

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS E DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS PARA O
CONTROLE BIOLÓGICO DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Juliana De Marco Salvadori

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientação: Dr^a. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Porto Alegre, Dezembro de 2011.

Este trabalho foi desenvolvido nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Proteínas Tóxicas do Centro de Biotecnologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS,
- Laboratório de Entomologia da Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária da
Universidade de Passo Fundo - UPF,
- Laboratório de Entomologia e Laboratório de Biotecnologia da EMBRAPA
Trigo - CNPT Passo Fundo.

O trabalho realizado teve suporte financeiro das instituições financiadoras:

- Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES,
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq,
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul -
FAPERGS e
- Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

BANCA EXAMINADORA

Dra. Marcia Maria Auxiliadora Naschenveng Pinheiro Margis
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia
Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Carlos Peres Silva
Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Diogo Ribeiro Demartini
Revisor e membro suplente
Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Célia, pela paciência, confiança e oportunidade de aprendizado.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPERGS e FINEP.

Aos professores e alunos do PPGBCM, pela convivência e colaboração.

A EMBRAPA Trigo pela disponibilização dos NEPETs e apoio dos laboratórios de pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Proteínas Tóxicas e do Laboratório de Entomologia pela colaboração técnica e coleguismo.

Ao meu esposo Rodrigo pela compreensão e companheirismo.

Aos meus pais José Roberto e Tânia pelo incentivo e apoio nos momentos de dificuldade.

A toda minha família e amigos, que torceram por mim.

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
A PRODUÇÃO AGRÍCOLA E O IMPACTO DA HERBIVORIA	18
<i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> : UMA PRAGA COSMOPOLITA E POLÍFAGA	20
NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS	21
NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS	23
BACTÉRIAS SIMBIONTES DE NEPS	24
UREASES	26
UREASES DE BACTÉRIAS E FUNGOS	27
UREASES DE PLANTAS	27
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS UREASES	28
ATIVIDADE INSETICIDA DAS UREASES E DA CANATOXINA	29
OBJETIVOS.....	32
OBJETIVO GERAL.....	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS	34
CAPÍTULO I.....	36
VIRULÊNCIA DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS A LARVAS DE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	36
1. <i>Introdução</i>	37
2. <i>Materiais e métodos</i>	38
3. <i>Resultados</i>	42
4. <i>Discussão</i>	48
CAPÍTULO II.....	52
CHARACTERIZATION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES AND SYMBIOTIC BACTERIA ACTIVE AGAINST <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) AND CONTRIBUTION OF BACTERIAL UREASE TO THE INSECTICIDAL EFFECT	52
DISCUSSÃO	87
CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
APÊNDICES	123
I. VIRULÊNCIA DOS NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (NEPETS) PARA LAGARTAS DE ÚLTIMO INSTAR DE <i>S. FRUGIPERDA</i> - REGRESSÃO LINEAR DA MORTALIDADE PROPORCIONAL E DOSE PARA CADA TEMPO	124

II. SUBMISSÃO DO MANUSCRITO PARA O PERIÓDICO <i>BIOLOGICAL CONTROL</i>	133
.....	135
III. ACEITE DO MANUSCRITO NO PERIÓDICO <i>BIOLOGICAL CONTROL</i>	136
<i>CURRICULUM VITAE RESUMIDO</i>.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Graus Celsius

A: Absorbância

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3'-indol fosfato

BOD: Estufa incubadora

Bt: *Bacillus thuringiensis*

CO₂: dióxido de carbono

DL: Dose letal

DNA: Ácido desoxirribonuclêico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético

IgG: Imunoglobulina G

g: Grama

g: Força relativa de centrifugação

JBU: Urease de *Canavalia ensiformis*

Jl: Juvenil infectivo

kDa: Quilodaltons

LB: Meio de cultura Luria-Bertani

M: Molar

min: Minuto

µg: Micrograma

mM: Milimolar

µL: Microlitro

mL: Mililitro

MW: Marcador de massa molecular

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NBTA: Meio de cultura contendo azul de bromotimol e cloreto de trifetil tetrazólio

NBT: Azul de tetrazolina

NEPs: Nematóides entomopatogênicos

NEPETs: Nematóides entomopatogênicos da EMBRAPA Trigo

p-OHMB: *p*-hidroximercuribenzoato de sódio

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PVC: Policloreto de vinila

PVDF: Difluoreto de polivinilideno

rDNA: DNA ribossomal

rpm: Rotações por minuto

SDS: Dodecil-sulfato de sódio

SDS-Page: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

U: unidade

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPNs) and symbiotic bacteria represent one of the best non-chemical strategies for insect control. Infective juveniles of *Heterorhabditis* sp. and *Steinernema* sp. nematodes actively seek the host in the soil, penetrating through insect's natural openings to reach the hemocoel where symbiotic bacteria *Photorhabdus* sp. and *Xenorhabdus* sp., respectively, are released and rapidly kill the insect host. The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) is one of the major insect pests in corn (*Zea mays*) crops in Brazil, with infestations resulting in reduction up to 39% yield and losses amounting US\$ 500 millions annually. Native strains of entomopathogenic nematodes active against *S. frugiperda* represent a promising alternative to the intensive use of chemical insecticides to control fall armyworm population in corn plantations. This study characterized the pathogenicity of eight EPNs isolates of regional incidence (denominated NEPETs) in stages where pest is associated to the soil. Tests were conducted with last instar larvae (*in vitro*) and in prepupae stage (*in vitro* and in soil). Data indicate that the highest mortality percentages, either for worms or prepupae, were produced by isolates of the Heterorhabditidae family. These isolates were also the ones that produced higher amounts of IJs/larvae showing the multiplication capacity of NEPETs on the host insect. Symbiotic bacteria associated to the entomopathogenic nematodes were successfully isolated and classified taxonomically both by phenotypic-biochemical criteria and sequencing of 16S rDNA. Isolated bacteria, identified as *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, injected into *S. frugiperda* hemocoel produced high levels of lethality particularly those from Heterorhabditidae family. We also studied the urease production of four entomopathogenic bacteria, two *Photorhabdus* and two *Xenorhabdus*, both *in vitro* and during the course of infection caused by injection of the bacteria. The pattern of urease production *in vitro* followed the bacteria growth curve accumulating in high levels towards the stationary phase. The data suggest a positive correlation between urease production by the bacteria and their entomopathogenic effect. There is direct correlation between the specific

activity reached by acidic ureases at the stationary phase and mortality induced by injecting bacteria into *S. frugiperda* larvae.

