lugares e épocas. Usando esta técnica, eles confirmaram observações anteriores (Luc, 1961) que exudatos de raízes hospedeiras foram atraentes e estimularam a atividade do nematoide. A partir destes estudos pioneiros, uma quantidade considerável de informações tem se acumulado sobre as respostas comportamentais de várias espécies de nematoides parasitas de plantas que são atraídos para a cópula e/ ou para as raízes. O espaço impossibilitou todos os detalhes da investigação sobre a análise comportamental de nematoides parasitas de plantas, mas os dois aspectos já mencionados, as respostas aos feromônios sexuais e as respostas aos componentes da atividade da raiz são importantes devido à sua relevância para possíveis novas estratégias de controle baseados na ruptura da percepção sensorial do nematoide.

O conhecimento da natureza química dos feromônios sexuais de nematoide é praticamente inexistente. Nenhum feromônio de nematoide foi

identificado, exceto para a proposta de Stringfellow (1974) que demonstra as funções do íon $[-OH]$ como um feromônio em *Pelodera strongyloides* Schneider. Embora o gradiente de pH possa realmente estar envolvido na estimulação do nematoide de alguns comportamentos, é razoável pensar que o comportamento antes da cópula contenha mais estímulos específicos. Greet (1964), no primeiro relato de feromônio sexual de nematoides, demonstrou que o feromônio da fêmea de *Panagrolaimus rigidus* Schneider era solúvel em solução aquosa de ágar. Esta solubilidade aquosa foi confirmada para todas as espécies dos nematoides investigados de forma direta ou indireta.

3. TRABALHOS

**CHARACTERIZATION OF CHROMOSOME NUMBER OF THE
ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE *Heterorhabditis baujardi* LPP7
(RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE)**

Inês R. Machado¹, Claudia Dolinski¹, Carlos Eduardo Winter²

¹LEF/CCTA/Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
Av. Alberto Lamego, 2000, 29013-602, inesuenf@yahoo.com.br,
claudia.dolinski@censanet.com.br, tel. (22) 2732-1877

²Department of Parasitology/ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508-900 Sao Paulo – BRASIL

Submitted to Canadian Journal of Zoology

ABSTRACT

Steinernema and *Heterorhabditis* are entomopathogenic rhabditids that are used for the biological control of many insect pests. There has been recent interest in aspects related to chromosome number of these nematodes. Knowing more about the chromosomes of entomopathogenic nematodes would help the study of gene localization in chromosomes by in situ hybridization. The purpose of this study was to determine the chromosome number of *H. baujardi* LPP7. This would provide important information for future research in genetic improvement programs. DAPI staining of *H. baujardi* LPP7 oocyte preparations showed 7 bivalent chromosomes. As expected, *H. baujardi* LPP7 has holocentric chromosomes without a defined centromere.

Keywords: karyotyping, oocyte preparations, holocentric chromosomes, DAPI staining, Rhabditida.

INTRODUCTION

Phylum Nematoda is highly diverse in terms of species richness and is one of the most abundant metazoan groups on earth (Platt 1994). It is estimated that nematodes comprise nearly 90% of all multicellular organisms. Lamshead (1993) predicted the number of nematode species to be as high as one hundred million, although only 26,646 species have been described thus far from all habitats (Hugot et al. 2001). This evolutionary plasticity, which hints at an underlying genetic plasticity, has long fascinated biologists (Coghlan 2005).

It is important to know the genome structure studies of other nematode species to have a better idea of how genome evolution occurs within this phylum (Ahn and Winter 2006).

Most nematodes have genomes ranging from 50 to 250 Mb (Leroy et al. 2003). Among the nematodes being sequenced, sizes vary from 53 Mb for *Haemonchus contortus* (Leroy et al. 2003) to 240 Mb for *Trichinella spiralis* (Hammond and Bianco 1992). A few nematodes even have genomes as large as those of mammals, such as the ~2100 Mb genome of *Parascaris univalens* (Niedermaier and Moritz 2000).

According to Mitreva et al. (2005) nematode genomes, like those of other eukaryotes, are organized as multiple chromosomes, except in the case of *Parascaris univalens*; nematode haploid chromosome number (n) goes up to 40, but in general is between four and eight (Walton 1959).

Parascaris univalens has a single large chromosome (~2 Gb) in its germ-line cells. This species undergoes chromatin diminution in its somatic cells, a process whereby large germ-line chromosomes are specifically cleaved in particular regions to yield many thousands of minichromosomes (Muller and Tobler 2000).

Among the Rhabditid nematodes, which include the model organism *Caenorhabditis elegans*, there are six chromosomes in the haploid complement. Analyses of the *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae* genomes suggest that they display great differences in gene content (Coghlan 2005). The mitotic chromosomes of *C. elegans*, and those of certain other organisms, including some plants, protozoa, insects, and other nematodes, are remarkable for having a well-

differentiated kinetochore that extends along the entire poleward face of the metaphase chromosome (Riddle et al. 1997).

C. elegans chromosomes, like those of nematodes in general, do not have a single centromere. At mitosis, spindle microtubules attach at multiple points along the chromosome (Albertson and Thomson 1982)

Steinernema and *Heterorhabditis* are entomopathogenic rhabditids that are used for the biological control of many insect pests. Although aspects of the physiology, morphology and host-parasite relationships have been extensively studied (Gaugler and Kaya 1990), at the genomic level there is a genome project with *H. bacteriophora* TTO1, and a lot of cDNAs have already been deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Bai et al. 2009).

Curran (1989) studied chromosome numbers of *Steinernema* and *Heterorhabditis* species. However, this author proposed to use these data as a useful tool for taxonomy to supplement morphological data in the families Steinernematidae and Heterorhabditidae.

There has been recent interest in using these approaches to investigate the gene localization in chromosomes. Genetic improvement programs are underway in Europe, the USA and Australia, particularly on gene tagging and genetic transformation of these nematodes (Grenier et al. 1997).

Cytological preparations of metaphase chromosomes are made by squashing younger embryos, which contain a higher proportion of dividing cells. The chromosomes lack a primary constriction and are rods, a few microns in length (Albertson 1984).

The purpose of this study was to determine the number of chromosomes of *H. baujardi* LPP7, so as to provide useful information for future research such as the investigation of certain genes located on chromosomes in genetic improvement programs.

MATERIALS AND METHODS

H. baujardi LPP7 karyotyping

Second-generation of adult females from *Galleria mellonella* cadavers were hand dissected, using a small piece of razor blade, with a cut below the pharynx under a stereomicroscope in 10 μ L of S buffer over a gelatin-coated glass slide (Miller and Shakes 1995). The gonads were stretched with a fine quartz capillary (less than 5 μ m outer diameter). A siliconized coverslip was placed over the preparation. In preparations where an incomplete squash of the gonad was needed, a small number of 5 μ m glass beads was added to the S buffer. The squash was dipped into liquid nitrogen for a few seconds and the coverslip was rapidly removed with a dissecting scalpel blade. The slide containing the frozen sample was then maintained in methanol at -20°C for at least 30 min. The fixed samples were air dried and then stained with DAPI (20 ng/mL in water) for 5 min. After brief destaining in high-purity water and drying at room temperature, the slides were mounted with 10% glycerol and observed through a Zeiss Axiophot fluorescence microscope. Photographs were taken with a Hamamatsu chilled CCD camera (model C5985-02; Hamamatsu Co., Hamamatsu, Japan).

RESULTS AND DISCUSSION

More than 50 preparations were done. DAPI staining of *H. baujardi* LPP7 oocytes in the central part of the gonad preparations showed 7 bivalents (Figure 1). The chromosome showed characteristic holocentric without a defined centromeric locus.

Most nematodes have haploid chromosome numbers of $n=4-12$ (Walton 1959). The karyotypes of just ~300 species have been studied, but nematodes display a lot of karyotypic variation (Špakulová and Casanova 2004). The lowest haploid number is $n=1$ in *Parascaris univalens*, but very high counts are seen in polyploid species in the Tylenchomorpha.

For example, the race of *Meloidogyne hapla* being sequenced is diploid and $n=14$, but another race of *M. hapla* is polyploid with $2n=45-48$ (Triantaphyllou 1984). Many tylenchomorphs, including *M. hapla*, are parthenogens, in which

unfertilized eggs develop into new individuals. Animal species that reproduce in this way seem to be susceptible to polyploidization (Otto and Whitton 2000). The *M. hapla* race being sequenced has twice as many chromosomes as most rhabditines, so could reveal traces of an ancient genome duplication in the Tylenchomorpha.

In contrast to the tylenchomorphs, most rhabditids have $n=5-6$ (Blaxter 2000). Indeed, *C. elegans* and *C. briggsae* both have $n=6$, even though their chromosomes have undergone ~4000 rearrangements since they diverged (Stein et al. 2003). The lack of fissions or fusions suggests that there could be selection for a stable chromosome number in the Rhabditina.

According to Curran (1989) chromosome number is conserved amongst species within the genera *Heterorhabditis* ($n=7$). However the haploid complement of *Steinernema* sp. comprises 5 chromosomes with the exception of the *Steinernema* NC 513 group of isolates ($n=3$). *H. baujardi* LPP7 showed 7 bivalent and mitotic chromosomes. Ahn and Winter (2006) reported that *O. tipulae* had a haploid complement of 6 chromosomes, confirming that rhabditines also have a very conservative karyotype.

The wild-type metaphase karyotype of *C. elegans* consists of 12 chromosomes in hermaphrodites, five pairs of autosomes and two sex chromosomes, and 11 chromosomes in males, which have a single sex chromosome. Mitotic stages are most easily visualized in developing embryos, where the chromosomes display many of the characteristic features of holocentric chromosomes that distinguish them from monocentric chromosomes. At metaphase, each chromosome is oriented within the spindle parallel to the equator, whereas anaphase figures suggest that the entire chromosome moves broadside the poles (Albertson and Thomson 1982).

In *H. baujardi* LPP7 in the mitotic stage it is possible to see some characteristic features of holocentric chromosomes that distinguish them from monocentric chromosomes. According to Dernburg (2001), holocentric chromosomes bind to microtubules along their entire length without a defined centromeric locus and move broadside to the pole from the metaphase plate. This feat may be accomplished by distinct mechanisms in different holocentric organisms. In *Parascaris univalens*, microtubule attachment during meiosis appears to be restricted to a large heterochromatic region near one end of the lone

chromosome pair, in effect making meiotic chromosomes monocentric (Goday and Pimpinelli 1989).

In conclusion, it is possible that there is some selection mechanism for a stable chromosome number ($n=7$) inside 8 species from the genera *Heterorhabditis* because the species *H. baujardi* LPP7 showed the same number of chromosomes.

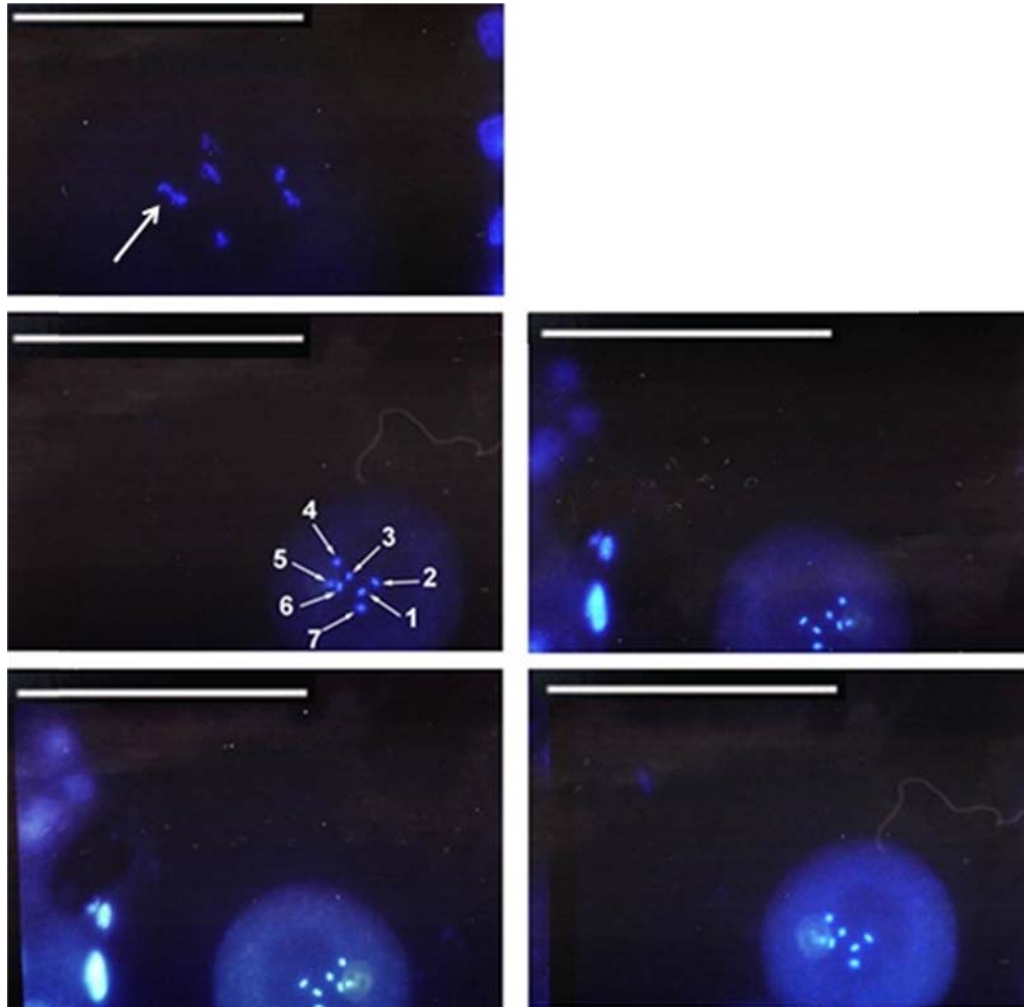


Figure 1. DAPI stained slides of female *H. baujardi* LPP7. Bar = 50 μ m. Arrow indicates the characteristic holocentric chromosome without a defined centromeric locus.

REFERENCES

- Ahn, Y., Winter, C.E. (2006) The genome of *Oscheius tipulae*: determination of size, complexity, and structure y DNA reassociation using fluorescent dye. *Genome*, 49: 1007-1015.
- Albertson D.G. (1984) Localization of the ribosomal genes in *Caenorhabditis elegans* chromosomes by in situ hybridization using biotin-labeled probes. *Embo J*, 3:1227–1234.
- Albertson D.G., Thomson J.N. (1982) The kinetochores of *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma*.; *In*: Riddle, D.L. Blumenthal, T., Meyer, B.J. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY). p. 409–442.
- Bai X., Adams, B. J., Ciche, T.A., Clifton, S., Gaugler, R., Hogenhout, S.A., Spieth, J., Sternberg, P. W., Wilson, R.K., Grewal, P.S. 2009. Transcriptomic analysis of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* TTO1. *BMC Genomics*, 10: 205.
- Blaxter, M. (2000) Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms. *Int. J. Parasitol*, 30: 347–355.
- Coghlan, A. (2005) Nematode genome evolution. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/ wormbook.1.15.1.
- Dernburg, A.F. (2001) Here, There, and Everywhere: Kinetochores Function on Holocentric Chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, 153: F33–F38.
- Gaugler, R., Kaya, H.K. (1990) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Goday, C., Pimpinelli, S. (1989) Centromere organization in meiotic chromosomes of *Parascaris univalens*. *Chromosoma*, 98: 160–166.

- Grenier, E., Catzefflis, F.M., Abad, P. (1997) Genome sizes of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida). *Parasitology*, 114: 497-501.
- Hammond, M.P., Bianco, A.E. (1992) Genes and genomes of parasitic nematodes. *Parasitol Today*. 8: 299–305.
- Hodgkin, J. (2005) Karyotype, ploidy and gene dosage. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.3.1.
- Hugot, J.P., Baujard, P., Morand, S. (2001) Biodiversity in helminthes and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3:199-208.
- Leroy, S., Duperray, C., Morand, S. (2003) Flow cytometry for parasite nematode genome size measurement. *Mol. Biochem. Parasitol*, 128: 91–93.
- Mitreva, M., Blaxter, M.L., Bird, D.M., McCarter, J.P. (2005) Comparative genomics of nematodes. *Trends in Genetics*, 21: 573-581.
- Miller, D.M., Shakes, D.C. (1995) Immunofluorescence microscopy. *Meth. Cell Biol*, 48: 65-394.
- Moore, L.L., Morrison, M., Roth, M.B. (1999) HCP-1, a protein involved in chromosome segregation, is localized to the centromere of mitotic chromosomes in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol*, 147: 471–480.
- Muller, F. and Tobler, H. (2000) Chromatin diminution in the parasitic nematodes *Ascaris suum* and *Parascaris univalens*. *Int. J. Parasitol*, 30: 391–399.
- Niedermaier, J., Moritz, K.B. (2000) Organization and dynamics of satellite and telomere DNAs in *Ascaris*: implications for formation and breakdown of compound chromosomes. *Chromosoma*, 109: 439–452.