RESUMO

Nematóides entomopatogênicos (NEPS) e bactérias simbiotes representam uma das estratégias não-químicas mais bem sucedidas para o controle de insetos. Os juvenis infectivos dos nematóides *Heterorhabditis* sp. e *Steinernema* sp. buscam o hospedeiro no solo, o penetram através de aberturas naturais e rapidamente matam o inseto pela liberação, na hemocele, de bactérias entomopatogênicas dos gêneros *Photorhabdus* sp. e *Xenorhabdus* sp., respectivamente. A lagarta militar, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das principais pragas da cultura do milho (*Zea mays*) no Brasil e os danos provocados pelo inseto reduzem o rendimento da cultura em até 39% e perdas de 500 milhões de dólares anuais. Isolados nativos de nematóides entomopatogênicos ativos contra *S. frugiperda* representam uma alternativa promissora ao uso intensivo de inseticidas químicos para o controle da lagarta-militar nas plantações de milho. Este estudo caracterizou a patogenicidade de oito isolados NEPs de incidência regional (denominados NEPETs) para o controle da praga em estádios associados ao solo. Os testes foram realizados com larvas de último ínstar (*in vitro*) e na fase de pré-pupa (*in vitro* e no solo). Os dados indicam que os percentuais de mortalidade mais elevados, tanto para lagartas como para pré-pupas, foram produzidos por isolados da família Heterorhabditidae. Estes isolados também foram os que produziram maior número de juvenis infectivos/larva mostrando a capacidade de multiplicação de NEPETs neste hospedeiro. As bactérias simbióticas associada aos nematóides entomopatogênicos foram isoladas, caracterizadas por testes bioquímicos e classificadas com base no seqüenciamento do 16S rDNA. Os isolados bacterianos, identificados como *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, quando injetados na hemocele de *S. frugiperda* produziram altos níveis de letalidade particularmente aqueles obtidos a partir dos nematóides da família Heterorhabditidae. Também avaliou-se a produção de urease de quatro bactérias entomopatogênicas, duas *Photorhabdus* e duas *Xenorhabdus*, *in vitro* e ao longo da infecção promovida pela injeção de bactérias. O padrão de produção de urease *in vitro* seguiu a curva de crescimento bacteriano e houve

acúmulo da enzima na fase estacionária. Os dados sugerem uma correlação positiva entre a produção de urease pela bactéria e os efeitos entomopatogênicos sobre as lagartas. Há correlação direta entre a atividade específica alcançada por ureases ácidas na fase estacionária e mortalidade induzida por bactérias injetadas em lagartas de *S. frugiperda*.

INTRODUÇÃO

A produção agrícola e o impacto da herbivoria

Dados da *Food and Agriculture Organization* (2002) sobre o panorama da agricultura brasileira para o período 2015/2030 apontam para a redução da taxa de expansão de áreas cultivadas e o aumento da rentabilidade, sendo que entre as safras de 1995/1996 e 2001/2002, a produção agrícola passou de 69 para 100 mil toneladas com um incremento de 31,8% na rentabilidade. Com base nesta tendência, concentrar esforços na melhoria dos processos de produção e na redução das perdas causadas por insetos constituem-se as principais formas de aumento da produtividade.

Insetos fitófagos não são apenas responsáveis por perdas diretas de produtividade resultantes da herbivoria, mas também por perdas indiretas, pois alguns agem como vetores de patógenos. Os danos, diretos e indiretos, resultantes da alimentação dos insetos e os recursos despendidos para a implementação de estratégias de controle, estão entre as maiores causas de perdas econômicas na agricultura, comprometendo 37% e 45% da produção, respectivamente (Gatehouse, 1992; Banthi & Taneja, 2007). A demanda pelo controle de insetos-pragas acarreta na utilização de defensivos químicos (inseticidas, acaricidas, fungicidas etc.) tanto nos processos produtivos como na conservação dos estoques, o que coloca o Brasil em segundo lugar no consumo mundial de agrotóxicos (ANVISA, 2006). Sabe-se que o controle químico de insetos-praga pode trazer efeitos prejudiciais, como a contaminação do meio ambiente e de alimentos e a eliminação de parasitóides e predadores, agentes de controle biológico das pragas, além de favorecer o surgimento de espécies de insetos resistentes a inseticidas.

Assim, o interesse coletivo tem exigido o desenvolvimento de métodos de controle de pragas alternativos, caracterizados pelo menor impacto ambiental, menor risco para a saúde humana e que se enquadrem dentro da estratégia de manejo integrado de pragas.

O uso de biopesticidas de origem microbiana e vegetal, como estratégia de proteção ao meio ambiente e de minimizar riscos de resíduos no alimento, vem ganhando aceitação no mundo inteiro. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é considerado o principal agente microbiano utilizado como biopesticida no controle de lepidópteros, pela vantagem de apresentar toxicidade seletiva para

alguns insetos, não gerar resíduos poluentes e de não atingir outros organismos (mamíferos, aves, peixes etc.) (Gatehouse, 2002; Musser & Shelton, 2003). No entanto, o surgimento de insetos resistentes e a existência de insetos não suscetíveis às conhecidas toxinas de *Bt*, despertaram o interesse para o estudo de alternativas ecologicamente corretas com potencial inseticida, que possam ser usadas isoladamente ou em associação com outras já descritas, no controle de insetos-alvo (McGaughey & Whalon, 1992; Gatehouse, 2002; Soberón *et al.*, 2009; Ibrahim *et al.*, 2010).

***Spodoptera frugiperda*: uma praga cosmopolita e polífaga**

A larva de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto cosmopolita e polífago, que se alimenta de um grande número de plantas de importância agrícola, principalmente gramíneas (Metcalf *et al.*, 1962; Labrador, 1967), sendo conhecida como lagarta-do-cartucho do milho ou lagarta-militar. Nas Américas, é considerada uma das principais pragas do milho (*Zea mays*), tanto pelos danos causados na cultura quanto pela dificuldade de controle (Ortega, 1987; Wiseman, 1999; Waquil *et al.*, 2002).

Em milho, os danos decorrem principalmente do ataque às folhas que, desde novas são raspadas pelas lagartas nos estágios iniciais. A partir do 3º ínstar, a lagarta penetra no cartucho destruindo expressivas porções das folhas, comprometendo a atividade fotossintética da planta (Hynes, 1942; Leiderman & Sauer, 1953). A lagarta também apresenta o hábito de atacar espigas e o colmo das plantas junto ao solo (Salvadori *et al.*, 2007).

As perdas causadas por *S. frugiperda* na produção de grãos na cultura de milho variam de 17,0 a 38,7% dependendo do ambiente, do estágio de desenvolvimento e do estado nutricional das plantas atacadas e com as práticas agronômicas adotadas (Cruz & Turpin, 1983; Williams & Davis, 1990; Cortez & Waquil, 1997; Cruz *et al.* 1999).

No Brasil, os prejuízos podem atingir 500 milhões de dólares anuais, acrescidos por perdas indiretas com os gastos nas aplicações de inseticidas químicos (Cruz *et al.*, 1998; Waquil *et al.*, 2002). O uso destes produtos é a forma mais comum de controle da lagarta-do-catucho, no entanto traz consigo os já referidos riscos inerentes ao uso de agrotóxicos. Além disso, já foram constatadas populações de *S. frugiperda* resistentes a inseticidas e mesmo à proteínas de *Bt* expressadas por genótipos de milho geneticamente modificados. Este conjunto de situações justifica a busca de outras alternativas para o controle desta praga.

Nematóides entomopatogênicos

Nematóides são animais de corpo alongado, cilíndrico e fusiforme, pertencentes ao Filo Nematoda (do grego "em forma de fio") (Wright, 1991). Ocupam ecossistemas terrestres e aquáticos, constituindo o mais numeroso grupo de metazoários existente no solo, incluindo espécies parasitas e de vida livre (Ruppert & Barnes, 1993).

Os nematóides de vida livre são importantes componentes da microfauna do solo. Estes invertebrados se alimentam de fungos, bactérias, resíduos orgânicos e outros nematóides, desempenhando desta forma papel essencial no ciclo de conversão de nutrientes e na fertilidade do solo. Os nematóides parasitas afetam seres humanos, animais domésticos e de interesse zootécnico, além de invertebrados e plantas.

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) são parasitos exclusivos de insetos, sendo que uma associação específica com bactérias simbiotes que confere ao complexo nematóide-bactéria a capacidade de induzir morte no inseto hospedeiro.

Os NEPs pertencem às famílias Steinernematidae, na qual *Steinernema* é o gênero entomopatogênico, e Heterorhabditidae, que possui um único gênero, *Heterorhabditis*. As bactérias associadas aos nematóides pertencem aos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente (Poinar, 1990).

O ciclo biológico dos NEPs acontece dentro do cadáver do inseto hospedeiro e compreende três fases de desenvolvimento: ovo, juvenil e adulto. A fase juvenil, constituída por quatro estádios larvais, acontece numa cultura pura da bactéria simbiote. A forma jovem de terceiro estádio (denominada juvenil infectivo) é altamente especializada. É o único estádio de vida livre que carrega as bactérias na luz do tubo digestório e está apta a suportar condições ambientais inadequadas, sobreviver no solo e buscar um novo hospedeiro. Ao localizá-lo, o juvenil infectivo (JI) invade o corpo do inseto por meio de aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos) ou perfurando a cutícula. Alcançando a hemocele, o JI libera células da bactéria na hemolinfa, as quais se multiplicam rapidamente e matam o inseto hospedeiro por septicemia, em 24 a 48 horas. Os NEPs alimentam-se dos nutrientes liberados e das próprias bactérias, que por sua vez já digeriram os tecidos do inseto morto. Os

nematóides então se desenvolvem e alcançam a fase adulta (Figura 1). O ciclo se repete por duas a três gerações até que haja indução para formação de JIs, os quais abandonam o cadáver e migram para o solo em busca de novo hospedeiro (Poinar, 1990; Grewal & Georgis, 1998; Koppenhöfer *et al.*, 2007). Biologicamente, os NEPS apresentam diferenças de acordo com o gênero a que pertencem. Normalmente, o desenvolvimento no hospedeiro se completa em três e sete dias para esteinernematídeos e heterorabditídeos, respectivamente; nesta mesma ordem, o período para a emergência dos JIs é de 6-11 e 12-14 dias (Kaya & Koppenhöfer, 1999). Os NEPs do gênero *Steinernema* produzem fêmeas e machos enquanto os do gênero *Heterorhabditis* originam fêmeas hermafroditas, e se diferenciam em machos e fêmeas apenas na segunda geração.

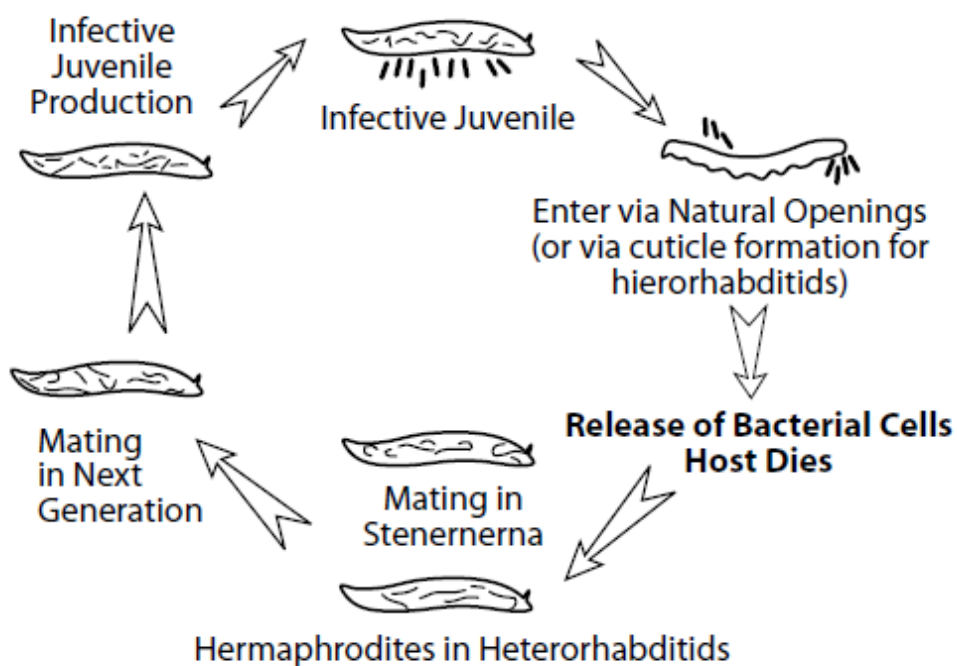


Figura 1. Ciclo de infecção e desenvolvimento dos nematóides entomopatogênicos (Miles *et al.*, 2000).

De acordo com o comportamento de procura do hospedeiro, os NEPs podem ser classificados com emboscadores ou cruzadores (Kondo & Ishibashi, 1986; Campbell *et al.*, 1996). Nematóides de espécies emboscadoras erguem o corpo, apoiando-se sobre a cauda, aptos para infectar hospedeiros que se movimentam sob a superfície do solo. Nas espécies cruzadoras, os indivíduos

movem-se ativamente dentro do solo à procura do hospedeiro, localizando-os pelos produtos de excreção (níveis de CO₂) e gradientes de temperatura. NEPs com comportamento facultativo, ora emboscadores ora cruzadores, alternam suas características de acordo com a proximidade do inseto hospedeiro aumentando a probabilidade de encontrá-lo.

Nematóides entomopatogênicos no controle biológico de pragas

Vários fatores tornam os NEPs fortes candidatos para incorporação em programas de manejo integrado de pragas:

- a) capacidade de dispersão no solo e de busca pelo inseto hospedeiro,
- b) capacidade de matar insetos-alvo em baixas doses e curto espaço de tempo (24-48horas),
- c) capacidade de reciclagem e conservação no ambiente por meio do próprio inseto hospedeiro e,
- d) facilidade de multiplicação em laboratório (Bathon, 1996; Ehlers & Hokannen, 1996; West & Vrain, 1997; Medeiros *et al.*, 2000).