Oliveira, C.M.G., Monteiro, A.R., Blok, V.C. (2011) Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. *Tropical Plant Pathology*, 36 (2): 065-073.

Otto, S.P., Whitton, J. (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet*, 34: 401–437.

Platt, H.M. (1994) Foreward. *In* The phylogenetic systematics of free-living nematodes. *Edited by* S. Lorenzen. London: The Ray Society. pp. i-ii.

Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., Priess, J.R. 1997. *In*: Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J. *C. elegans* II. Priess Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Špakulová, M., and Casanova, J.C. 2004. Current knowledge on B chromosomes in natural populations of helminth parasites: a review. *Cytogenet. Genome Res*, 106: 222–229.

Stein, L.D., Bao, Z., Blasiar, D., Blumenthal, T., Brent, M.R., Chen, N., Chinwalla, A., Clarke, L., Clee, C., Coghlan, A., Coulson, A., D'Eustachio, P., Fitch, D.H., Fulton, L.A., Fulton, R.E., Griffiths-Jones, S., Harris, T.W., Hillier, L.W., Kamath, R., Kuwabara, P.E., Mardis, E.R., Marra, M.A., Miner, T.L., Minx, P., Mullikin, J.C., Plumb, R.W., Rogers, J., Schein, J.E., Sohrmann, M., Spieth, J., Stajich, J.E., Wei, C., Willey, D., Wilson, R.K., Durbin, R., Waterston, R.H. 2003. The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *Plos. Biol*, 1(2): E45.

Triantaphyllou, A.C. (1984) Polyploidy in meiotic parthenogenetic populations of *Meloidogyne hapla* and a mechanism of conversion to diploidy. *Rev. Nematol*, 7: 65–72.

Walton, A.C. (1959) Some parasites and their chromosomes. *J. Parasitol*, 45: 1–20

**EARLY EMBRYOGENESIS OF *Heterorhabditis baujardi* LPP7 FROM
THE AMAZONIAN RAINFOREST IN MONTE NEGRO-RO**

Machado, I.R¹., Dolinski, C.M²., Lara, F³.

ABSTRACT

Nematodes are great models for basic studies related to embryogenesis due to its transparency, small number of cells and short life cycle. The asymmetric cleavage pattern which divides the somatic cells of the founder germ already is well-known in the other nematodes. This information allows phylogenetic studies. We have chosen *Heterorhabditis baujardi* LPP7 as our object of study, because it is being used in the field for insect pest biological control. This specie was obtained from the Amazon Forest (Monte Negro, Rondônia). It was cultured in vivo with *Galleria mellonella* as insect host. *H. baujardi* strain LPP7 females were collected manually after seven days from infected cadavers of *Galleria mellonella*. It were dissected in Ringer's solution and their eggs were put into cell culture plates with optical bottom. The events were recorded under an inverted microscope equipped with Observer.Z1 Axio Definite Focus at 36°C. We followed

embryonic cell divisions up to the beginning of the “morphogenesis stage” when a ventral indentation visibly separates the head from the tail region. *H. baujardi* LPP7 has a synchronous pattern with blastomeres organized in a rhomboidal pattern and the founder cell P4 is established late, after the sixth cleavage. Comparing the initial steps of embryo division in *H. baujardi* LPP7 with *C. elegans*, it was possible to verify that these species are phylogenetically close to being located in the same clade 9. Few differences between *C. elegans* and *H. baujardi* LPP7 were noted in the initial cell pattern, such as centrosome shape, which is disc-shaped in *C. elegans*. The rhomboidal or diamond pattern of the four-cell stage was also observed in *H. baujardi* LPP7 and corroborating to Dolinski et al. (1998), this pattern seems to have evolved several times within the phylum Nematoda.

KeyWords: Rhabditida, cell division, phylogeny, clades, evolution, blastomeres.

INTRODUCTION

One major goal of embryogenic studies is to understand the mechanisms of phenotypic changes in the organisms (Gerhart and Kirschner, 1997, Hartwell et al. 1999; Wilkins, 2002). However, such changes are of great significance for understanding cell homology and consequently for phylogenetic studies (Brauchli et al., 2009).

Nematodes are good models for exploring the morphology and development of evolution due to their small number of cells, transparency and short life cycle (Fitch, 1997; Felix and Sternberg, 1997; Dolinski et al. 1998; Felix, 1999, Sommer et al., 1999, Felix et al., 2000).

The pattern of cleavage in nematodes includes an initial series of asymmetric cleavages sequentially separating a small number of somatic cell lineages of the founder germ. This process was originally identified in *Ascaris* (Boveri, 1899) and has been extensively studied in detail in *Caenorhabditis elegans* Maupas (Lahlou et al., 2009).

Several studies with rhabditids have been done and striking differences have been shown in early embryogenesis in some species (Felix, 1999; Goldstein, 2001; Malakhov, 1994; Schierenberg, 2006; Dolinski et al., 2001).

These differences include mechanisms to establish the anterior-posterior axis embryo in a single cell (Goldstein et al., 1998) and to assign cell fates (Wiegner and Schierenberg, 1998), or embryonic cell line patterns (Skiba and Schierenberg, 1992; Dolinski et al. 2001; Vangestel et al, 2008). In addition, to examine diversity in an evolutionary context, it is essential to have a good hypothesis of the phylogenetic relationships among the species studied.

A phylogeny study was published for rhabditis nematodes (Kiontke et al. 2007) and provides data to accurately map the trajectories of the evolution of rhabditids' phenotypic changes. These rhabditids nematodes are closely related to the widely studied model organism *C. elegans* (Brauchli et al., 2009). Most recently a scheme was created showing the relationships between the nematodes. Complete SSU rDNA sequences from a larger group of nematode species were

analyzed. These sequences revealed a structure of twelve consecutive dichotomies that subdivided the phylum Nematoda into twelve clades (Figure 1) (van Megen, 2009). However, there are only a few studies on the embryogenesis of other members of the Rhabditidae located in clades 9 together with *C. elegans* (Fig. 1), which are being considered near the roots of nematode phylogeny (Blaxter et al, 1998; Aleshin et al, 1998). When compared to *C. elegans*, species already studied from this family show many similarities in the process of embryogenesis, although they also show important differences (Schulze and Schierenberg, 2009).

To better understand the evolution of nematode development, the identification of plesiomorphic and apomorphic characters is required, as has been done with great success on the morphological and recently also on the molecular level. For this approach a sufficient number of representatives need to be studied and their pattern projected on a solid established phylogenetic tree (De Ley and Blaxter, 2002; Holterman et al., 2006; Meldal et al., 2007, van Megen, 2009).

We have chosen *Heterorhabditis baujardi* LPP7 as our object of study, because it is being used in the field for insect pest biological control. Minas et al. (2011) evaluated the potential of the nematode *H. baujardi* LPP7 in terms of biological control of L3 larvae of the Mediterranean fly, *Ceratitis capitata* Wiedemann in laboratory. The nematode caused 85% of mortality in the first test and 83% in the second. *Heterorhabditis baujardi* LPP7 was obtained from the Amazon Forest (Monte Negro, Rondônia state). These nematodes were identified based on their morphology and molecular biology (Dolinski et al., 2008).

MATERIAL AND METHODS

Heterorhabditis baujardi LPP7 was obtained from the Amazon Forest (Monte Negro, Rondônia). It was cultured in vivo with *Galleria mellonella* as insect host. The experiment was conducted at the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) / Oswaldo Cruz Institute / Leprosy Pavilion. *H. baujardi* strain LPP7 females were collected manually after seven days from infected cadavers of *Galleria mellonella*. These females were dissected in Ringer's solution and their eggs were put into cell culture plates with optical bottom. The events were recorded under an inverted microscope equipped with Observer.Z1 Axio Definite Focus at 36°C. We followed embryonic cell divisions up to the beginning of the “morphogenesis stage” when a ventral indentation visibly separates the anterior part from the tail region. However, due to limited transparency we followed the division until 6 cells were reached. Five recordings were made. The posterior of the embryo part was defined when the smallest blastomere P₁ was located. The divisions were followed on the same eggs to determine the relative time of cleavage to the founder germ cell, P4. In addition, for each species the development of one or more eggs was followed until hatching to demonstrate that the early-development observations were not aberrant for this species, and indeed that development of this individual was normal.

Definition of characters

The characters were based on studies by Dolinski et al. (2001) and Brauchle et al. (2009). The characters are:

- Early or late establishment of the germ founder cell, P4 After sixth cleavage P4 is established. P4 can be established late, for example, after ninth blastomere stage or later.
- Synchronous or asynchronous rate At four-cell stage if the development of AB and P₁ lineages is proceeding at a synchronous or an asynchronous rate. When it is synchronous, the first four blastomeres are from the same

second generation cleavage (ABx, EMS, P2) and they are of the same size. If is asynchronous the four blastomeres are from different generations and are of different sizes.

- Oblique or linear arrangement of blastomeres During AB and P1 cleavages at the four-cell stage the arrangement of blastomeres can be oblique (a rhomboidal pattern) or linear (anterior–posterior tandem).
- Polar body localization. The polar body can be associated with the anterior or posterior side of the embryo.
- Pseudocleavage The pseudocleavage can divide the cell asymmetrically on the back P1 lower than the previous AB or not.
- Centrosome shape Different shapes are thought to be a consequence of different dynein–dynactin-dependent forces on the centrosomes and it can have different shapes.
- Spindle orientation When AB divides first, it can be perpendicular to the anterior posterior axis, leading to a typical rhomboidal blastomere arrangement at the four-cell stage.

RESULTS AND DISCUSSION

H. baujardi LPP7 has a synchronous pattern with blastomeres organized in a rhomboidal pattern (Fig. 3d) and the founder cell P4 is established late, after the sixth cleavage.

In *C. elegans* the daughters of AB show a similar early cleavage pattern and are initially of equal developmental potential, but become moderately different from each other because of specific inductive interactions (Schnabel and Priess, 1997).

Previous studies have shown that embryos of different species of nematodes develop in different ways (Felix, 1999, Dolinski et al. 2001, Goldstein 2001, Goldstein et al, 1998; Malakhov, 1994; Schierenberg, 2006).

Based on Brauchle et al. (2009) studies to illustrate this diversity first described a subset of early embryonic events in *C. elegans* (Cowan and Hyman,

2004; Gönczy and Rose, 2005; Nigon et al., 1960) and then pointed indicated the main differences that were observed in other species comparing with *H. baujardi* LPP7.

In *C. elegans* embryos, polar bodies, which are extruded as complete meiosis, are found almost exclusively in association with the anterior side (Goldstein and Hird, 1996) (Figure 2A).

Differences in all cellular events are observed when other species are compared with *C. elegans*. In *Rhabditella axei* a reversal of polarity happens: one polar body is often associated with the future posterior side (Fig. 2B; characteristic 5) not the anterior side as in *C. elegans*. It suggests amendments in establishment of polarity. In *H. baujardi* strain LPP7 the polar body also defines the anterior side of the embryo. According to Brauchle et al. (2009), the entire embryo membrane of a single cell of *C. elegans* is contractile (“ruffling”). However, soon after fertilization, the paternal DNA joins the centrosome (Albertson, 1984). This contraction divides the cell asymmetrically resulting in a profound pseudocleavage in the middle of embryo, leaving the posterior part P1 lower than the previous AB.

In *H. baujardi* strain LPP7 the same is observed: the membranes constrict, characterizing a pseudocleavage and dividing the cell asymmetrically on the back P1 lower than the previous AB. In *Romanomermis culicivorax*, however, the cell divides symmetrically in AB and P1, with each part being the same size (Schulze and Schierenberg, 2009).

In *C. elegans* the embryo posterior end has a disc-shaped centrosome (Brauchle et al., 2009). According to Severson and Bowerman (2003) these different shapes are thought to be a consequence of different dynein–dynactin-dependent forces on the centrosomes (Severson and Bowerman, 2003).

Different behavior is observed in the *H. baujardi* LPP7 embryo where dynein–dynactin-dependent did not force the centrosomes. Thus, the *H. baujardi* LPP7 centrosome shape is rounded (Figure 2L), unlike *C. elegans*.

In *C. elegans*, in cell division AB always divides first (Fig. 2M; characteristic 34 in Fig. 2) and this division is always perpendicular to the axis AP (Fig. 2P; characteristic 36 in Fig. 2), while P₁ divides along the axis AP, leading to a typically rhomboidal blastomere at the stage of four cells (Brauchle et al., 2009).

Unlike the sequence of events in the two-cell stage in *C. elegans*, in *Protorhabditis*, the cell P₁ is smaller if it divides first (Fig. 2Q). In other species, for

example, *Oscheius myriophila*, cells AB and P₁ divide at the same time (Fig. 2N). These types of differences have been seen before in species more distantly related to *C. elegans* (Dolinski et al, 2001; Malakhov, 1994; Schierenberg, 2006; Skiba and Schierenberg, 1992).

Dolinski et al., 2001 stated that *Protorhabditis* sp. (JB122) (Fig. 2Q) and other species of *Protorhabditis* showed a remarkable development that causes a change in cell-cell contact: both blastomeres divided along the axis AP, giving rise to a linear blastomere arrangement at the four-cell stage, such that ABp and P₂ did not contact one another.

In *H. baujardi* LPP7, AB divides first and this division is always perpendicular to the anterior-posterior axis, generating a typical rhomboidal aspect at the four-cell stage.

Thus, as in *C. elegans*, in *H. baujardi* strain LPP7 AB also splits first, and the division is also perpendicular to the axis AP (Figure 2). The rhomboid pattern in *H. baujardi* strain LPP7 also appeared soon after the division of P₁ (Fig. 3).

In conclusion, comparing the initial steps of embryo division in *H. baujardi* LPP7 with *C. elegans*, it was possible to verify that these species are phylogenetically close to being located in the same clade 9. Few differences between *C. elegans* and *H. baujardi* LPP7 were noted in the initial cell pattern, such as centrosome shape, which is disc-shaped in *C. elegans*. The rhomboidal or diamond pattern of the four-cell stage was also observed in *H. baujardi* LPP7 and corroborating Dolinski et al. (1998), this pattern seems to have evolved several times within the phylum Nematoda.

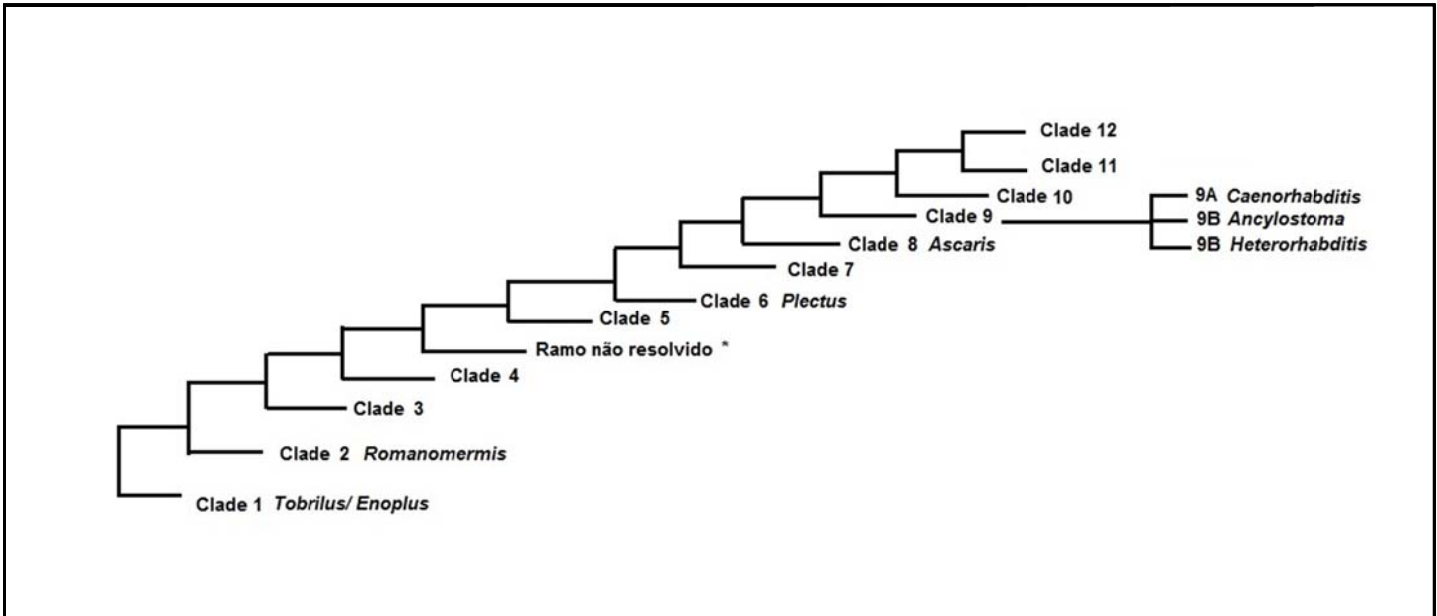


Figure 1. Phylogenetic tree of nematodes made from rDNA sequence data (van Megen). The tree is divided into twelve clades (1-12) and an unresolved branch (*). The length of the branches reflects replacement rates. The representatives are selected from studies of early embryogenesis.

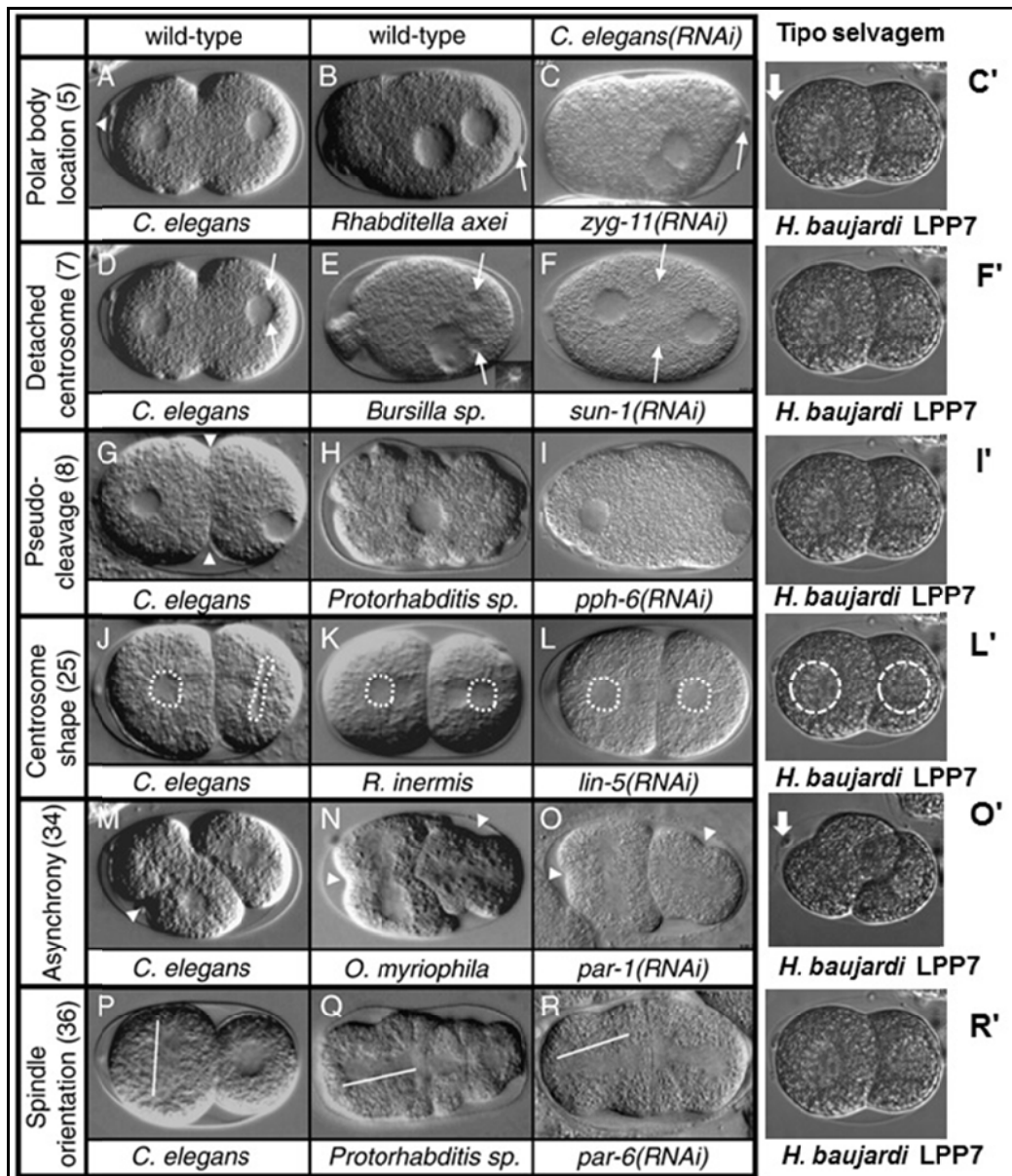


Figure 2. RNAi experiments in *C. elegans* mimicking phenotypes in other species. A, D, G, J, M, P (first column): images of cellular events in DIC *C. elegans* wild-type. B, E, H, K, N, Q (second column): wild-type phenotypes in other rhabditid species. C, F, I, L, O, R (third column): phenotypes obtained in experiments with RNAi in *C. elegans*. C', F', I', L', O', R' (fourth column): phenotypes obtained in experiments with *H. baujardi* LPP7 strain. All embryos are oriented with the front to the left. The characteristics are: Location posterior pole body (B, C; arrow) or earlier (A; arrowhead) centrosomes (arrows) attached to the pronucleus (not initially visible DIC) (D) or separated from the pronucleus (E, F) (E immunostaining with tubulin at the stage of one cell). The embryo *Bursilla* sp. PS1179 confirms presence of microtubule organizing centers highlighted in pseudocleavage

(arrowheads) as present (G) or absent (H, I, observed that contractility is still present), shape of centrosome (dotted lines) different (J) or similar (K, L) in AB and P1, asynchrony (M) or synchronous (N, O), and division P1 of the blastomeres AB, representing the beginning of cytokinesis, is indicated with an arrow, orientation in the zone AB (white line) perpendicular (P) along or (Q, R) the axis AP. Extracted and adapted from Brauchle et al. (2009).

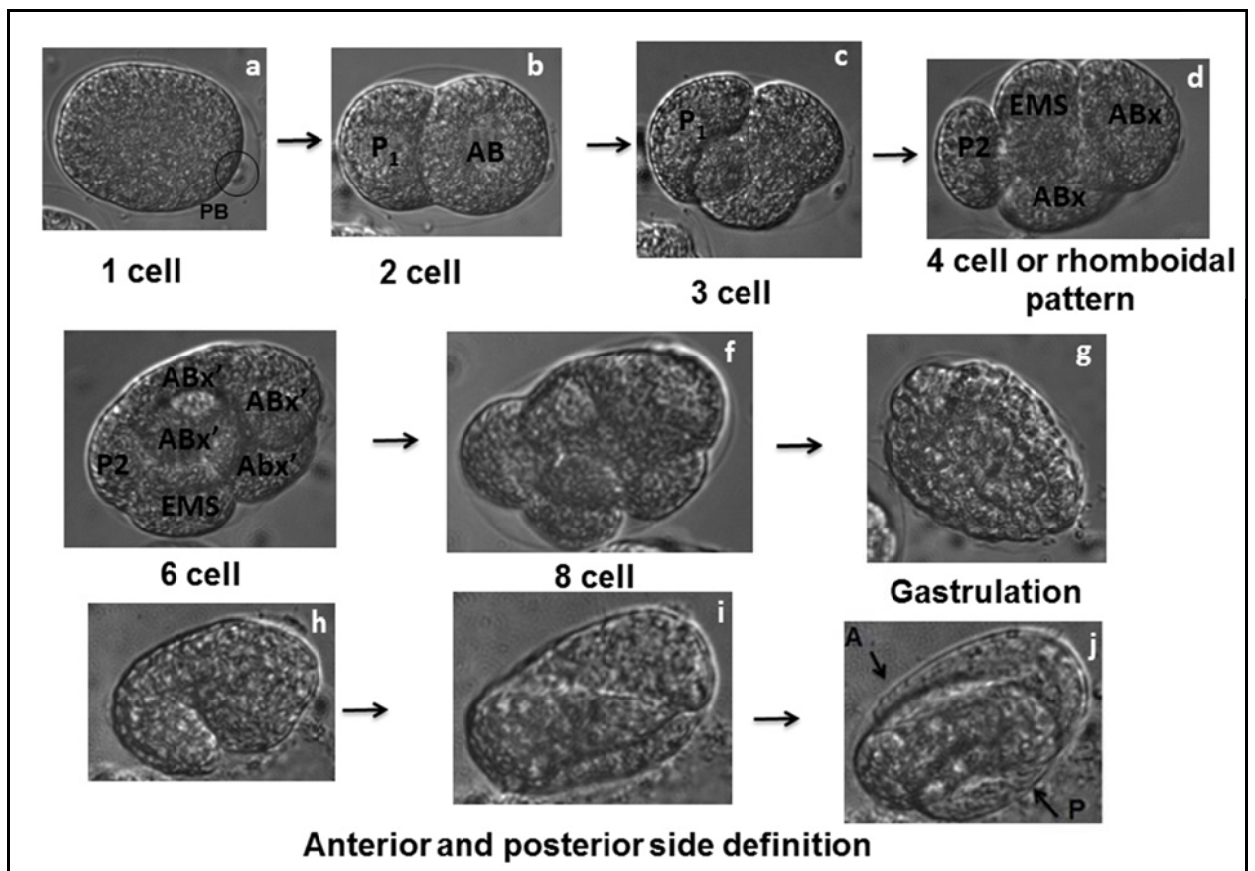


Figure 3. Phases of the embryo division of *H. baujardi* LPP7.

REFERENCES

- Boveri, T. (1899) Die Entwicklung von *Ascaris megaloccephala* mit besonderer Rücksicht auf die Kernverhältnisse. *In: Festschrift für C. v. Kupffer*. Gustav Fischer Verlag, Jena, p. 383-430.
- Brauchle, M., Kiontke, K., MacMenamin, P., Fitch, D.H.A., Piano, F. (2009) Evolution of early embryogenesis in rhabditid nematodes. *Developmental Biology*, 335: 253–262.
- Dolinski, C., Baldwin, J.G., Thomas, W.K. (2001) Comparative survey of early embryogenesis of Secernentea (Nematoda), with phylogenetic implications. *Can. J. Zool*, 79: 82–94.
- Dolinski, C., Borgonie, G., Schnabel, R., and Baldwin, J.G. (1998) Buccal capsule development as a consideration for phylogenetic analysis of Rhabditida (Nemata). *Dev. Genes Evol*, 208: 495-503.
- Dolinski, C., Kamitani, F., Machado, I.R., Winter C.E. (2008) Molecular and morphological characterization of heterorhabdit entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 150-159.
- Félix, M.A. (1999). Evolution of developmental mechanism in nematodes. *J. Exp. Zool*, 285: 3-18.
- Félix, M.A., De Ley, P., Sommer, R.J., Frisse, L., Nadler, S.A., Thomas, W.K., Vanfleteren, J., and Sternberg, P.W. (2000). Evolution of vulva development in the Cephalobina (Nematoda). *Dev. Biol*, 221: 68-86.
- Félix, M.A., De Ley, P., Sommer, R.J., Frisse, L., Nadler, S.A., Thomas, W.K., Vanfleteren, J., and Sternberg, P.W. (2000) Evolution of vulva development in the Cephalobina (Nematoda). *Dev. Biol*, 221: 68-86.

Fitch, D.H.A. (1997) Evolution of male tail development in rhabditid nematodes related to *Caenorhabditis elegans*. *Syst. Biol*, 46: 145-179.

Gerhart, J., Kirschner, M. (1997) *Cells, Embryos, and Evolution: Toward a Cellular and Developmental Understanding of Phenotypic Variation and Evolutionary Adaptability*. Blackwell Publishers, Malden, MA.

Goldstein, B. (2001) On the evolution of early development in the Nematoda. *Philos. Trans. R. Soc. Lond*, 356: 1521-1531.

Goldstein, B., Frisse, L.M., Thomas, W.K. (1998) Embryonic axis specification in nematodes: evolution of the first step in development. *Curr. Biol*, 8: 157-160.

Hartwell, L.H., Hopfield, J.J., Leibler, S., Murray, A.W. (1999) From molecular to modular cell biology. *Nature*, 402: C47–C52.

Kiontke, K., Barrière, A., Kolotuev, I., Podbilewicz, B., Sommer, R.J., Fitch, D.H.A., Félix, M.A. (2007) Trends, stasis and drift in the evolution of nematode vulva development. *Curr. Biol*, 17: 1925–1937.

Lahl, V., Schulze, J. and Schierenberg, E. (2009) Differences in embryonic pattern formation between *Caenorhabditis elegans* and its close parthenogenetic relative *Diploscapter coronatus*. *Int. J. Dev. Biol*, 53: 507-515.

Malakhov, V.V. (1994) Nematodes. Structure, development, classification and phylogeny. *In*: Hope, W.D. (ed.). Washington and London: Smithsonian Institution Press, 286 pp.

Minas, R. S., Dolinski, C.M., Carvalho, R.S., Souza, R.M. (2011) Controle biológico da mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata* utilizando nematoide entomopatogênicos em laboratório. *Scientia Agraria*, 12: 115-119.

Munro, E., Nance, J., Priess, J.R., (2004) Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior–posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Dev. Cell*, 7, 413–424.

Schierenberg, E. (2006) Embryological variation during nematode development. In: The *C. elegans* Research Community, (Ed.), WormBook, 2006, pp. 1–13. (WormBook, doi:10.1895/wormbook.1.55.1).

Schierenberg, E. (2006) Embryological variation during nematode development WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.55.1, <http://www.wormbook.org>.

Schulze, J., Schierenberg, E. (2009) Embryogenesis of *Romanomermis culicivorax*: An alternative way to construct a nematode. *Developmental Biology*, 334: 10–21.

Severson, A.F., Bowerman, B. (2003) Myosin and the PAR proteins polarize microfilament-dependent forces that shape and position mitotic spindles in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol*, 161, 21–26.

Skiba, F., Schierenberg, E. (1992) Cell lineages, developmental timing, and spatial pattern formation in embryos of free-living soil nematodes. *Dev. Biol*, 151: 597–610.

Sommer, R.J., Sigrist, C.B., Grandien, K., Jungblut, B., Eizinger, A., Adamis, H., Schlak, I. (1999) A phylogenetic interpretation of nematode vulval variations. *Invertebr. Reprod. Dev*, 36: 57-65.

Sommer, R.J., Sigrist, C.B., Grandien, K., Jungblut, B., Eizinger, A., Adamis, H., and Schlak, I. (1999) A phylogenetic interpretation of nematode vulval variations. *Invertebr. Reprod. Dev*, 36: 57-65.

Sternberg, P.W., Félix, M.A. (1997) Evolution of cell lineage. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 7: 543-550.

van Megen, H., Van Den Elsen, S., Holterman, M., Karszen, G., Mooyman, P., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., Helder, J. (2009) A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology*, Vol. 11: 927-950.

Vangestel, S., Houthoofd, W., Bert, W., Borgonie, G. (2008) The early embryonic development of the satellite organism *Pristionchus pacificus*: differences and similarities with *Caenorhabditis elegans*. *Nematology*, 10: 301–312.

Wiegner, O., Schierenberg, E. (1998) Specification of gut cell fate differs significantly between the nematodes *Acrobelloides nanus* and *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 204: 3 -14.

Wilkins, A.S. (2002) *The Evolution of Developmental Pathways*. Sinauer Associates, Sunderland, M.A.

MATING BEHAVIOR AND PHEROMONE DETECTION STUDIES IN AN *IN VITRO* CULTURE OF *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae)

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes were tested against a large number of insect pests, presenting very satisfactory control. Many factors can influence the successful use of nematodes as biological insecticides. However, the combination of biology and ecology of both the nematode and the target pest is a crucial step to success in biological control. In addition, infection decisions made by the free-living infective-stage juveniles have an impact on reproductive success, but it is likely that mating decisions are made by adults while inside their host. The objectives of the current study were to describe the mating behavior to help understand the possible evolutionary changes that might benefit *H. baujardi* LPP7 during mating, and to determine whether mating is chemically mediated or results from incidental encounters between adults inside the insect host. Infective juveniles were grown in FLA with their bacteria until the 2nd generation (males and females). Each nematode couple was observed daily in a Petri dish. To conduct the tests the agar from FLA culture in Petri dishes was cut to put in an excavated slide and was then observed under a microscope. Eight repetitions were conducted for each treatment. There were three treatments which described the phases of the sexual

behavior of this species. The deposition time of the plug in post-mating behavior is always greater than the mating time. From 8 copulations filmed and observed, the average time from the moment of insertion of the male spicules passing through the entrance and exit of spermatids of spicules in the female vulva is of 79 seconds. Of 20 males placed in the center of the plate, giving them the choice to go in many possible directions, only one or two males moved toward the 20 unmated females. When females were given the same choice, the same behavior was observed. The test was repeated 10 times. After the tests, no possible substance was detected that could attract males and females for mating. The fact that the plug deposition time is always greater than the duration of mating shows the male instinct to try to pass their genes to future generations and to ensure their offspring. It is possible that the mating of male and female *H. baujardi* LPP7 may result from incidental encounters.