Em formulações comerciais, os NEPs resistem a forças de cisalhamento e podem ser aplicados a campo com equipamentos convencionais de pulverização (Garcia *et al.*, 2008). Por serem sensíveis a baixa umidade, alta temperatura e radiação ultravioleta, os NEPs se prestam especialmente para uso no controle de pragas subterrâneas ou com uma ou mais fases do ciclo de vida associadas ao solo.

Espécies de nematóides das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae têm sido utilizadas para controlar populações de insetos-praga em uma variedade de agroecossistemas (Georgis *et al.*, 2006).

Bactérias simbiotes de NEPs

Diversos simbiotes de insetos e de vertebrados são membros da classe γ -proteobacteria que compreendem patógenos humanos e animais, como os membros das famílias Enterobacteriaceae, Legionellaceae, Pasteurellaceae e Vibrionaceae, além dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*.

Photorhabdus spp. e *Xenorhabdus* spp. pertencem à família Enterobacteriaceae e estão presentes no intestino dos NEPs das famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae, respectivamente.

Inicialmente, bactérias simbiotes de nematóides entomopatogênicos eram agrupadas em único gênero (*Xenorhabdus*). No entanto, estudos de gnotobiologia, análises de DNA e caracterização fenotípica permitiram o desmembramento de referido gênero em dois: *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* (Akhurst, 1983; Boemare *et al.*, 1993).

No processo de infecção pelos NEPs, as células bacterianas são liberadas na hemolinfa do hospedeiro aproximadamente 5 horas após a penetração dos JIs, levando o inseto à morte num intervalo de 24 a 48 horas (Forst *et al.*, 1997). A eficiência com a qual o complexo nematóide-bactéria mata o hospedeiro depende da espécie, do estado fisiológico e imunológico do inseto infectado e de particularidades da espécie bacteriana (Akhurst & Dunphy, 1993).

A patogenia da infecção é atribuída à bactéria simbiote, motivo pelo qual muitos grupos de pesquisa têm investido no detalhamento de rotas metabólicas e de genes relacionados à patogenicidade e à interação com o nematóide.

Para se multiplicar na hemolinfa do hospedeiro, como parte de seu ciclo de vida, as bactérias entomopatogênicas devem estar adaptadas e ser suficientemente capazes para superar a resposta imunológica do inseto hospedeiro.

Perante uma infecção bacteriana, os insetos desencadeiam resposta celular e humoral. As reações celulares incluem aglutinação, fagocitose, nodulação e encapsulação. A resposta humoral envolve a indução da síntese de proteínas antibacterianas (como cecropinas, atacinas, dipterocinas e

defensinas), além da síntese de lisozimas, lectinas e a ativação da fenoloxidase (Silva, 2002).

Entre os fatores relacionados às propriedades inseticidas de bactérias entomopatogênicas destacam-se os complexos proteicos de indução de apoptose dos hemócitos (toxinas TcA, TcB, TcC, Mcf1, XptA2, XptB1 e XptC1) e compostos de inibição da fosfolipase A_2 que comprometem a resposta imunológica dos insetos (French-Constant & Bowen, 2000; French-Constant *et al.*, 2007; Forst *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2002; Sheets *et al.*, 2011). As toxinas de indução de apoptose agem sobre a actina e Rho-GTPases (Dowling *et al.*, 2004; Dowling *et al.*, 2007; Fieldhouse & Merrill, 2008; Lang *et al.*, 2010; Lang *et al.*, 2011).

O interesse nestes gêneros bacterianos é bastante grande, uma vez que *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* possuem duas variantes fenotípicas. (Forst *et al.*, 1997). As variantes I e II são igualmente patogênicas para os insetos, mas diferem no estabelecimento da associação com o nematóide. Variantes II são incapazes de desempenhar esta função, além de não serem retidas no tubo digestivo do JI, comprometendo a manutenção do ciclo de vida das duas espécies. Estudos de proteômica destes fenótipos apontam que a variante I é marcada pela expressão em larga escala dos produtos metabólicos ligados à patogenicidade causada ao inseto, além do controle de outras populações bacterianas. A variante II caracterizada pelos produtos primários de metabolismo e de fatores estruturais ligados à reprodução (Turlin *et al.*, 2006). A diferenciação entre as variantes faz-se através do meio NBTA, pela absorção do azul de bromotimol e redução do cloreto de trifênil-tetrazólio por parte das células variante I (Akhrust, 1980).

Os estudos com os simbiosomas *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* vêm aumentando e gerando informações para a melhor compreensão da complexa interação (bactéria-nematóide-inseto). No entanto, apenas os genomas de *Photorhabdus luminescens* linhagem TT01 e de *Photorhabdus asymbiotica* já foram completamente seqüenciados (Duchaud *et al.*, 2003; Wilkinson *et al.*, 2009). A linhagem TT01 de *P. luminescens* contém 4389 genes de proteínas que codificam um grande número de toxinas, número superior do que os descritos para outras bactérias patogênicas. *P. asymbiotica* aparece como a única espécie desse gênero associada a casos de infecções oportunistas em

seres humanos, pela colonização e indução de apoptose de macrófagos, o que permite a especulação de que bactérias entomopatogênicas possam também ser patógenos de vertebrados (Gerrard *et al.*, 2004; Gerrard *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2009). Plichta *et al.* (2009) referem o isolamento do NEP *Heterorhabditis gerrardi*, associado a *P. asymbiotica*, em casos de infecção em seres humanos.

Dados de biossegurança para o uso de NEPs mostraram que injeções intradérmicas de bactérias entomopatogênicas não foram capazes de causar septicemia em camundongos (Boemare *et al.*, 1996; Akhurst & Smith, 2002).

Ureases

Ureases (uréia amidohidrolases; EC 3.5.1.5) são metalo-enzimas níquel dependentes que catalisam a reação de hidrólise da uréia à amônia e CO₂. A atividade catalítica das ureases está intimamente ligada à presença de dois átomos de Ni²⁺ no sitio ativo, que facilitam o ataque nucleofílico de uma molécula de água ao substrato, liberando a primeira molécula de amônia e carbamato, que se hidrolisa espontaneamente em CO₂ e outra molécula de amônia (Figura 2) (Dixon *et al.*, 1975).

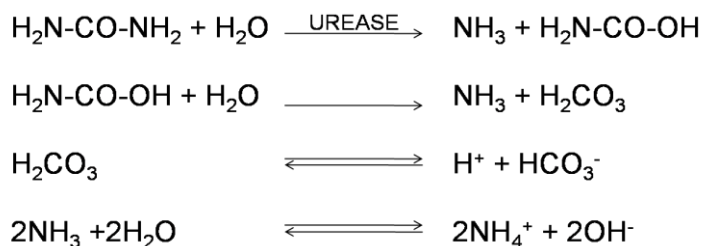


Figura 2. Hidrólise da uréia catalisada pela urease (Adaptado de Burne & Chen, 2000).

A enzima age sobre outros substratos, como a hidroxauréia e a dihidroxauréia, e sobre algumas uréias substituídas e ésteres de ácido carbâmico, como a tiouréia e o *p*-nitrofenilcarbamato (Fishbein, 1969; Bennett

& Wren, 1977). O ácido acetohidroxâmico um quelante de níquel, e o agente oxidante *p*-hidroximercuribenzoato atuam como inibidores enzimáticos.

As ureases estão presentes em bactérias, fungos e plantas. Possuem mecanismos catalíticos similares e apresentam alta identidade de sequência primária indicando que as proteínas são variantes da mesma enzima ancestral (Mobley *et al.*, 1995). Com relação à estrutura quaternária, as ureases vegetais e fúngicas comportam-se como trímeros ou hexâmeros de uma única subunidade, enquanto as ureases bacterianas apresentam-se como multímeros formados por duas ou três subunidades (Mobley & Hausinger, 1989; Mobley & Hausinger, 1995).

Ureases de bactérias e fungos

Ureases microbianas são importantes na transformação de certos compostos nitrogenados no meio ambiente, no metabolismo de ruminantes e na patogênese de doenças de seres humanos (Mobley & Hausinger, 1989).

As ureases bacterianas estão envolvidas em diversas condições clínicas: na ulceração e na formação de cálculos urinários causada pela infecção por *Proteus mirabilis*, na encefalopatia e no coma hepático por acúmulo de amônia, na gastrite e no câncer gástrico por *Helicobacter pylori* (Carlini & Polacco, 2008).

A urease também é sintetizada por fungos de importância médica, como *Coccidioides*, *Candida*, *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e o complexo *Cryptococcus*, além de *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e *Coccidioides immitis* (Yu *et al.*, 1997; Cox *et al.*, 2000; Mirbod *et al.*, 2002). *Cryptococcus gattii* tem sido alvo de pesquisa uma vez que isolados clínicos patogênicos produzem grandes quantidades de urease (Feder, 2008).

Ureases de plantas

Abundante nos tecidos vegetais, principalmente nas sementes de leguminosas e curcubitáceas, pouco se conhece sobre a principal função da urease em plantas. Seu papel fisiológico concentra-se na reciclagem de nitrogênio, apesar de a uréia não ser um metabólito majoritário nos tecidos

onde a enzima está presente (Polacco & Holland, 1993; Sirko & Brodzik, 2000). Em combinação com a arginase, a urease pode ter função na utilização das reservas protéicas da semente durante a fase de germinação (Follmer, 2008).

Polacco e Holland (1993) propõem o envolvimento de ureases de soja (*Glycine max*) em mecanismos de defesa. A existência de duas isoformas de urease (ubíqua e embrião-específica), com expressão e características de mutantes fenotípicas diferenciadas, aponta o envolvimento da urease embrião-específica na defesa química do vegetal, como metabólito secundário, em função da amônia liberada juntamente com fatores antinutricionais. No feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), a urease tem importância histórica por ter sido a primeira enzima a ser cristalizada o que comprovou sua natureza protéica (Sumner, 1926). Esta proteína, denominada jackbean urease ou JBU, constitui-se de uma cadeia polipeptídica com 840 aminoácidos com massa molecular de 90,77 kDa. A forma mínima, enzimaticamente ativa, é a de um trímero de 270 kDa, enquanto sua forma nativa é um hexâmero de 540 kDa (Zerner, 1991). Possui dois átomos de níquel no sítio ativo, cada um coordenado por dois resíduos de histidina (Follmer *et al.*, 2001).

A canatoxina, uma proteína neurotóxica, também isolada das sementes de *C. ensiformis*, foi caracterizada como uma isoforma dimérica de urease com massa molecular de 184 kDa (Carlini & Guimarães, 1981; Follmer *et al.*, 2001). A proteína possui entre 30-40% da atividade enzimática da JBU sobre a uréia, provavelmente associado a sua forma dimérica ou pela presença de átomos de níquel e zinco em cada monômero (Follmer *et al.*, 2002).

Propriedades biológicas das ureases

As ureases vegetais e as microbianas compõem um grupo de proteínas multifuncionais, que além da atividade ureolítica possuem propriedades independentes da ação enzimática (Follmer *et al.*, 2004).

Os primeiros estudos sobre o mecanismo de ação da canatoxina mostraram potente efeito secretagogo sobre vários tipos de células de mamíferos, ativando a produção de eicosanóides e induzindo alterações dos níveis e fluxos intracelulares de Ca^{2+} (Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991a e 1991b; Ghazaleh *et al.*, 1997). A proteína também induz bradicardia,

hipertensão e hipotermia, que precedem o fenômeno convulsivo tônico-clônico, característico da ação tóxica em camundongos (Carlini *et al.*, 1984). Exceto pela toxicidade intraperitoneal em cobaias, a JBU parece compartilhar todas as outras propriedades farmacológicas conhecidas para a canatoxina.

A exemplo de outras toxinas proteicas (Eidels *et al.*, 1983), a JBU e a canatoxina comportam-se como lectinas monovalentes ligando glicoderivados complexos, como gangliosídeos e fetuína (Carlini & Guimarães, 1991; Follmer *et al.*, 2001).

As atividades biológicas acima relacionadas são independentes da atividade ureolítica como verificado pela persistência dos efeitos induzidos pela proteína tratada com *p*-HMB para inibição da atividade enzimática (Follmer *et al.*, 2001). Os dados indicam a existência nestas proteínas de pelo menos dois domínios protéicos distintos, responsáveis por atividades biológicas diferentes: um domínio com atividade hidrolítica sobre uréia, suscetível de inibição por agentes oxidantes e um segundo domínio, responsável pela toxicidade intraperitoneal da canatoxina e por outras propriedades farmacológicas compartilhadas pela JBU.

Buscando uma provável função protetora contra fitopatógenos e insetos fitófagos, o papel fisiológico da canatoxina na planta também foi investigado. Proteínas “canatoxina-like” e ureases foram detectadas em diversas leguminosas, através de ensaios de imunorreatividade com anticorpos policlonais anti-canatoxina, sugerindo um processo de conservação evolutiva dos determinantes antigênicos (Carlini *et al.*, 1988). Além disso, relatos de que os conteúdos da toxina e da urease aumentam progressivamente durante a maturação das sementes, reforçam a idéia de que as proteínas desempenham um importante papel de defesa da planta (Barcellos *et al.*, 1993). Outros estudos mais recentes demonstraram a atividade fungitóxica, sobre fungos filamentosos fitopatogênicos das urease de soja e do feijão-de-porco, bem como sobre outras leveduras (Oliveira *et al.*, 1999; Becker-Ritt *et al.*, 2007).