Keywords: sexual behavior, entomopathogenic nematode, Rhabditida, mating, plug deposition.

INTRODUCTION

Entomopathogenic nematodes (EPNs) have been especially effective as inundative biological control agents against a number of soil insect pests (Kaya and Gaugler, 1993; Klein, 1990; Georgis and Manweiler, 1994). They are also effective against a number of insect pests that occur in cryptic habitats (e.g. tree boring insects). Many factors can influence the successful use of these nematodes as biological insecticides. However, understanding the biology and ecology of both the nematode and the target pest is a crucial step to success in biological control (Hazir et al., 2003).

Infection decisions are made by the non-reproductive infective-stage juveniles. Infection of the same host by more than one species of entomopathogenic nematode can occur because multiple species of entomopathogenic nematodes have been isolated from a single soil sample (Gaugler et al., 1992; Stuart and Gaugler, 1994). However, multiple-species infections giving rise to more than one species of infective juvenile are unusual (Kopenhöffer et al., 1995). Multi-specific infection may lead to a mechanism that would enable adult nematodes to recognize conspecific mates inside the host cadaver (Lewis et al., 2002).

The phylum Nematoda is very diverse and occupies different habitats from the free-living nematodes that feed on bacteria on the ground to obligate plants and animals parasites. This diversity has allowed the evolution of many different types of reproduction and many behavioral traits related to reproduction. Usually discussions about reproductive behavior have only taken place in cases where genetic exchange occurs between the sexes. However, nematodes have developed interesting and unusual mechanisms to maintain their population through both asexual and sexual reproduction (Huettel, 2004).

Evolutionary changes in reproductive modes of nematodes require modifications not only in the development of reproductive tissues, but also in neuromuscular-based behaviors that relate to species propagation (Garcia et al., 2007). According to Bone (1982), there are many references to sex

communication in nematodes but no information on *Heterorhabditis* spp., which are good candidates for biological control (Klein, 1990; Kein and Georgis, 1994).

Efforts to explain and correct some failures in biological control can serve as an impetus to know more about the basic biology and ecology of biological control agents (Gaugler et al., 1997). The establishment of *in vitro* culture of *Heterorhabditis baujardi* Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, 2003 LPP7 on FLA (Wouts, 1981) has facilitated these studies. The objectives of the current study were to describe mating behavior, thus understanding the possible evolutionary changes that might benefit *H. baujardi* LPP7 during mating, and to determine whether mating is chemically mediated or results from incidental encounters between adults inside the insect host.

MATERIALS AND METHODS

- Nematode source:

Heterorhabditis baujardi LPP7 was obtained from the Amazon Forest (Monte Negro, Rondônia). These nematodes were identified based on their morphology and molecular biology (Dolinski et al., 2008). A population of *H. baujardi* was then established in larvae of the 7th instar of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) from a breeding population maintained in the Entomology and Phytopathology/Nematology Laboratory of UENF, using 100 IJs diluted in 0.5 mL of distilled water for each 5 larvae, in Petri dishes (9 cm in diameter) lined with filter paper at the bottom (Whatman no. 1). The dishes were placed in a climate-controlled chamber at 27 ± 1 °C and RH > 80% for 48 hours. After the death of the larvae, the carcasses were transferred to modified White traps (White, 1927) and kept in the same conditions mentioned above. After 11 to 12 days, when the first infective juveniles started to emerge from the *G. mellonella* carcasses, the IJs were collected on alternate days using Pasteur pipettes. The IJs were placed in cell culture bottles (40 mL) and stored in a climate-controlled chamber at 16 ± 1 °C and RH > 80% for up to one week before the tests.

Preparation for *in vitro* culture

- *P. luminescens* isolation and cultivation

Under sterile conditions and within the laminar flow, 40 *H. baujardi* LPP7 IJs were transferred to a petri dish (9 cm diameter) containing 1 mL of 10% sodium hypochlorite for 8 minutes for IJ sterilization outside.

After sterilization, the juveniles were transferred to wash in 0.8% NaCl solution. After washing, the saline solution was removed with a micropipette and put through liquid TSB (Tryptic Soy Broth), where the juveniles were cut with the aid of a scalpel to release their bacteria. The TSB containing the bacteria was placed in test tubes in the shaker for 24 hours.

After growth of the bacteria, these were transferred to a selective solid medium consisting of nutrient agar supplemented with bromothymol blue (NBTA) and triphenyl tetrazolium chloride (TTC) according to the design originally described by Akhurst (1980).

After the growth of bacteria in NBTA, colonies were isolated and stored in BOD at 16°C. The isolated single colony of bacterium was reared in NBTA at 28°C to multiply in the TSB liquid medium and placed in the shaker for 24 hours for growth. After 24 hours the bacteria were transferred to the middle FLA (Agar fortified with lipid or Fortified Lipid Agar) (LA: Wouts, 1981) at 28° C for growth.

- *In vitro* culture of *H. baujardi* LPP7 and sexual behavior observations

After 24 hours of bacterial growth through FLA at 28° C, IJs *H. baujardi* LPP7 cuticle was sterilized for 8 minutes in sterile solution of 10% sodium hypochlorite and washed in 0.8% NaCl saline solution. After sterilization, 100 IJs of *H. baujardi* LPP7 were inoculated daily in each Petri dish containing medium FLA with *Photorhabdus* bacteria and incubated at 28°C overnight.

After about seven days, juveniles had passed through the period of development into the 2nd generation (males and females). Each nematode couple was observed daily in a Petri dish. The mating behavior was observed under a Nikon E100 microscope, being watched for two days for a period of 5 hours with 5

minute intervals. The observation time was established by preliminary tests. When mating occurred, all behavioral acts were timed, described and filmed.

- Nematode/ Nematode interactions

We constructed a behavioral list for the sexual behavior of male *H. baujardi* LPP7, based on the frequency and duration of each behavioral categories listed and defined in Table 1 to illustrate the order of events in a mating episode. Each treatment corresponded to a type of behavior. For each treatment, we recorded the time spent on the event.

To conduct the tests the agar from FLA culture in Petri dishes was cut to put in an excavated slide and was observed under a Nikon microscope. Eight repetitions were conducted for each treatment. The treatments were listed in Table 1. Data were compared with analysis of variance (SAEG Program). Means were separated by the Tukey test (P=0.05).

Table 1. List of treatments showing *H. baujardi* LPP7 male behavior in response to females.

Behavior	Definition
Pre-mating	Same as scanning, the male passes the female several times doing laps before penetration by the spicules occurs.
Mating	Takes place while the spicule is within the female vulva. The vas deferens opens and sperm passes between the spicules into female spermatheca.
Plug deposition or Post- mating	Occurs when the male deposits copulatory "plug" or "cap" in the female after mating.

- Tests for Sexual communication

Sexual attraction was studied in a migration chamber that was made from a Petri dish 5 cm in diameter, where a melted paraffin structure was made with six compartments and a central section (3 x 1.5 cm) (Figure 1) (Bonner and Etges, 1967). Twenty males were placed in the center, giving them the choice of taking many paths, and 20 unmated females were placed at the end of one of the compartments. The opposite was also done by giving unmated females the choice. Each compartment was marked every 0.5 cm. The experiment was evaluated every 20 minutes to check the time and distance traveled by the male (s) toward the females and vice versa.



Figure 1. Migration chamber.

RESULTS

- Nematode/ Nematode interactions

We depicted and filmed the behavior of eight nematode couples of *H. baujardi* LPP7 and described the phases of the sexual behavior of this species (Table 1). The deposition time of the plug in post-mating behavior is always greater than the duration of mating. From 8 copulations filmed and observed, the average time from the moment of insertion of the male spicules passing through the entrance and exit of spermatids of spicules in the female vulva is of 73

seconds. Copulatory plug deposition (P.D), which occurs soon after the departure of spicules, takes an average time of 4 minutes (Figure 2).

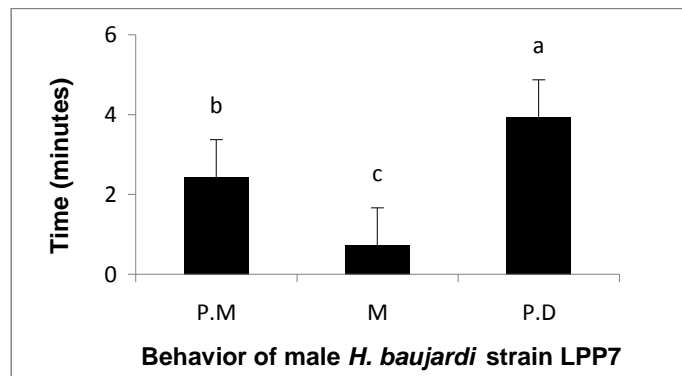


Figure 2. Average duration (min) of contact between male *H. baujardi* LPP7 and treatments P.M= pre-mating; M= mating; P.D= plug deposition. Bars with different letters are significantly different ($\alpha=0.05$).

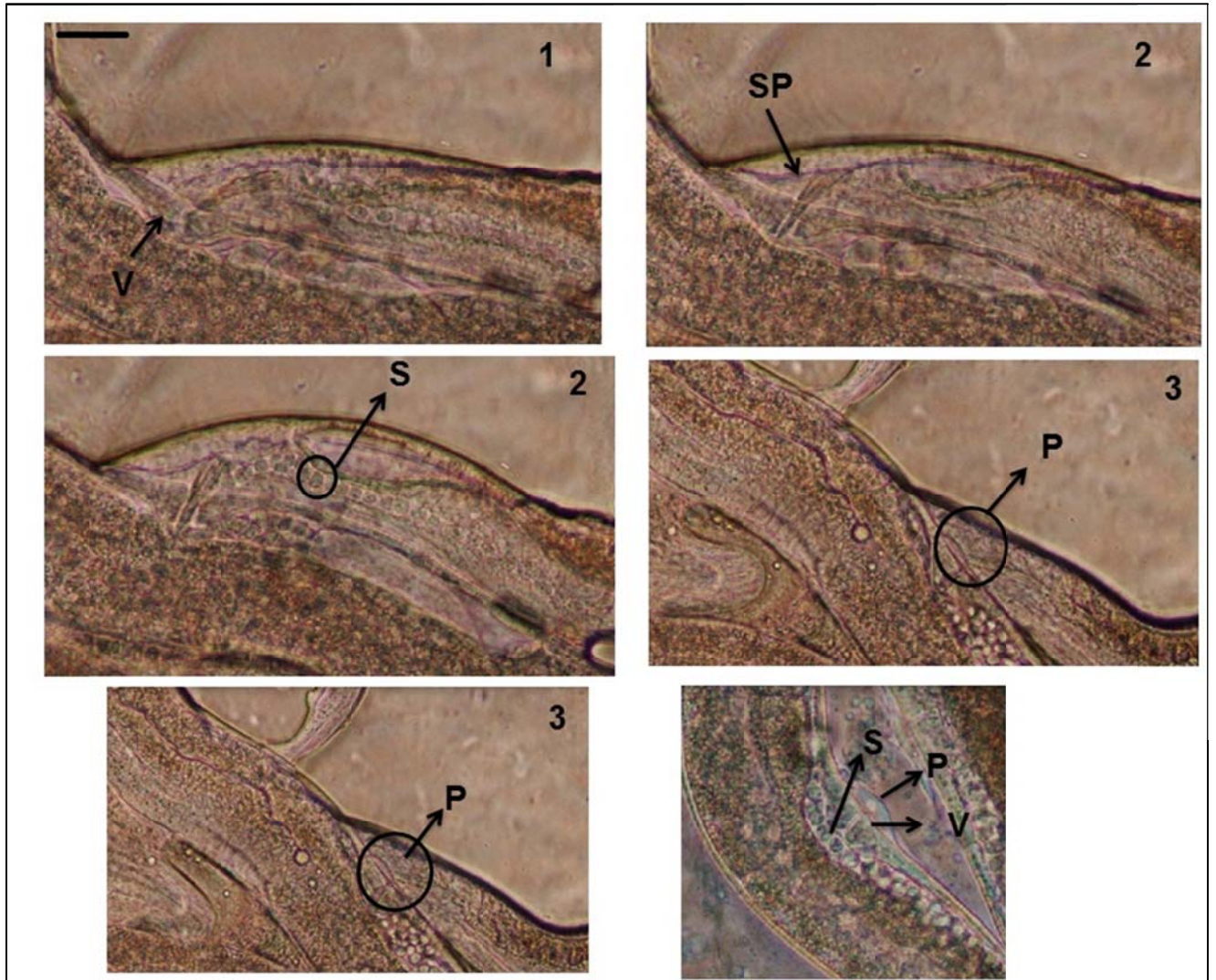


Figure 3. Events of sexual behavior of male *H. baujardi* LPP7. 1= Pre-mating; V= vulva; 2= Mating; SP= spicules; S= sperm; 3= post-mating; P= copulatory plug; Bar=100 μ m.

It was observed that males of 6 days with an ill-formed spicule without bursa and genital papillae do not show search behavior for the female. The search behavior of the male is a sigmoid movement, which is faster than that of the females. They carry out body scan of the nematodes until finding the vulva in the female. This behavior happens in 7-day-old males because by this time they have formed the spicule, bursa and genital papillae. During exploratory behavior the males would move away from her if copulation did not occur within 4 min.

The exploratory behavior of males is not influenced by the presence of mated or unmated females. A male could mate with a mated female. In this case

the plug was crossed and it appears that the female had been copulating because she had even formed an oocyte (Figure 4).

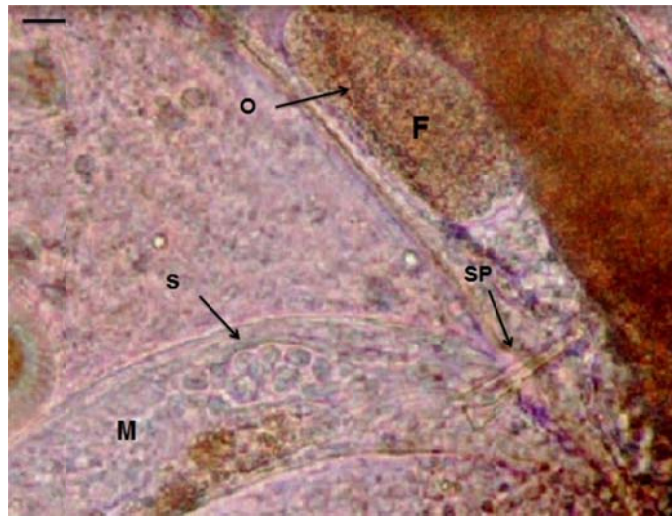


Figure 4. Copulation between male and a mated female *H. baujardi* LPP7 with oocyte already formed. O= oocyte already formed; F= mated female; S= sperm; M= male. Bar= 100 μ m.

Females do not have a search behavior like that of the males, showing instead a more sedentary behavior. Both the youngest and oldest females have the same sedentary behavior.

During copulation the male and female heads are in the same direction (Figure 5). The male bursa generally shows a scanning function in the body of nematodes to find the female vulva. Approximately 20 spermatids are injected by the male into the female vulva.

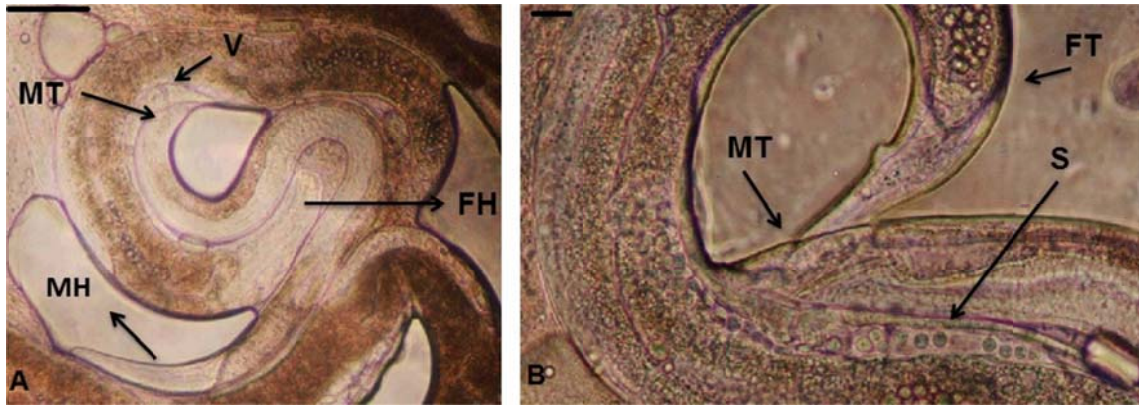


Figure 5. A. Male and female head in the same direction. MT= male tail; V= vulva; FH= female head; MH= male head. B. Male and female tail in the same direction. MT= male tail; S= sperm; FT= female tail. Bar= 100 μ m.

- Tests for Sexual communication

Of 20 males placed at the center of the plate, with the choice of taking many possible directions, only two males went toward the 20 unmated females. When the opposite was done, placing the females in the center and the males in a compartment, the same was observed. The test was repeated 10 times. After the tests, we didn't find the possible substance that could attract males and females for mating.

DISCUSSION

- Nematode/ Nematode interactions

The first detailed reports of copulation were provided in 1964 by Anderson and Darling. They observed mating in the plant-parasitic nematode, *Ditylenchus destructor*. Their observation included pre-mating behavior, in which the male passed the female several times before penetration by the spicules occurred. The males were only attracted to certain females, and males would move away if copulation did not occur within 5-10 min. Females were receptive to males for only 1 week, while the males were capable of mating for up to 3 weeks. This behavior indicated that chemosensory production might be age-dependent in the female. Females were observed to mate with more than one male, but the total number of

mating events was not stated. In the case of *D. destructor*, the bursa appeared to play a role in holding the female in place while mating occurred. After the spicules were inserted, about six to 20 sperm were injected, after which the male quickly moved away (Huettel et al., 2004).

In the entomopathogenic nematode *H. baujardi* LPP7 males the same pre-mating behavior was observed. However, the males tried to copulate with males, females and juveniles. The males would move away if copulation did not occur within about 4 min.

In the migratory plant-parasitic nematodes *Radopholus similis* and *R. citrophilus*, females were approached by males, which began to probe the female body before copulation occurred. The males were observed to occasionally flare their bursa and extend the spicules prior to mating. Copulation took place with head of the male and female in the same direction and lasted up to 5 min. During mating, the bursa of the male was extended away from the vulva and was not used to secure the female. This species is an endoparasitic nematode that feeds within the roots of its host. The observations of mating took place under culture conditions, with subjects placed on water agar plates. It is not known whether mating takes place within the root itself or in the soil surrounding the root (Huettel et al., 1982; Huettel et al., 2004).

Males of *H. baujardi* LPP7 took the same approach of scanning the female body before copulation occurred. According to Barr and Garcia (2006) the ejaculation in *C. elegans* males occurs after spicule penetration, and lasts about 4 seconds. *H. baujardi* LPP7 copulation lasted up to about 73 seconds.

In the ectoparasitic nematode *Belonolaimus longicaudatus*, mating occurred with the male and female heads oriented in the same direction, as in *Radopholus* (Huang and Becker, 1999). This nematode has a female to male sex ratio of approximately 3:2 (Todd, 1989; Huang and Becker, 1999). Interestingly, even though there are more females than males, several males gathered around a single female. These females may produce a strong sex pheromone signal to ensure that males find them to mate, since these nematodes mate in the soil environment under *in vivo* conditions. Males begin a pre-mating process by rubbing the sides of the females with the lateral side of their lip region. Once the bursa contacts the female, the rubbing continues until the bursa reaches the vulva region. The female then twists her body until the spicules penetrate the vulva. The

nematodes became quiescent while sperm transfer presumably took place, lasting from 6 to 10 minutes.

It was observed that six-day-old males of *H. baujardi* LPP7 with ill-formed spicule without bursa and genital papillae did not present search behavior for the female. The search behavior of the male is a sigmoid movement faster than that of females. They carry out a body scan of the nematodes until finding the vulva in the female. This behavior happens in seven-day-old males because by this time they have formed the spicule, bursa and genital papillae.

In a sedentary plant-parasitic nematode, *Heterodera glycine*, the males do not undergo their final molt into migratory adults until 1 day after the females have molted to adults and produced a gelatinous matrix (Lauritis, et al., 1983). This may allow the female, which is attached to the root, time to produce a sex pheromone to help the male locate her (Jaffe et al., 1989). The male approached the female and a coiling behavior was observed (Huettel and Rebois, 1986). The male probed the female several times with his head before copulation occurred. Copulation lasted several minutes before the male moved away. There are some females of *H. glycines* that are often surrounded by multiple males. However, observation of these females occurred under root explant culture conditions, so it is not known if this behavior occurs *in vivo*. Under *in vitro* conditions, females are often not mated in these circumstances, since the males tend to push each other away while undergoing coiling behavior (Huettel and Rebois, 1982). Similar observations were made in *H. baujardi* LPP7 females who were surrounded by multiple males during the mating process with another male.

The mating behavior of two entomopathogenic nematodes, *S. carpocapsae* and *H. bacteriophora*, are very different from each other even though these nematodes share many morphological and life history traits. Observations of *S. carpocapsae* on culture plates indicated that the males were attracted to females after 1-5 min of random movement (Lewis et al., 2002). Males probed the females in all regions of the body but more than 50% of the time in the middle region around the vulva. When mating occurred, a male coiled where the vulva is located and copulation took place.

According to Lewis et al. (2002) in *H. bacteriophora* the position for mating is different. The male nematode aligns approximately parallel to the female body and does not coil around her as in *S. carpocapsae*. The male head is pointed in

the opposite direction from that of the female, with much of its body away from the female. There is no morphological reason for the two mating positions to be so different.

Although *H. bacteriophora* and *H. baujardi* LPP7 are in the same genus, *Heterorhabditis*, the latter presented different sexual behavior because the male and female heads are in the same direction during mating (Figure 5).

Observations of copulatory behavior in *C. elegans* indicated that mating is similar to that in *H. bacteriophora*, where the males back into position before copulation. In another free-living nematode, *Rhabditis pellio*, male and female copulatory behavior involved the male moving its entire body along the female before copulation occurred (Sommers et al., 1976). The male also extended and retracted their spicules, which was the same as the behavior observed in *Radopholus* (Huettel et al., 1982). During pre-mating and copulation, both males and females continued to eat. This continued feeding behavior during mating has also been reported by Chin and Taylor (1969) in *Cylindrocorpus longistoma* and *Cylindrocorpus curzii*. In *Cruznema lambdiensis* only the females eat while copulating (Ahmad and Jairajpuri, 1981).

Ward and Carrel (1979) showed, through genetic-marker experiments, that sperm from two *C. elegans* males have a roughly equal chance of fertilizing the eggs of a hermaphrodite, and that male sperm completely out-compete hermaphrodite sperm. Thus, male paternity would be significantly reduced by subsequent mating of the hermaphrodite by a second male.

The male exploratory behavior of *H. baujardi* LPP7 is not influenced by the presence of mated or unmated females. A male could mate with a mated female. In this case the plug was crossed and it appears that the female had been copulating because she had even formed an oocyte (Figure 4).

Darwin (1871) subdivided sexual selection into intrasexual selection, where one sex (typically males) competes aggressively with other members of the same sex for access to the opposite sex, and intersexual selection, where one sex (again typically males) competes with each other for the other sex's attention. Intrasexual selection usually results in the evolution of elaborate weaponry, aggressive behaviors, and defensive characteristics, while intersexual selection usually results in the evolution of exaggerated sexual signals and female preferences for those signals (Andersson 1994).

Although Darwin (1871) proposed his ideas to account for elaborate pre-copulatory sexual displays and preferences, his explanation has since been expanded to include forms of post-copulatory choice, such as sperm competition (Parker 1970) and cryptic female choice (Thornhill 1983). Sperm competition occurs when sperm from multiple males compete with each other for the opportunity to fertilize an ovum (Parker 1970, Birkhead and Møller, 1998). The result of sperm competition is evolution of male traits that increase the sperm's fertilization success, including increased sperm number, increased sperm size, seminal fluids, sperm removal, and copulatory plugs or mate guarding (reviewed by Birkhead and Møller 1998, Simmons, 2001; Snook 2005). Sperm competition can be thought of as the post-copulatory (pre-fertilization) equivalent to intrasexual selection.

In *H. glycinis* the reproduction amphimictic, combined with copulation by more than one male (Triantaphyllou & Esbenshade, 1990), results in great genetic variability in field populations of nematodes.

In this study, sperm competition may contribute to the increase of genetic variability through recombination and segregation. This genetic variability favors the parasite *H. baujardi* LPP7 increasingly circumventing the host's immune response.

H. baujardi LPP7 males do not eat during copulation. However, the female always eat during copulation as well as before and after it. The plug deposition time is always greater than the duration of mating (Figure 2). This shows the male instinct to try to pass its genes to future generations and to ensure offspring are produced. During plug deposition the male injects the plug material through spicules with movements of back and forth in the female vulva.

- Tests for Sexual communication

Reproductive decision-making, based on assessment of species identity and relative fitness of potential mates, is among the primary functions of adult animals. These data show that for *S. carpocapsae*, adult males are stimulated by chemical cues produced by unmated conspecific females. The attractant produced by adult female entomopathogenic nematodes was species-specific, at least between this pair of species, because attraction was not observed between *S.*

carpocapsae males and *H. bacteriophora* hermaphrodites. However, these two genera are not closely related phylogenetically, and pheromonally-based mate discrimination could be less reliable between species that diverged more recently. This phenomenon has been shown with some sister species of insects (Lewis and Cane, 1990).

In this experiment, there was no stimulus by chemical cues produced by *H. baujardi* LPP7 virgin conspecific females, because when 20 males were placed in the center of the plate, giving them the choice to take many possible directions. Only two males went toward the 20 unmated females, the other males were to other compartments. When the opposite was done, the same was observed.

It is possible that the mating of male and female *H. baujardi* LPP7 may be the result of incidental encounters. As the male has only 2 to 3 days of life, a short lifespan, he is always looking for the female but always trying to mate with everything in his path, including other males and juveniles. Moreover, unlike *S. carpocapsae*, the species *H. baujardi* LPP7 already ensured its offspring in the first generation with the self-fertilization of the hermaphrodites. These observations are supported by behavioral studies conducted through the videos made.

REFERENCES

- Ahmad, I., Jairajpuri, M.S. (1981) The copulatory behavior of *Cruznema lambdiensis* (Nematoda: Rhabditidae). *Revue de Nématologie*, 4: 151-156.
- Akhurst, R.J. (1980) Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*, 121: 303-309.
- Barr, M.M., Garcia, L.R. (2006) Male mating behavior (June 19, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.78.1, <http://www.wormbook.org>.
- Birkhead, T.R., A.P. Møller. (1998) Sperm competition and sexual selection. Academic Press, London.

- Bone, L.W. (1982) Reproductive chemical communication of helminthes. II. Aschelminths. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 5: 311-321.
- Bonner, T.P., Etges, F.J. (1967) Chemically mediated sexual attraction in *Trichinella spiralis*. *Experimental Parasitology*, 21: 53-60.
- Chin, D.A., Taylor, D.P (1969) Sexual attraction and mating patterns in *Cylindrocorpus longistoma* and *C. curzii* (Nematoda: Cylindrocorporidae). *Journal of Nematology*, 1: 313-317.
- Darwin, C.R. (1871) The descent of man and selection in relation to sex. John Murray, London.
- Dolinski, C., Kamitani, F., Machado, I.R., Winter C.E. (2008) Molecular and morphological characterization of heterorhabdit entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 150-159.
- Garcia, L.R., LeBoeuf, B., Koo, P. (2007) Diversity in mating behavior of hermaphroditic and male–female *Caenorhabditis* nematodes. *Genetics*, 175: 1761–1771.
- Gaugler, R., Campbell, J.F. Selvan, S., Lewis, E.E. (1992) Large-scale inoculative releases of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*: Assessment 50 years later. *Biological Control*, 2: 181-187.
- Gaugler, R., Lewis, E., Stuart, R.J. (1997) Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia*, 109: 483–489.
- Georgis R., Manweiler S.A. (1994) Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. *Agri. Zool. Rev*, 6: 63- 94.

- Hazir, S., Kaya, H.K., Stock, P. Keskin, N. (2003) Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. *Turk. J. Biol*, 27: 181-202.
- Haung, X., Becker, J. (1999) Life cycle and mating behaviour of *Belonolaimus longicaudatus* in gnotobiotic culture. *Journal of Nematology*, 31, 70-74.
- Huettel, R.N. (2004) Nematodes behaviour. In: Gaugler, R., Bilgrami, A.L. (eds.) Nematode behaviour. 1. ed. Cambridge, CABI Publishing, p. 127-150.
- Huettel, R.N., Dickson, D.W., Kaplan, D.T. (1982) Sex attractants and behaviour in the two races of *Radopholus similis*. *Nematologica*, 28: 360-369.
- Huttel, R.N., Rebois, R.V (1986) Bioassay comparisons for pheromone detection in *Heterodera glycines*, the soybean cyst nematode. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 53: 63-68.
- Jaffe, H., Huettel, R.N., DeMilo, A.B., Hayes, D.K., Rebois, R.V. (1989) Isolation and identification of a compound from soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, with a sex pheromone activity. *Journal of Chemical Ecology*, 15: 2031-2043.
- Kaya H.K., Gaugler R. (1993) Entomopathogenic nematodes. *Ann. Rev. Entomol*, 38: 181-206.
- Kein, M.G. (1990) Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.) Entomopathogenic nematodes in biological control, Boca Raton: CRC Press, p. 195-214.
- Klein, M.G., Georgis, R. (1994). Application techniques for entomopathogenic nematodes. Anais do VI International Colloquium of Invertebrate Pathology & Microbial Control, Montpellier, 483-486.

Kopenhoffer, A.M., Kaya H.K., Shanmugam, S., Wood, G.L. (1995) Interspecific competition between steinernematid nematodes within an insect host. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66: 99-1037.

Lauritis, J.A., Rebois, R.V., Graney, L.S. (1983) Development of Heterodera glycines Ichnohen on soybean Glycine max (L.) Merr. under gnotobiotic conditions. *Journal of Nematology*, 15: 272-281.

Lewis, E.E., Cane, J.H. (1990) Cross-attractive pheromones of Group IX Ips reflect phylogenetic divergence. *Canadian Entomologist*, 122:1235–1238.

Lewis, E.E., Barbarosa, B., Gaugler, R. (2002) Mating and Sexual Communication by *Steinernema carpocapsae* (Nemata: Steinernematidae). *Journal of Nematology*, 34: 328–331.

Parker, G.A. (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in insects. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 45: 525 567.

Santana, H., Pires, E., Comerlato, A.P., Nasu, E.G.C., Furlanetto, Cleber. (2009) Variabilidade genética em populações de campo do nematóide de cisto da soja provenientes dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul. *Tropical Plant Pathology*, 34: 261-264.

Simmons, L.W. (2001) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press, Princeton.

Somers, J.A., Shorey, H.H., Gaston, L.K. (1976) Reproductive biology and behaviour of *Rhabditis pellio* (Schneider) (Rhabditida: Rhabditidae). *Journal of Nematology*, 9: 143-148.

Snook, R.R. (2005) Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology & Evolution*, 20: 46-53.

Stuart, R.J., and Gaugler, R. 1994. Patchiness of populations of entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64: 39–45.

Sudhaus, W. (1976) Vergleichende Untersuchungen zur Phylogenie, Systematik, Ökologie, Biologie und Ethologie der Rhabditidae (Nematoda). *Zoologica (Stuttg.)*, 43: 1-229.

Thornhill, R. (1983) Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *American Naturalist*, 122: 765-788.

Todd, T.C. (1989) Population dynamics and damage potential of *Belonolaimus* sp. on corn. *Journal of Nematology*, 21: 697-702.

Ward, S., Carrel, J.S. (1979) Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 73: 304-321.

Wouts, W.M. (1981) Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* on artificial media. *Nematol*, 13: 467-469.

4- RESUMO E CONCLUSÕES

- *H. baujardi* LPP7 possui 7 cromossomos bivalentes e mitóticos;
- Nos estudos de embriogênese, a referida espécie está muito próxima filogeneticamente de *C. elegans*.
- No que se diz respeito ao comportamento sexual, o macho da espécie em questão gasta muito mais tempo na fase pós-cópula, depositando o “plug” ou tampão copulatório, do que na cópula propriamente dita.
- Foi observado também que a fêmea pode copular com vários machos. Possivelmente o maior tempo gasto pelos machos na pós-cópula se deva ao instinto do macho em tentar passar seus genes para as futuras gerações, garantindo com isso sua prole.
- No ensaio de detecção de possíveis feromônios, não foi detectada a existência de nenhuma possível substância que possa atrair machos até fêmeas ou vice-versa para o acasalamento.
- É possível que o acasalamento entre machos e fêmeas de *H. baujardi* LPP7 possa ser resultado de encontros ao acaso. Como o macho de *H. baujardi* LPP7 tem um tempo de vida curto, ele está sempre procurando pela fêmea e tentando acasalar com tudo que está em sua frente como juvenis e outros machos.
- Além disso, a referida espécie já garantiu sua prole na primeira geração através da autofecundação das hermafroditas diferentemente da maioria das espécies do gênero *Steinernema*.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, B.J., Fodor, A., Klein, M.G., Smith, H.L., Stackebrandt, E., Stock, S.P. (2006) Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biol Control*, 37: 32-49.