Atividade inseticida das ureases e da canatoxina

As propriedades inseticidas das ureases também foram descritas.

A canatoxina foi testada oralmente em espécies pertencentes a diferentes ordens e famílias de Insecta: *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae), *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) e *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Os resultados apontaram uma relação entre a ação tóxica da proteína e as enzimas digestivas dos insetos (Carlini *et al.*, 1997, Carlini & Grossi-de-Sá, 2002). O bruquídeo *C. maculatus*, e os hemípteros *R. prolixus*, *Triatoma infestans*, *N. viridula*, *D. peruvianus* e *Oncopeltus fasciatus*, insetos suscetíveis a canatoxina, possuem o trato digestório ácido e as enzimas proteolíticas do tipo catepsina (D, L e B), sugerindo que a especificidade da ação tóxica estaria diretamente relacionada com o sistema digestivo dos insetos (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000; Stanisçuaski *et al.*, 2005; Piovesan *et al.*, 2008, Defferrari *et al.*, 2011). Já os insetos resistentes, têm trato digestório alcalino e enzimas do tipo tripsina (Terra & Ferreira, 1994; Carlini *et al.*, 1997).

Assim, a ativação da toxina envolveria enzimas acídicas e o efeito tóxico seria decorrente da formação de peptídeos inseticidas. Essa hipótese foi comprovada pela hidrólise *in vitro* da canatoxina com enzimas obtidas de *C. maculatus*: os peptídeos gerados mostraram efeito inseticida em *R. prolixus* e a administração conjunta dos inibidores não foi capaz de impedir a mortalidade dos insetos (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000).

Um dos fragmentos entomotóxicos, gerado pela hidrólise ácida e recuperado por gel-filtração, foi caracterizado e denominado “pepcanatox”. Com aproximadamente 10 kDa, este mostrou-se tóxico por via oral para ninfas e por injeção intratorácica para adultos de *R. prolixus*. O peptídeo recombinante, “jaburetox 2-Ec”, equivalente ao pepcanatox, foi obtido por expressão heteróloga em *Escherichia coli*, mostrou bom potencial para uso como bioinseticida (Mulinari, 2004; Mulinari *et al.*, 2007). A administração de jaburetox 2-Ec mostrou ser tóxica para os hemípteros *D. peruvianus*, *R. prolixus*, *T. infestans* e para os lepidópteros *Anticarsia gemmatalis* e *S. frugiperda* (Stanisçuaski *et al.*, 2005; Tomazetto *et al.*, 2007; BertoldoVargas,

2008). Estudos de modelagem molecular sugerem que o jaburetox 2-Ec possa ter propriedades neurotóxicas (Mulinari *et al.*, 2007).

Follmer e colaboradores (2004) realizaram um estudo comparativo das propriedades inseticidas de ureases vegetais (*C. ensiformis* e *G. max*) e microbiana (*Bacillus pasteurii*) em *D. peruvianus*. A JBU mostrou-se tão tóxica quanto à canatoxina, enquanto ambas, na concentração de 0,052 % p/p, apresentaram-se três vezes mais potentes que a urease de soja. Estes autores consideram que o fato da urease de *B. pasteurii* não apresentar atividade inseticida, provavelmente, está relacionado à ausência nessa molécula de parte da seqüência correspondente ao peptídeo entomotóxico.

Dados mais recentes mostram a interferência da JBU em processos com controle neurohormonal, competindo com neurotransmissores ou alterando a transdução do sinal, particularmente interferindo na sinalização serotoninérgica. A JBU tem efeito anti-diurético, inibindo secreção de água dependente de serotonina em túbulos de Malpighi e no intestino de *R. prolixus*, agindo em concentrações de 10^{-9} a 10^{-12} M (Stanisçuaski *et al.*, 2009; Stanisçuaski *et al.*, 2010).

Os dados sugerem que o efeito inseticida das ureases talvez não seja exclusivamente dependente da liberação de peptídeos entomotóxicos e que os efeitos da JBU observados *in vitro* também possam contribuir para a toxicidade observada nos modelos testados.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar a patogenicidade de isolados de nematóides entomopatogênicos (NEPETs) e de bactérias associadas em *Spodoptera frugiperda*.

Objetivos específicos

- Identificar, em nível de família, os isolados de nematóides entomopatogênicos (NEPETs).
- Avaliar a virulência dos NEPETs em larvas de *S. frugiperda*, em função da dose, fase biológica (lagartas de último instar e pré-pupas) e do ambiente (*in vitro* e solo).
- Avaliar a capacidade de multiplicação dos NEPETs em larvas de último instar de *S. frugiperda*.
- Isolar, identificar e caracterizar as bactérias associadas aos NEPETs.
- Caracterizar a virulência das bactérias associadas em larvas de último instar de *S. frugiperda*.
- Analisar a produção de urease pelas bactérias entomopatogênicas ao longo do crescimento *in vitro*.
- Caracterizar a atividade ureolítica das enzimas bacterianas.
- Avaliar a contribuição da urease bacteriana para a atividade entomopatogênica.

MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

Esta tese está dividida em dois capítulos.

O **Capítulo I** apresenta os dados não publicados sobre a virulência de nematóides entomopatogênicos (NEPETs) para o controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Contém introdução, metodologia, resultados e discussão.

O **Capítulo II** é composto pelo artigo submetido ao periódico *Biological Control*, intitulado “Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect”. Contém introdução, metodologia, resultados e discussão.

Na sequência, segue a discussão e conclusões gerais do trabalho, assim como as referências bibliográficas e os apêndices.

CAPÍTULO I

VIRULÊNCIA DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS A LARVAS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

1. Introdução

A larva de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto cosmopolita e polífono, que se alimenta de um grande número de plantas de importância agrícola, principalmente gramíneas (Metcalf *et al.*, 1962; Labrador, 1967), sendo conhecida como lagarta-do-cartucho do milho ou lagarta-militar. Nas Américas, considerada uma das principais pragas do milho (*Zea mays*), tem grande importância tanto pelos danos causados na cultura quanto pela dificuldade de controle (Wiseman, 1999; Waquil *et al.*, 2002;). Em milho, os danos decorrem do ataque às folhas novas, que são raspadas pelas lagartas nos estágios iniciais. A partir do 3º estágio a lagarta penetra no cartucho destruindo diversos pontos da folha durante o processo de alimentação (Hynes, 1942; Leiderman & Sauer, 1953). A lagarta também apresenta o hábito de atacar espigas e o colmo das plantas junto ao solo (Salvadori *et al.*, 2007).