Ahmad, I., Jairajpuri, M.S. (1981) The copulatory behavior of *Cruznema lambdiensis* (Nematoda: Rhabditidae). *Revue de Nématologie*, 4: 151-156.

Ahn, Y., Winter, C.E. (2006) The genome of *Oscheius tipulae*: determination of size, complexity, and structure y DNA reassociation using fluorescent dye. *Genome*, 49: 1007-1015.

Akhurst, R.J. (1980) Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microb.*, 121: 303-309.

Akhurst, R.J. (1990) Safety to nontarget invertebrates of nematodes of economically important pests. *In*: Laird, L.A., Lacey, E.W., Davidson, E.W. (eds.) *Safety of microbial insecticides*. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 233-240.

Akhurst, R.J., Boemare, N.E. (1990) Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.) *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton, p. 75-90.

Albertson, D.G., Thomson, J.N. (1982) The kinetochores of *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma*, 86: 409-428.

Albertson, D.G. (1984a) Formation of the first cleavage spindle in nematode embryos. *Dev. Biol*, 101: 61-72.

Albertson, D.G. (1984b) Localization of the ribosomal genes in *Caenorhabditis elegans* chromosomes by in situ hybridization using biotin-labeled probes. *Embo J*, 3:1227–1234.

Albertson D.G., Thomson J.N. (1997) The kinetochores of *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma*. In: Riddle D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J. (eds.) *C. elegans II*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 409–428.

Anderson, R.V., Darling, H.M. (1964) Embryology and reproduction of *Ditylenchus desctructor* Thorne, with emphasis on gonad development. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 31: 240- 256.

Anderson, T.J. (2001) The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. *Trends Parasitol*, 17: 183-188.

Anya, A.O. (1976) Physiological aspects of reproduction in nematodes. *Adv. Parasitol*, 14: 267-351.

Aumann, J., Hashem, M. (1993) Studies on substances with sex pheromone activity produced by *Heterodera schachtii* females. *Fundam. Appl. Nematol*, 16: 43-46.

Baer B., Morgan E.D., Schmid-Hempel, P. (2001) A nonspecific fatty acid within the bumblebee mating plug prevents females from remating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 3926-3928.

Bai X., Adams, B. J., Ciche, T.A., Clifton, S., Gaugler, R., Hogenhout, S.A., Spieth, J., Sternberg, P. W., Wilson, R.K., Grewal, P.S. (2009) Transcriptomic analysis of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* TTO1. *BMC Genomics*, 10: 205. doi: 10.1186/1471-2164-10-205.

Balakanich, S., Samoiloff, M.R. (1974) Development of nematode behavior: Sex attraction among different strains of the free-living *Panagrellus redivivus*. *Can J. Zool*, 52: 835-845.

Barker, D.M. (1994) Copulatory plug and paternity assurance in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Animal Behaviour*, 48: 147-156.

Barr, M.M., Garcia, L.R. (2006) Male mating behavior (June 19, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.78.1, <http://www.wormbook.org>.

Baylis H.A. (1931) A species of the nematode genus *Hedruris* occurring in the trout in New Zealand. *Ann. Mag. Nat. Hist. Ser.*, 10: 105–114.

Birkhead, T.R., Møller, A.P. (1998) Sperm competition and sexual selection. Academic Press, London.

Blaxter, M. (2000). Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms. *Int. J. Parasitol*, 30: 347–355.

Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., Thomas, W.K. (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392: 71–75.

- Bleve-Zacheo, T., Melillo, M.T., Zacheo, G. (1993) Ultrastructural studies on the nematode *Xiphinema diversicaudatum*: oogenesis and fertilization. *Tissue & Cell*, 25: 375-388.
- Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., Dame, J.B. (1995) Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics*, 141: 1007-1014.
- Bone, L.W. (1982) Reproductive chemical communication of helminthes. II. Aschelminths. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 5: 311-321.
- Bone, L.W. (1987) Pheromone communication in nematodes. In: Veech, J.A., Dickson, D.W. (eds.) *Vistas on Nematology*. Hyattsville: Society of Nematologists. p. 147-152.
- Bone, L.W., Shorey, H.H. (1978) Nematode sex-pheromones. *J Chem Ecol*, 4: 595-612.
- Bone, L.W., Shorey, H.H., Gaston, L.K. (1977) Sexual attraction and pheromonal dosage response of *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Parasitol*, 63: 364-367.
- Bonner, T.P., Etges, F.J. (1967) Chemically mediated attraction in *Trichinella spiralis*. *Exp. Parasitol*, 21: 53-60.
- Boveri, T. (1899) Die Entwicklung von *Ascaris megalocephala* mit besonderer Rücksicht auf die Kernverhältnisse. In: Gustav Fischer Festschrift für C. v. Kupffer. (eds.) Verlag, Jena, p. 383-430.
- Brauchle, M., Kiontke, K., MacMenamin, P., Fitch, D.H.A., Piano, F. (2009) Evolution of early embryogenesis in rhabditid nematodes. *Developmental Biology*, 335: 253–262.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77: 71-94.

Carneiro, R.M.D.G., Carneiro, R.G., Abrantes, M.O., Santos, M.S.N.A., Almeida, M.R. (1996) *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *J. Nematol*, 28: 177-189.

Carroll, L. (1872) *Through the looking glass and what Alice found there*. Macmillan, London.

Chabaud, A., Bain, O., Hugot, J., Rauch, R.L., Rauch, V.R. (1983) Organe de Monsieur de Man et insémination traumatique. *Revue de Nématologie*, 6:127-131.

Cherdantsev, V.G., Malakhov, V.V. and Gorgolyuk, N.A. (1972) On the early cleavage in some nematodes. *Ontogenez*, 3: 633-635.

Chin, D.A., Taylor, D.P (1969) Sexual attraction and mating patterns in *Cylindrocorpus longistoma* and *C. curzii* (Nematoda: Cylindrocorporidae). *Journal of Nematology*, 1: 313-317.

Chitwood, B.G. (1929) Note on copulatory sac of *Rhabditis strongyloides* Schneider. *Journal of Parasitology*, 15: 282-283.

Cho, S., Jin, S.W. Cohen, A., Ellis, R.E. (2004) A phylogeny of *Caenorhabditis* reveals frequent loss of introns during nematode evolution. *Genome Res*, 14: 1207-1220.

Ciche, T.A., Bintrim, S.B., Horswill A.R., Ensign, J.C. (2001) A phosphopantetheinyl transferase homolog is essential for *Photorhabdus luminescens* to support growth and reproduction of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Bacteriol*, 183: 3117-3126.

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.

Ciche, T.A., Darby, C., Ehlers, R., Forst, S., Goodrich-Blair, H. (2006) Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biol. Control*, 38: 22-46.

Ciche, T.A., Kim, K., Kaufmann-Daszczuk, B., Nguyen, K.C.Q., Hall, D.H. (2008) Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Appl. Environ. Microbiol*, 74: 2275-2287.

Clark, W.C. (1978) Hermaphroditism as a reproductive strategy for metazoans some correlated benefits. *N. Z. J. Zool*, 5: 769-80.

Coghlan, A. 2005. Nematode genome evolution. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.15.1.

Cotten, J. (1959) Chromosome number of the potato root eelworm *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Nature*, 183: 128.

Cotten, J. (1960) Observations of the cytology of the potato root eelworm, *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Nematologica*, 2: 123-126.

Cowan, C.R., Hyman, A.A. (2004) Centrosomes direct cell polarity independently of microtubule assembly in *C. elegans*. *Nature*, 431: 92-96.

Criscione, C.D.J.D., Anderson, J.D., Sudimack, D., Peng, W., Jha, B., Williams-Blangero, S., Anderson, T.J.C. (2007) Disentangling hybridization and host colonization in parasitic roundworms of humans and pigs. *Proc. Biol. Sci*, 274: 2669–2677.

Curran, J. (1989) Chromosome numbers of *Steinernema* and *Heterorhabditis* species. *Revue Nématol*, 12 : 145-148.

Cutter, A.D. (2008) Reproductive Evolution: Symptom of a Selfing Syndrome. *Current Biology*, 18: R1056-R1058.

Darwin, C.R. (1871) *The descent of man and selection in relation to sex*. John Murray, London.

De Ley, P., Blaxter, M. L. (2002) Systematic Position and Phylogeny. *In*: Lee, D. L. (ed.) *The Biology of Nematodes*. 1. ed. London: Taylor & Francis, p. 1-30.

De Ley, P., Decraemer, W., Eyuaem-Abebe. (2006) Introduction: Summary of present knowledge and research addressing the ecology and taxonomy of freshwater nematodes. *In*: Eyuaem-Abebe, Andrásy, I., Traunspurger, W. (eds.) *Freshwater nematodes: Ecology and Taxonomy*. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, p. 3-30.

Del Valle, E.E. (2008). *Utilização de cadáveres de Galleria mellonella (Lepidoptera:Pyralidae) infectados por Heterorhabditis baujardiHeterorhabditis baujardi LPP7 no controle do gorgulho-da-goiaba Conotrachelus psidii (Coleoptera: Curculionidae)*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes – RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro UENF. 87p.

Demeure, Y., Netscher, C., Quenherve, P. (1980) Biology of the plant parasitic nematode *Scutellonema cavenessi* Sher, 1964: reproduction development and life cycle. *Revue de Nématologie*, 3: 213-225.

Deppe, U., Schierenberg, E., Cole, T., Krieg, C., Schmitt, D., Yoder, B., von Ehrenstein, G. (1978) Cell lineages of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75: 376-380.

Dernburg, A.F. (2001) Here, There, and Everywhere: Kinetochore Function on Holocentric Chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, 153: F33–F38.

Diogo, A., Mota, M.M. (2001) *Caenorhabditis elegans*: modelo biológico para o século XXI. *Biologias*, 1-8.

Dolinski, C., Borgonie, G., Schnabel, R., Baldwin, J.G. (1998) Buccal capsule development as a consideration for phylogenetic analysis of Rhabditida (Nemata). *Dev. Genes Evol*, 208: 495-503.

Dolinski, C., Baldwin, J.G., Thomas, W.K. (2001) Comparative survey of early embryogenesis of Secernentea (Nematoda), with phylogenetic implications. *Canadian Journal of Zoology*, 79: 82-94.

Dolinski, C. (2006) Uso de nematoides entomopatogênicos no controle de pragas agrícolas. In: Venzon, M., Paula Júnior, T.J., Pallini, A. (eds.) *Tecnologias alternativas para o controle de pragas de doenças*. 1. ed. Viçosa: EPAMIG, p. 261-289.

Dolinski, C., Kamitani, F., Machado, I.R., Winter C.E. (2008) Molecular and morphological characterization of heterorhabdit entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 150-159.

Efron D., Nestel D., Glazer I. (2001) Spatial analysis of entomopathogenic nematodes and insect hosts in a citrus grove in a semi-arid region in Israel. *Environ. Entomol*, 30: 254-261.

Félix, M.A. (1999) Evolution of developmental mechanism in nematodes. *J. Exp. Zool*, 285: 3-18.

Félix, M.A., De Ley, P., Sommer, R.J., Frisse, L., Nadler, S.A., Thomas, W.K., Vanfleteren, J., and Sternberg, P.W. (2000). Evolution of vulva development in the Cephalobina (Nematoda). *Dev. Biol*, 221: 68-86.

Félix, M.A., De Ley, P., Sommer, R.J., Frisse, L., Nadler, S.A., Thomas, W.K., Vanfleteren, J., and Sternberg, P.W. (2000) Evolution of vulva development in the Cephalobina (Nematoda). *Dev. Biol*, 221: 68-86.

- Ferraz, L.C.C.B. (1998) Nematoides entomopatogênicos. *In: Alves, S.B. Controle microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, p. 541-567.
- Fitch, D.H.A. (1997) Evolution of male tail development in rhabditid nematodes related to *Caenorhabditis elegans*. *Syst. Biol*, 46: 145-179.
- Foor, W.E. (1968) Zygote formation in *Ascaris lumbricoides* (Nematoda). *J. Cell. Biol*, 39: 119-134.
- Foor, W.E. (1970a) Morphological changes of in utero *Dipetalonema viteoe*. *J. Parasitol*, 56: 103-107.
- Foor, W.E. (1970b) Spermatozoan morphology and zygote formation in Nematodes. *Biolog. Reprod*, 2: 177-202.
- Forschler, B.T., All, J.N., Gardner, W.A. (1990) *Steinernema feltiae* activity and infectivity response to herbicide exposure in aqueous and soil environments. *J. Invertebr. Pathol*, 55: 375-79.
- Forst S., Clarke, D. (2002) Bacteria-Nematode Symbiosis *In: Gaugler, R. (ed.) Entomopathogenic Nematology*, p. 57-77.
- Fromhage L., Schneider J.M. (2006) Emasculation to plug up females: the significance of pedipalp damage in *Nephila fenestrata*. *Behavioral Ecology*, 17: 353-357.
- Garcia, L.R., LeBoeuf, B., Koo, P. (2007) Diversity in mating behavior of hermaphroditic and male–female *Caenorhabditis* nematodes. *Genetics*, 175: 1761–1771.
- Gaugler, R. (1988) Ecological considerations in the biological control of soil inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agric. Ecosyst. Environ*, 24: 351-360.

Gaugler, R., Bilgrami, A.L. (2004) *Nematode behavior*. 1 ed. Cambridge, CABI Publishing, 419p.

Gaugler, R., Campbell, J.F. Selvan, S., Lewis, E.E. (1992) Large-scale inoculative releases of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*: Assessment 50 years later. *Biological Control*, 2: 181-187.

Gaugler, R., Kaya, H.K. (1990) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Robredo, J., Fernandes, M., Castro, F. de. (1986) *Documentação de hoje e de amanhã: uma abordagem informatizada da Biblioteconomia e dos sistemas de informação*. 2. ed. Brasília: Associação dos Bibliotecários do Distrito Federal, 400p.

Gaugler, R., Molloy, D. (1981) Instar susceptibility of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae*. *J. Nematol*, 13: 1-5.

Gaugler, R., Lewis, E., Stuart, R.J. (1997) Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia*, 109: 483–489.

Gemmill, A., Viney, M.E., Read, A.F. (1997) Host immune status determines sexuality in a parasitic nematode. *Evolution*, 51: 393-401.

Georgis, R. (1990) Commercialization of steinernematid and heterorhabditid entomopathogenic nematodes. *Brighton Crop Prot. Conf. Insectic. Fungic*, 1: 275-280.

Georgis R., Manweiler S.A. (1994) Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. *Agri. Zool. Rev*, 6: 63- 94.

Gerhart, J., Kirschner, M., (1997) *Cells, Embryos, and Evolution: Toward a Cellular and Developmental Understanding of Phenotypic Variation and Evolutionary Adaptability*. 1 ed. Malden, MA: Blackwell Publishers, 695p.

Ghiselin, M.T. (1979) The evolution of hermaphroditism among animals. *Q. Rev. Biol*, 44: 189-208.

Gilleard, J.S., Beech, R.N. (2007) Population genetics of anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitology*, 134: 1133-1147.

Goday, C., Pimpinelli, S. (1989) Centromere organization in meiotic chromosomes of *Parascaris univalens*. *Chromosoma*, 98: 160–166.

Golden, J.W., Riddle, D.L., (1982) A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 218: 578-580.

Golden, J.W., Riddle, D.L. (1984) A *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone and an antagonistic component of the food supply. *J. Chem. Ecol*, 10: 1265-1280.

Goldstein, B., Frisse, L. M. and Thomas, W. K. (1998). Embryonic axis specification in nematodes: evolution of the first step in development. *Curr. Biol*, 8: 157-160.

Goldstein, B., Frisse, L.M., Thomas, W.K. (1998) Embryonic axis specification in nematodes: evolution of the first step in development. *Curr. Biol*, 8: 157-160.

Goldstein, B. (2001) On the evolution of early development in the Nematoda. *Philos.Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*, 356: 1521–1531.

Gorsuch, A.M. (1982) Regulations for the enforcement of the Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act exemption from regulation of certain biological control agents. *Fed. Regist*, 47: 23928-23930.

Gönczy, P., Rose, L.S. (2005) Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. In: The *C. elegans* Research Community (ed.), WormBook, WormBook, doi:10.1895/wormbook.1.30.1.

Gourbault, N., Vincx, M. (1988) *Calomicrolaimus compridus* (Gerlach, 1956) n.comb., a marine nematode with a female producing a copulatory plug. *Revue de Nématologie*, 11: 39-43.

Green, C.D. (1980) Nematode sex attractants. *Helminthol. Abstr. Ser*, 49: 327-339.

Greet, D.N, Green, C.D, Poulton, M.E. (1968) Extraction, standardization and assessment of the volatility of the sex attractants of *Heterodera rostochiensis* Woll. and *H. schachtii* Schm. *Ann. Appl. Biol*, 61: 511-519.

Greet, D.N, Perry, R.N. (1992) Sexual differentiation and behaviour: Nematoda and Nematomorpha. *Reprod. Biol. Invertebr*, 5: 147-73.

Greet, D.N. (1964) Observations on sexual attraction and copulation in the nematode *Panagrolaimus rigidus* (Schneider). *Nature*, 204: 96-97.

Greet, D.N., Green, C.D., Poulton, M.E. (1968) Extraction, standardization and assessment of the volatility of the sex attractants of *Heterodera rostochiensis* Woll. and *H. schachtii* Schm. *Ann. Appl. Biol*, 61: 511-519.

Grenier, E., Catzefflis, F.M., Abad, P. 1997. Genome sizes of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida). *Parasitology*, 114: 497-501.

Griffin, C.T., O'Callaghan, K.M., Dix, I. (2001) A self-fertile species of *Steinernema* from Indonesia: further evidence of convergent evolution amongst entomopathogenic nematodes? *Parasitology*, 122: 181-186.

Hajnal, A. and Berset, T. (2002) The *C. elegans* MAPK phosphatase LIP-1 is required for the G(2)/M meiotic arrest of developing oocytes. *Embo J*, 21: 4317-4326.

- Hammond, M.P., and Bianco, A.E. (1992) Genes and genomes of parasitic nematodes. *Parasitol Today*, 8: 299-305.
- Han, R., Ehlers, R.U. (2000) Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic in vivo conditions. *J. Invertebr. Pathol*, 75: 55-58.
- Hara, A.H., Kaya, H.K. (1983) Toxicity of selected organophosphate and carbamate pesticides to infective juveniles of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Environ. Entomol*, 12: 496-501.
- Hartwell, L.H., Hopfield, J.J., Leibler, S., Murray, A.W. (1999) From molecular to modular cell biology. *Nature*, 402: C47–C52.
- Haseeb, M.A., Fried, B. (1988) Chemical communication in helminths. *Adv. Parasitol*, 27: 169-207.
- Hasegawa, K., Futai, K., Miwa, S. and Miwa, J. (2004). Early embryogenesis of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Development, Growth and Differentiation*, 46: 153-161.
- Haung, X., Becker, J. (1999) Life cycle and mating behaviour of *Belonolaimus longicaudatus* in gnotobiotic culture. *Journal of Nematology*, 31, 70-74.
- Hazir, S., Kaya, H.K., Stock, P. Keskin, N. (2003) Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. *Turk. J. Biol*, 27: 181-202.
- Herrmann, M., Mayer, W.E., Sommer, R.J. (2006) Nematodes of the genus *Pristionchus* are closely associated with scarab beetles and the Colorado potato beetle in Western Europe. *Zoology (Jena)*, 109: 96-108.

Hodgkin, J. (2005) Karyotype, ploidy and gene dosage. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.3.1.

Holterman, M., van der Wurff, A., van den Elsen, S., van Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., Helder, J. (2006) Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 1792–1800.

Hope, I.A. (2002) Embriology, developmental and the genome. *In*: Lee, D.L. (ed.) *The biology of nematodes*. Reino Unido: Taylor & Francis. p. 121-145.

Houthoofd, W. and Borgonie, G. (2007) The embryonic cell lineage of the nematode *Halicephalobus gingivalis* (Nematoda: Cephalobina: Panagrolaimoidea). *Nematology*, 9: 573-584.

Houthoofd, W., Jacobsen, K., Mertens, C., Vangestel, S., Coomans, A., Borgonie, G. (2008). Embryonic cell lineage of the marine nematode *Pellioiditis marina*. *Dev. Biol*, 258: 57-69.

Huettel, R.N. (1986) Chemical communicators in nematodes. *J. Nematol*, 18: 3-8.

Huttel, R.N., Rebois, R.V (1986) Bioassay comparisons for pheromone detection in *Heterodera glycines*, the soybean cyst nematode. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 53: 63-68.

Huettel, R.N. (2004) Nematodes behaviour. *In*: Gaugler, R., Bilgrami, A.L. (eds.) *Nematode behaviour*. 1. ed. Cambridge: CABI Publishing, p. 127-150.

Huettel, R.N., Dickson, D.W., Kaplan, D.T. (1982) Sex attractants and behaviour in the two races of *Radopholus similis*. *Nematologica*, 28: 360-369.

Huettel, R.N., Jaffe, H., DeMilo, A.B. (1988) *In vitro* screening of analogs of a sex attractant of soybean cyst nematode. *J. Nematol*, 20: 641-645.

Hugot J.P., Baujard, P., Morand, S. (2001) Biodiversity in helminthes and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3: 199-208.

Hyman, L.H. (1951) *The invertebrates. Acantocephala, aschelminthes and entoprocta*. 1 ed. New York: McGraw-Hill, 324p.

Ishibashi N., Choi D.R. (1991) Biological control of soil pests by mixed application of entomopathogenic and fungivorous nematodes. *Journal of Nematology*, 23: 175-181.

Jaffe, H., Huettel, R.N., DeMilo, A.B., Hayes, D.K., Rebois, R.V. (1989) Isolation and identification of a compound from soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, with a sex pheromone activity. *Journal of Chemical Ecology*, 15: 2031-2043.

Jairajpuri, M.S., Azmi, M.J. (1977) Reproductive behavior of *Acrobeloides* sp. *Nematologica*, 23: 202-212.

Jeffery, W. R. (2001). Determinants of cell and positional fate in ascidian embryos. *International Review of Cytology*, 203: 3 - 62.

Jeong, P.Y., Jung, M., Yim, Y.H., Kim, H., Park, M., Hong, E., Lee, W., Kim, Y.H., Kim, K., Palk, Y.K. (2005) Chemical structure and biological activity of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone. *Nature*, 433: 541–545.

Johnigk, S.A., Ehlers, R.U. (1999a) Juvenile development and life-cycle of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. indica* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematology*, 1: 251-260.

Justine, J.L., Jamieson, B.G.M. (1999) Nematoda: Reproductive Biology of Invertebrates. *In: Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny.*, volume IX, Part B. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Lmd, New Delhi, Calcutta.

- Justine, L. (2002) Male and female gametes and fertilization. *In: Lee, D.L. (ed.) The biology of nematodes*. Reino Unido: Taylor & Francis. p. 73-119.
- Karlson P, Butenandt A. (1959) Pheromones (ectohormones) in insects. *Annu. Rev. Entomol*, 4: 38-39.
- Kaya H.K., Gaugler R. (1993) Entomopathogenic nematodes. *Ann. Rev. Entomol*, 38: 181-206.
- Kaya, H.K., Stock, P.S. (1988) Techniques in insect nematology. *In: Lacey, L.A (ed.) Manual of techniques in insect pathology. Series Biological Techniques*. San Diego: Academic Press, p. 281-324.
- Kehel-Raifer, H., Glazer, I. (2000) Environmental factors affecting sexual differentiation in the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Exp. Zool*, 287: 158-166.
- Kein, M.G. (1990) Efficacy against soil-inhabiting insect pests. *In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.) Entomopathogenic nematodes in biological control*, Boca Raton: CRC Press, p. 195-214.
- Kimble, J., Hirsh, D. (1979) The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 70: 396-417.
- Kimble, J., Sharrock, W.J. (1983) Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 96: 189-196.
- Kiontke, K., N. P. Gavin, Y. Raynes, C. Roehrig, F. Piano, F., Fitch, D.H.A. (2004) *Caenorhabditis* phylogeny predicts convergence of hermaphroditism and extensive intron loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 9003–9008.
- Kiontke, K., Fitch. D.H. (2005) The phylogenetic relationships of *Caenorhabditis* and other rhabditids *In: Girard, L.R., (ed.) Wormbook: The C. elegans Research Community*. p.1-11.

Kiontke, K., Barrière, A., Kolotuev, I., Podbilewicz, B., Sommer, R.J., Fitch, D.H.A., Félix, M.A. (2007) Trends, stasis and drift in the evolution of nematode vulva development. *Curr. Biol*, 17: 1925–1937.

Klein, M.G., Georgis, R. (1994) Application techniques for entomopathogenic nematodes. *Anais do VI International Colloquium of Invertebrate Pathology & Microbial Control*, Montpellier, p. 483-486.

Kondrashov, A.S. (1993) Classification of hypothesis on the advantage of amphimixis. *Journal of Hereditary*, 84: 372-387.

Kopenhoffer, A.M., Kaya H.K., Shanmugam, S., Wood, G.L. (1995) Interspecific competition between steinernematid nematodes within an insect host. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66: 99-1037.

Koppenhofer AM. (2000) Nematodes. In: Lacey LA and Kaya H.K. (eds.) *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Kluwer. Dordrecht: The Netherlands; p. 283-301.

Kruger E. (1913). Fortpflanzung und Keimzellenbildung von *Rhabditis aberrans* n. sp. *Z. Wiss. Zool*, 105:87–124.

Lahi, V., Halama, C., Schierenberg, E. (2003) Comparative and experimental embryogenesis of Plectidae (Nematoda). *Dev. Genes Evol*, 213: 18-27.

Lahl, V., Sadler, B., Schierenberg, E. (2006). Egg development in parthenogenetic nematodes: variations in meiosis and axis formation. *Int. J. Dev. Biol*, 50: 393-398.

Lahl, V., Schulze, J. and Schierenberg, E. (2009) Differences in embryonic pattern formation between *Caenorhabditis elegans* and its close parthenogenetic relative *Diploscapter coronatus*. *Int. J. Dev. Biol*, 53: 507-515.

Lambhead, P.J.D. (1993) Recent developments in marine benthic biodiversity research. *Oceanis*, 19: 5-24.

Lara, J.K., Dolinski, C.M., Sousa, E.F., Daher, R.F. (2008) Effect of mini-sprinkler irrigation system on *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae) infective juvenile. *Sci. Agric.* 65 : 433-437.

Laugsch, M. and Schierenberg, E. (2004) Differences in maternal supply and early development of closely related nematode species. *International Journal of Developmental Biology*, 48: 655-662.

Lauritis, J.A., Rebois, R.V., Graney, L.S. (1983) Development of Heterodera glycines Ichnohen on soybean *Glycine max* (L.) Merr. under gnotobiotic conditions. *Journal of Nematology*, 15: 272-281.

Laznik Ž., Žnidarčič D., Trdan S. (2011) Control of *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) adults on glasshouse-grown cucumbers in four different growth substrates: an efficacy comparison of foliar application of *Steinernema feltiae* (Filipjev) and spraying with thiamethoxam. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35: 631-640.

Lee, C.C. (1975) *Dirofilaria immitis*: ultrastructural aspects of oocyte development and zygote formation. *Exp. Parasitol.*, 37: 449-468.

Leroy, S., Duperray, C., Morand, S. (2003) Flow cytometry for parasite nematode genome size measurement. *Mol. Biochem. Parasitol*, 128, 91–93.

Leroy, S., Duperray, C., and Morand, S. 2003. Flow cytometry for parasite nematode genome size measurement. *Mol. Biochem. Parasitol*, 128: 91–93.

Lewis, E.E., Cane, J.H. (1990) Cross-attractive pheromones of Group IX Ips reflect phylogenetic divergence. *Canadian Entomologist*, 122:1235–1238.

Lewis, W.J., Vet, L.E.M., Tumlinson, J.H., Van Lenteren, J.C., Papaj, D.R. (1990) Variations in parasitoid foraging behavior: essential element of a sound biological control theory. *Environ. Entomol.* 19: 1183-1193.

Lewis, E.E., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H., Peters, A. (2006) Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biol. Control*, 38: 66-79.

Lewis, E.E., Barbarosa, B., Gaugler, R. (2002) Mating and Sexual Communication by *Steinernema carpocapsae* (Nemata: Steinernematidae). *Journal of Nematology*, 34: 328–331.

Lichtenfels, J.R., Pilitt, P.A., Le Jambre, L.F. (1988) Spicule lengths of the ruminant stomach nematodes, *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei* and their hybrids. *Proceedings of Helminthological Society of Washington*, 55: 97-100.

Little, M.D., Orihel, T.C. (1972) The mating behaviour of *Anatrichosoma* (Nematoda) Trichuroidea. *Journal of Parasitology*, 58: 1019-1020.

Liu, K.S., Sternberg, P.A (1995) Sensory regulation of male mating behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron*, 14: 79-89.

Luc, M. (1961) Note préliminaire sur l'ê d'éplacement de *Hemicycliophora paradoxa* Luc (Nematoda-Criconematidae) dans le sol. *Nematologica*, 6: 95-106.

Luc, M., Lespinat, P., Souchaud, B. (1969) Marquage direct de *Hemicycliophora paradoxa* par le phosphore radioactif. Utilisation pour l'étude des d'éplacements des n'ematodes phytoparasites dans le sol. *Nematologica* 15: 35-43.

Luque, J.L., Vieira, F.M., Herrmann, K., King, T.M., Poulin, R., Lagrue, C. (2010) New evidence on a cold case: trophic transmission, distribution and host-specificity in *Hedruris spinigera* (Nematoda: Hedruridae). *Folia Parasitologica*, 57: 223–231.

Maertens, D., Coomans, A. (1978) The function of the demainian system and an atypical copulatory behavior in *Oncholaimus oxyuris*. *Annals of the Royal Society of Zoology of Belgium*, 108: 83-87.

Malakhov, V. V. and Akimushkina, M. I. (1976). Embryonic development of the free-living nematode *Enoplus brevis*. *Zoological Journal*, 55: 1788-1799.

Malakhov, V.V. (1994) *Nematodes. Structure, development, classification and phylogeny*. In: Hope, W.D. (ed.). Washington and London: Smithsonian Institution Press, 286 pp.

Maneesakorn, P., An, R., Daneshvar, H., Taylor, K., Bai, X., Adams, B. J., Grewal, P.S., Chandrapatya, A. (2011) Phylogenetic and cophylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditis: Rhabditida) and their symbiotic bacteria (Photorhabdus: Enterobacteriaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59: 271–280.

McClung, C.E. (1902) The accessory chromosome - sex determinant? *Biol. Bull. Lab*, 3: 43-84.

McCulloch, D., Gems, D. (2003) Evolution of male longevity bias in nematodes. *Aging Cell*, 2: 165-173.

McLaren, D.J. (1973) Oogenesis and fertilization in *Dipetalonema vitme* (Nematoda: Filarioidea). *Parasitology*, 66: 465-472.

Meldal, B. H., Debenham, N. J., De Ley, P., De Ley, I. T., Vanfleteren, J. R., Vierstraete, A. R., Bert, W., Borgonie, G., Moens, T., Tyler, P. A., Austen, M. C., Blaxter, M. L., Rogers, A. D., Lamshead, P. J. (2007) An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. *Mol. Phylogenet. Evol*, 42: 622–636.

Miller, M. A., Nguyen, V.Q., Lee, M. H., Kosinski, M., Schedl, T., Caprioli, R. M. and Greenstein, D. (2001) A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science*, 291: 2144-2147.

Miller, D.M., Shakes, D.C. (1995) Immunofluorescence microscopy. *Meth. Cell Biol*, 48: 65-394.

Minas, R. S., Dolinski, C.M., Carvalho, R.S., Souza, R.M. (2011) Controle biológico da mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata* utilizando nematoide entomopatogênicos em laboratório. *Scientia Agraria*, 12: 115-119.

Mitreva, M., Blaxter, M.L., Bird, D.M., McCarter, J.P. (2005) Comparative genomics of nematodes. *Trends in Genetics*, 21: 573-581.

Moore, L.L., M. Morrison, and Roth, M.B. 1999. HCP-1, a protein involved in chromosome segregation, is localized to the centromere of mitotic chromosomes in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol*, 147: 471-480.

Moore, L.L., M. Morrison, and Roth, M.B. 1999. HCP-1, a protein involved in chromosome segregation, is localized to the centromere of mitotic chromosomes in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol*, 147: 471-480.

Moreira P.L., Nunes, V.L., Martin, J., Paulo, O.S. (2007) Copulatory plugs do not assure high first male fertilisation success: sperm displacement in a lizard. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62: 281-288.