As perdas na produção de grãos na cultura de milho variam de 17,0 a 38,7% dependendo do ambiente, do estágio de desenvolvimento e do estado nutricional das plantas atacadas e com as práticas agrônômicas adotadas (Cruz & Turpin, 1983; Williams & Davis, 1990; Cortez & Waquil, 1997; Cruz *et al.* 1999). No Brasil, os prejuízos podem atingir 500 milhões de dólares anuais, acrescidos por perdas indiretas com os gastos nas aplicações de inseticidas químicos (Cruz *et al.*, 1998; Waquil *et al.*, 2002). O uso destes produtos é a forma mais comum de controle da lagarta-do-cartucho, no entanto traz consigo riscos ambientais e de desenvolvimento de populações resistentes. Estes impactos reais e potenciais estimulam a adoção de métodos alternativos de manejo, como por exemplo o controle biológico com organismos entomopatogênicos (Salles, 1995). Nematóides, bactérias, fungos e vírus se enquadram nesta alternativa de controle microbiano (Grewal *et al.*, 2001).

Os nematóides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* têm sido utilizados para controlar populações de lepidópteros em diversos agroecossistemas (Rosa & Simões, 2004; Siegel *et al.*, 2004; Bruck *et al.*, 2008; Chambers *et al.*, 2010). A morte dos insetos parasitados decorre da associação mutualística que os NEPs *Steinernema* e

Heterorhabditis estabelecem com bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*.

Vários fatores tornam os NEPs fortes candidatos para incorporação em programas de manejo integrado de pragas: a) capacidade de dispersão no solo e de busca pelo inseto hospedeiro, b) capacidade de matar insetos-alvo em baixas doses e curto espaço de tempo, c) capacidade de reciclagem e conservação no ambiente por meio do próprio inseto hospedeiro e d) facilidade de multiplicação em laboratório (Peters, 1996; Bathon, 1996; Ehlers & Hokannen, 1996; West & Vrain, 1997; Medeiros *et al.*, 2000). Em formulações comerciais, os NEPs resistem a forças de cisalhamento e podem ser aplicados a campo com equipamentos convencionais de pulverização (Garcia *et al.*, 2008). Por serem sensíveis a baixa umidade, alta temperatura e radiação ultravioleta, os NEPs se prestam especialmente para uso no controle de pragas subterrâneas ou com uma ou mais fases do ciclo de vida associadas ao solo. Desta forma, NEPs apresentam potencial para controle de *S. frugiperda* pois o inseto se refugia em ambientes protegidos além de usar o solo em parte do seu ciclo biológico (Kaya & Gaugler 1993, Grewal *et al.*, 2001).

Os bioensaios tiveram como objetivo estudar isolados de NEPs de ocorrência regional caracterizando a patogenicidade para a *S. frugiperda* em fases em que está associada ao solo. Para tanto foi avaliada a virulência de oito isolados, em diferentes doses. A capacidade de multiplicação nos NEPs em larvas de último ínstar também foi medida.

2. Materiais e métodos

2.1. Origem e manutenção dos insetos e dos nematóides entomopatogênicos

Os insetos das espécies *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae), procederam da criação existente no Laboratório de Entomologia da Embrapa Trigo, em Passo Fundo, RS.

A colônia de *S. frugiperda* foi mantida em dieta artificial (Burton & Perkins, 1972) sob condições adequadas de temperatura (25 ± 2 °C), umidade relativa do ar (60 ± 10 %) e fotoperíodo (14 horas). A metodologia de criação

adotada foi a descrita por Parra (1998). Para o cultivo, lagartas recém-eclodidas foram inoculadas em tubos de vidro contendo dieta e fechadas com algodão hidrofóbico, onde foram mantidas até atingirem a fase de pupa. As pupas foram transferidas e mantidas em placas contendo vermiculita, já dentro de gaiolas, até a emergência dos adultos. Para a obtenção das posturas, os casais foram formados e individualizados em gaiolas revestidas com papel filtro (Whatmann n° 1), com acesso à solução aquosa de mel (10 %). Nestas condições, o ciclo de vida (ovo a adulto) foi de aproximadamente 45 dias.

A colônia de *Tenebrio molitor* foi mantida conforme a metodologia de Fraenkel *et al.* (1950) com modificações. Larvas e adultos foram mantidos em caixas plásticas de PVC com tampa telada, contendo farelo de trigo, sob temperatura de 28 ± 2 °C e na ausência de luz. O ciclo de vida dos tenebrionídeos foi de aproximadamente cinco meses.

Larvas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Apicultura, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.

Os NEPs avaliados foram obtidos da coleção de NEPETs (Nematóides Entomopatogênicos da Embrapa Trigo) do Laboratório de Patologia de Insetos da Embrapa Trigo, isolados pelo Dr. Marcio Voss, pesquisador da Embrapa Trigo, em amostras de solo procedentes dos estados do Rio Grande do Sul (NEPETs 5, 6, 7, 15 e 33), Santa Catarina (NEPETs 30 e 32) e Paraná (NEPET 12).

2.2. Multiplicação, contagem e armazenamento dos NEPs

Os NEPETs foram multiplicados segundo método de Poinar (1979). Larvas de *T. molitor* e *G. mellonella* foram utilizadas alternadamente para cultivo e multiplicação dos NEPs.

Para tanto, foi aplicada uma suspensão de aproximadamente 20 JIs (em 500 µL de água destilada) do respectivo NEP, sobre a larva do inseto hospedeiro (*T. molitor* ou *G. mellonella*) e no papel filtro colocado como base no fundo de uma placa de Petri de 90 mm. Estas placas foram incubadas na temperatura de 23 °C por um período de quatro dias.

Depois de mortas, as larvas foram transferidas para armadilhas de White (White, 1927) para a emergência dos novos JIs. A coleta dos JIs foi realizada imediatamente após o início da liberação destas formas jovens nas armadilhas. Depois de recolhida, a suspensão foi diluída cinco vezes e submetida a três ciclos de decantação e descarte do sobrenadante, para remover bactérias e resíduos do inseto hospedeiro da suspensão. O número de JIs contido em cada uma das suspensões de NEPETs foi determinado em microscópio estereoscópico.

Os NEPETs foram conservados em solução de formaldeído 0,01 %, na temperatura de 16 °C por um período de dois a três meses, em garrafas de cultura de tecido.

2.3. Virulência dos NEPETs para *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Os bioensaios foram conduzidos com larvas de último instar e na fase de pré-pupa, sob condições controladas de temperatura (28 ± 2 °C), umidade relativa do ar (60 ± 10 %) e fotofase (12 horas). Para fins de caracterização de instar, considerou-se como pré-pupa, larva sem locomoção e sem atividade alimentar. Oito isolados de nematóides (NEPETs 05, 06, 07, 12, 15, 30, 32, e 33) foram avaliados quanto à virulência para *S. frugiperda*. Estes isolados foram previamente selecionados, a partir da coleção de NEPs da EMBRAPA TRIGO, como os mais promissores na avaliação da patogenicidade para *S. frugiperda*.