Muller, F. and Tobler, H. (2000) Chromatin diminution in the parasitic nematodes *Ascaris suum* and *Parascaris univalens*. *Int. J. Parasitol*, 30: 391–399.

Mulvey, R.H. (1960) Oogenesis in some species of *Heterodera* and *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae). In: Sasser, J.N., Jenkins, W.R. (ed.). *Nematology fundamentals and recent advances*. North Caroline: Chapel Hill. p. 323-330.

Munro, E., Nance, J., Priess, J.R. (2004) Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior–posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Dev. Cell*, 7: 413–424.

Nadine Timmermeyer, Tobias Gerlach, Christian Guempel, Johanna Knoche, Jens F Pfann, Daniel Schliessmann, Nico K Michiels. (2010) The function of copulatory plugs in *Caenorhabditis remanei*: hints for female benefits. *Frontiers in Zoology*, 28: 1-7.

Nejsum, P.E.D., Parker Jr., J., Frydenberg, A., Roepstorff, Boes, J., Haque, R., Astrup, Ingrid., Prag, J., Sørensen, U.B.S. (2005) *Ascariasis* is a zoonosis in Denmark. *J. Clin. Microbiol*, 43: 1142–1148.

Netscher, C. (1969) L'ovogénèse et la reproduction chez *Heterodera oryzae* et *Heterodera sacchari* (Nematoda: Heteroderidae). *Nematologica*, 15: 10-14.

Nickle, W.R. (1984) History, development and importance of insect nematology. *In: Nickel, W.R. (ed.) Plant and insect nematodes.* p. 627-653.

Niedermaier, J., and Moritz, K.B. (2000) Organization and dynamics of satellite and telomere DNAs in *Ascaris*: implications for formation and breakdown of compound chromosomes. *Chromosoma*, 109: 439–452.

Nigon, V., Guerrier, P., Monin, H. (1960). L'architecture polaire de l'oeuf et les mouvements des constituants cellulaires au cours des premières étapes du développement chez quelques nématodes. *Bull. Biol. Fr. Belg*, 94: 131–202.

Oliveira, C. M.G., Monteiro, A.R., Blok, V.C. (2011) Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. *Tropical Plant Pathology*, 36 (2): 065-073.

Otto, S.P., and Whitton, J. (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet*, 34: 401–437.

Parker, G. (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Review*, 45: 525-567.

Parker, G.A. (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in insects. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 45: 525-567.

Peters, A. (1996) The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Sci. Technol*, 6: 389-402.

Peters, A., Ehlers, R.U. (1997) Encapsulation of the entomopathogenic nematode *Steinnema feltiae* in *Tipula oleracea*. *J. Invertebr. Pathol*, 69: 218-222.

Pires-daSilva, A. (2007) Evolution of the control of sexual identity in nematodes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18: 362-370.

Platt, H.M. (1994). Foreward. In: S. Lorenzen, (ed.) *The phylogenetic systematics of free-living nematodes*. London: The Ray Society. pp. i-ii

Poinar Jr., G.O., (1966) The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoplectana* sp. (Steinernematidae: Nematoda). *Nematologica*, 12: 105-108.

Poinar Jr., G.O., Thomas, G.M., Hess, R., (1977) Characteristics of the specific bacterium associated with *Heterorhabditis bacteriophora* (Heterorhabditidae: Rhabditida). *Nematologica*, 23: 97-102.

Poinar Jr., G.O. (1989) Non-insect hosts for the entomogenous rhabditoid nematodes *Neoplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). *Rev. Nematol*, 12: 423-28.

Poinar Jr, G.O. (1990) Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R.; Kaya, H.K. (eds.) *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton. FL, USA: CRC Press, p. 23-60.

Poinar Jr., G.O. (1993) Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Fundam. Appl. Nemat.*, 16: 333-338.

Popiel, I., Friedman, M.J., Grove, D.L. (1989) Infective juvenile formation in the insect parasitic nematode *Steinernema feltiae*. *Parasitology*, 99: 77-81.

Priess, J. R., Thomson, J. N. (1987). Cellular interactions in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 48: 241–250.

Ramm SA, Parker GA, Stockley P. (2005) Sperm competition and the evolution of male reproductive anatomy in rodents. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 272: 949-955.

Read, A.F., Viney, M.E. (1996) Helminth immunogenetics: why brother? *Parasitology Today*, 12: 337-343.

Richardson, W.H., Schmidt, T.M., Nealson, K.H. (1988) Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 1602-1605.

Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., Priess, J.R. (1997) D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer, J.R. *C. elegans* II. Priess. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Rovesti, L., Heinzpeter, E.W., Tagliente, F., Deseo, K.V. (1988) Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica*, 34: 462-476.

Rovesti, L., Deseo, K.V. (1990) Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica*, 36: 237-245.

Sadler, P.L., Shakes, D.C. (2000) Anucleate *Caenorhabditis elegans* sperm can

crawl, fertilize oocytes and direct anterior-posterior polarization of the I-cell embryo. *Development*, 127: 355-366.

Santana, H., Pires, E., Comerlato, A.P., Nasu, E.G.C., Furlanetto, C. (2009) Variabilidade genética em populações de campo do nematóide de cisto da soja provenientes dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul. *Tropical Plant Pathology*, 34: 261-264.

Sarr, E., Coomans, A., Luc, M. (1987) Development and life cycle of *Neodolichodorus rostrulatus* (Siddiqi, 1976) with observations on the copulatory plug (Nematoda: Tylenchina). *Revue de Nematologie*, 10: 87-92.

Schierenberg, E. (2005). Unusual cleavage and gastrulation in a freshwater nematode: developmental and phylogenetic implications. *Development Genes and Evolution*, 215: 103- 108.

Schierenberg, E. (2006) Embryological variation during nematode development. In: The *C. elegans* Research Community, (Ed.), WormBook, 2006, pp. 1–13. (WormBook, doi:10.1895/wormbook.1.55.1).

Schierenberg, E. and Schulze, J. (2008) Many roads lead to Rome: different ways to construct a nematode. In: Minelli, A. and Fusco, G. (eds.) *Evolving Pathways: Key Themes in Evolutionary Developmental Biology*. Cambridge University Press, p. 259-278.

Schneider, A. (1873). Sur quelques points de l'histoire du genre *Gregarina*. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, Série 1 2:514–533.

Schulze, J., Schierenberg, E. (2008). Cellular pattern formation, establishment of polarity and segregation of colored cytoplasm in embryos of the nematode *Romanomermis culicivorax*. *Developmental Biology*, 315: 426–436.

Schulze, J., Schierenberg, E. (2009) Embryogenesis of *Romanomermis culicivora*: An alternative way to construct a nematode. *Developmental Biology*, 334: 10–21.

Scott, A.L., Dinman, L, Sussman, O.J., Ward, S. (1989a) Major sperm protein and actin genes in free-living and parasitic nematodes. *Parasitology*, 98: 471-478.

Severson, A. F., Bowerman, B. (2003) Myosin and the PAR proteins polarize microfilament-dependent forces that shape and position mitotic spindles in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol*, 161: 21–26.

Shine, R., Olsson, M.M., Mason, R. (2000) Chastity belt in gartersnakes: the functional significance of mating plugs. *Biological Journal of the Linnean Society*, 70: 377-390.

Simmons, L.W. (2001) *Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects*. Princeton: Princeton University Press, 448 p.

Skiba, F. & Schierenberg, E. (1992) Cell lineages, developmental timing and spatial pattern formation in embryos of free-living soil nematodes. *Developmental Biology*, 151: 597- 610.

Skiba, F., Schierenberg, E. (1992) Cell lineages, developmental timing, and spatial pattern formation in embryos of free-living soil nematodes. *Dev. Biol*, 151: 597 610.

Snook, R.R. (2005) Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology & Evolution*, 20: 46-53.

Somers, J.A., Shorey, H.H., Gaston, L.K. (1976) Reproductive biology and behaviour of *Rhabditis pellio* (Schneider) (Rhabditida: Rhabditidae). *Journal of Nematology*, 9: 143-148.

Somers, J.A., Shorey, H.H., Gaston, L.K. (1976) Reproductive biology and behaviour of *Rhabditis pellio* (Schneider) (Rhabditida: Rhabditidae). *Journal of Nematology*, 9: 143-148.

Somers, J.A., Shorey, H.H., Gaston, L.K. (1977) Reproductive biology and behavior of *Rhabditis pellio*. *J. Nematol*, 9: 143-148.

Sommer, R.J., Sigrist, C.B., Grandien, K., Jungblut, B., Eizinger, A., Adamis, H., Schlak, I. (1999) A phylogenetic interpretation of nematode vulval variations. *Invertebr. Reprod. Dev*, 36: 57-65.

Sommerville, R.I., Weinstein, P.P. (1964) Reproductive behaviour of *Nematospiroides dibius* *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Parasitology*, 40, 401-409.

Špakulová, M., and Casanova, J.C. 2004. Current knowledge on B chromosomes in natural populations of helminth parasites: a review. *Cytogenet. Genome Res*, 106: 222-229.

Spieler, M., Schierenberg, E. (1995) On the development of the alternating free-living and parasitic generations of the nematode *Rhabdias bufonis*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 28: 193-203.

Stein, L.D., Bao, Z., Blasiar, D., Blumenthal, T., Brent, M.R., Chen, N., Chinwalla, A., Clarke, L., Clee, C., Coghlan, A., Coulson, A., D'Eustachio, P., Fitch, D.H., Fulton, L.A., Fulton, R.E., Griffiths-Jones, S., Harris, T.W., Hillier, L.W., Kamath, R., Kuwabara, P.E., Mardis, E.R., Marra, M.A., Miner, T.L., Minx, P., Mullikin, J.C., Plumb, R.W., Rogers, J., Schein, J.E., Sohrmann, M., Spieth, J., Stajich, J.E., Wei, C., Willey, D., Wilson, R.K., Durbin, R., Waterston, R.H. 2003. The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *Plos. Biol*, 1(2): E45.

Sternberg, P.W., and Félix, M.A. (1997) Evolution of cell lineage. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 7: 543-550.

Stock, P.J., Griffin, C.T., Chaerani, R. (2004) Morphological and molecular characterization of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationship with other members of the genus. *Nematology*, 6: 401-412.

Strauch, O., Stoessel, S., Ehlers, R.U. (1994) Culture conditions deWne automicitic or amphimictic reproduction in entomopathogenic rhabditid nematodes of the genus *Heterorhabditis*. *Fundam. Appl. Nematol*, 17: 575-582.

Stringfellow, F. (1974) Hydroxyl ion, an attractant to the male of *Pelodera Strongyloides*. *Proc. HefIII. Soc. Wash.* 41: 4-10.

Stuart, R.J., and Gaugler, R. (1994) Patchiness of populations of entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64: 39-45.

Su, X., K. Hayton and T. E. Wellems. (2007) Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Nat. Rev. Genet*, 8: 497-506.

Sudhaus, W. (1976) Vergleichende Untersuchungen zur Phylogenie, Systematik, Ökologie, Biologie und Ethologie der Rhabditidae (Nematoda). *Zoologica (Stuttg.)*, 43: 1-229.

Sulston, J. E., Horvitz, H.R. (1977) Post embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 56: 110-156.

Sulston, J.E., White, J.G. (1980) Regulation and cell autonomy during postembryonic development of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 78: 577-597.

Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., Thomson, J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100: 64–119.

Sulston, J.E. (1988) Cell lineage. *In*: Wood, W.B. (ed.). *The nematode C. elegans*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 123-155.

Tait, A., D. Masiga, J. Ouma, A. MacLeod, J. Sasse et al., 2002 Genetic analysis of phenotype in *Trypanosoma brucei*: a classical approach to potentially complex traits. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*, 357: 89–99.

Thornhill, R. (1983) Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *American Naturalist*, 122: 765-788.

Tihohod, D. (1993) *Nematologia agricola aplicada*. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 372 p.

Todd, T.C. (1989) Population dynamics and damage potential of *Belonolaimus* sp. on corn. *Journal of Nematology*, 21: 697-702.

Trdan, S., Vidrih, M., Valič, N., Laznik, Ž. (2008) Impact of entomopathogenic nematodes on adults of *Phyllotreta* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae) under laboratory conditions. *Acta Agriculturae Scandinavica, B Soil Plant Science*, 58: 169-175.

Triantaphyllou, A.C. (1962) Oogenesis in the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, 7: 105-113.

Triantaphyllou, A.C. (1970) Oogenesis and reproduction of the birch cyst nematode *Heterodera betulae*. *J. Nematol*, 2: 399-403.

Triantaphyllou, A.C. (1984) Polyploidy in meiotic parthenogenetic populations of *Meloidogyne hapla* and a mechanism of conversion to diploidy. *Rev. Nematol*, 7: 65–72.

Triantaphyllou, A.C. (1985) Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. *In*: Sasser, J.N.; Carter, C.C. (ed.). *An advanced treatise on Meloidogyne*, p. 113-126.

Troell, K., Engstrom, A., Morrison, D.A., Mattsson, J.G., Hoglund, J. (2006) Global patterns reveal strong population structure in *Haemonchus contortus*, a nematode parasite of domesticated ruminants. *Int. J. Parasitol*, 36: 1305–1316.

van Megen, H., Van Den Elsen, S., Holterman, M., Karssen, G., Mooyman, P., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., Helder, J. (2009) A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology*, 11: 927-950.

Van Valen, L. (1973) A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, 1: 1-30.

Van Waerebeke, D., Remillet, M. (1973) Morphologie et biologie de *Heterogonema ovomasculis* n. sp. (Nematoda: Tetradonematidae) parasite de nitidulidae. *Nematologica*, 19: 80-92.

Vangestel, S., Houthoofd, W., Bert, W., Borgonie, G. (2008) The early embryonic development of the satellite organism *Pristionchus pacificus*: differences and similarities with *Caenorhabditis elegans*. *Nematology*, 10: 301–312.

Vine, M.E., Mattheus, B.E., Walliker, D. (1993) Mating in the nematode parasite *Strongyloides ratti*: proof of genetic exchange. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 254: 213-219.

Voronov, D.A., Panchin, Y.V. (1998) Cell lineage in marine nematode *Enoplus brevis*. *Development*, 125: 143–150.

Voronov, D.A. (1999) The embryonic development of *Pontonema vulgare* (Enoplida: Oncholaimidae) with discussion of nematode phylogeny. *Russian Journal of Nematology*, 7: 105-114.

Voronov, D. A. and Panchin, Yu. V. (1995) Gastrulation in the free-living marine nematode *Enoplus brevis* (Enoplida: Enoplidae) and the localization of endodermal material at the stage of two blastomeres within nematodes of order Enoplida. *Zoological Journal*, 74: 10-18.

Voronov, D.A., Makarenkova, E.P., Nezhlin, L.P., Panchin, Yu, V., Spiridonov, S.E. (1986) The investigation of embryonic development of free-living marine nematode *Enoplus brevis* (Enoplida) by the method of blastomere labeling. *Proceedings of the Academy of Sciences*, 286: 201-204.

Wallenfang, M. R. and Seydoux, G. (2000) Polarization of the anterior posterior axis of *C. elegans* is a microtubule-directed process. *Nature*, 408: 89-92.

Walton, A.C. (1959) Some parasites and their chromosomes. *J. Parasitol*, 45: 1-20

Ward, S., Carrel, J.S. (1979) Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 73: 304-321.

Went, D.F., Krause, G. (1973) Normal development of mechanically activated, unlaidd eggs of an endoparasitic hymenopteran. *Nature*, 244: 454-455.

West, S.A., Gemmill, A.W., Graham, A., Viney, M.E., Read, A.F. (2001) Immune stress and facultative sex in a parasitic nematode. *Journal of Evolutionary Biology*, 14: 333-337.

White, G.F. (1927) A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Sci*, 30: 302-303.

Wiegner, O., Schierenberg, E. (1998) Specification of gut cell fate differs significantly between the nematodes *Acroboloides nanus* and *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 204: 3-14.

Wiegner, O., Schierenberg, E. (1999) Regulative development in a nematode embryo: a hierarchy of cell fate transformations. *Developmental Biology*, 215: 1-12.

Wilkins, A.S. (2002) The Evolution of Developmental Pathways. *BioScience*, 52: 1043-1044.

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

Wood, W.B. (1991) Evidence from reversal of handedness in *C. elegans* embryos for early cell interactions determining cell fate. *Nature*, 349: 536-538.

Wood, W.B. (1988) Embryology. In: Wood, W.B. (ed.). *The nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory. p. 215-241.

Wouts, W.M. (1981) Mass production of a entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* on artificial media. *Nematology*, 13: 467-469.

Yeates, G.W., Boag, B. (2003) Growth and life histories in Nematoda, with particular reference to environmental factors. *Nematology*. 5: 653-664.

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