Para larvas de último instar a triagem foi realizada em unidades de experimentação com 12 células de oito cm³, durante um período de cinco dias. No fundo de cada célula foi colocado um disco de papel filtro (Whatmann n° 1) sobre o qual foi acomodada uma larva. Após um período de 24 horas sem alimento, pequenos pedaços de folhas de milho (retiradas de plantas com 15 dias de idade) foram depositados nas células, seguidos pela adição da suspensão de nematóides (300 µL) no centro de cada célula. Os isolados de nematóides foram inoculados nas seguintes concentrações: 10, 50, 100, 500 e 1000 JIs por larva de *S. frugiperda*. O tempo transcorrido entre a obtenção dos JIs e a aplicação nos bioensaios foi de sete dias. O número de JIs foi determinado em microscópio estereoscópico e a suspensão de NEPs

homogeneizada a cada inoculação. No grupo controle foram inoculados 300 µL de água destilada. A mortalidade dos insetos foi medida em intervalos de 24 horas após a inoculação dos nematóides. A característica típica de infecção por NEPs (cor da cutícula dos insetos parasitados) foi considerada na determinação da causa da morte. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 48 insetos para cada um dos isolados e para cada uma das doses testadas. O experimento foi realizado em quaduplicata.

A triagem dos isolados dos nematóides com relação ao efeito sobre pré-pupas foi realizada *in vitro* e no solo. No primeiro caso, utilizou-se a mesma metodologia descrita no ensaio anterior, porém sem a adição de folhas de milho, durante um período de quatro dias. Os NEPETs foram avaliados nas concentrações de 100 e 500 JIs. A mortalidade dos insetos foi medida em intervalos de 48 horas após a inoculação dos nematóides. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 36 insetos para cada um dos isolados em cada dose testada.

No bioensaio feito no solo, utilizaram-se potes plásticos com tampa, com capacidade para 100 g (185 cm³) do substrato. O solo, proveniente da Embrapa Trigo, foi previamente esterilizado em autoclave. Primeiramente, colocou-se em cada pote 50 g de solo e, sobre este, 10 pré-pupas, as quais foram cobertas com as outras 50 g de solo. Em seguida, procedeu-se a aplicação dos NEPs nas doses 0, 100 e 500 JIs por pré-pupa, utilizando-se 1000 µL de suspensão/inseto. A mortalidade dos insetos foi medida após 72 horas. No grupo controle foram inoculados 1000 µL de água destilada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 insetos para cada um dos isolados em cada dose testada. O experimento foi realizado em quintuplicata.

2.4. Multiplicação dos NEPETs em larvas de *S. frugiperda*

Para estimar a capacidade de multiplicação dos nematóides, utilizou-se as larvas mortas no teste de virulência com as doses de 50 e 100 JIs. Para tanto, os insetos mortos foram transferidos para armadilhas de White e, após um período entre sete e 15 dias, os JIs que migraram para a água foram

coletados e quantificados. Sete alíquotas de 20 ou 40 μL (dependendo da concentração da suspensão) foram colocadas sobre uma tampa de placa de Petri e o número de JIs em cada alíquota foi estimado, descartando-se a maior e menor medida.

No cálculo da média, consideraram-se as cinco alíquotas restantes e o volume utilizado na recuperação dos nematóides (10 mL). Para cada dose testada, oito insetos foram avaliados quanto ao número de JIs produzidos, totalizando 16 armadilhas para cada isolado.

2.5. Análise estatística dos dados

O potencial tóxico de cada NEPET para larvas de último instar foi estimado por análise de regressão. Primeiramente, calculou-se o coeficiente β (ângulo de inclinação) da regressão linear entre mortalidade (%) e doses, para cada tempo (Anexo I). Em seguida, estes coeficientes, considerados então como variável de resposta, foram empregados para avaliação de dose-resposta, através da análise de regressão não linear entre os dados de mortalidade e doses. Neste caso, foi utilizado modelo logístico de quatro parâmetros para a construção das curvas dose-resposta (Ritz & Streibig, 2005). As estimativas de dose letal foram comparadas pelo teste t.

Nos demais ensaios, realizou-se a análise da variância, para avaliar o efeitos dos fatores NEP (8 NEPETs) e dose (0, 100 e 500 JIs) isoladamente, bem como a existência de interação entre ambos. Quando se constatou efeito significativo pelo F teste, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

3. Resultados

3.1. Identificação dos nematóides entomopatogênicos

A partir da cor desenvolvida nos cadáveres de *G. mellonella*, baseando-se em Kaya (1990) constatou-se que nematóides pertencem às famílias Heterorhabditidae (marrom escura avermelhada) e Steinernematidae (marrom ocre). Desta forma, os NEPETs 5, 6, 7 e 33 foram classificados como

pertencentes à família Steinernematidae e os NEPETs 12, 15, 30 e 32 à família Heterorhabditidae.

3.2. Virulência de isolados de NEPs para larvas de *S. frugiperda*, *in vitro*

No bioensaio de patogenicidade *in vitro* para larvas de último instar de *S. frugiperda*, constatou-se interação entre NEPETs e doses (Tabela I). Os dados apontaram que o isolado NEPET 6 causou menor mortalidade em todas as doses testadas, variando de 18,7 a 35,9 %. Os isolados NEPET 12 e 15 destacaram-se pela alta mortalidade causada em todas as doses, atingindo 55,7 e 55,2 % já na dose mínima (10 JIs). Nível semelhante de mortalidade (51,0 a 59,9 %) foi atingido na dose de 100 JIs, pelos isolados 33, 5, 32 e 30. Na dose máxima (1000 JIs), os NEPETs 12, 30 e 15 reduziram o número de lagartas vivas em 93,7, 90,1 e 87,5 %, respectivamente. Considerando as doses em cada NEP, observou-se que para os NEPETs 7 e 33 não houve diferença significativa na mortalidade produzida, pela ordem, por doses superiores a 50 e 100 JIs. Na dose de 1000 JIs, o NEPET 5 foi o único que continuou respondendo à dose com aumento da mortalidade. Os NEPETs 15 e 30 não diferem a partir da dose de 500 JIs, enquanto o NEPET 12 atingiu a mortalidade máxima com 100 JIs, a qual não diferiu significativamente das doses de 500 e 1000 JIs.

Tabela I. Mortalidade acumulada (porcentagem média \pm EP) de larvas de último instar de *S. frugiperda* 120 horas após aplicação *in vitro* de doses de isolados de NEPs.

Isolado de NEPs (NEPET)	Dose (JIs/larva)				
	10	50	100	500	1000
5	39,6 \pm 2,7 bcC	46,9 \pm 2,5 bcBC	53,6 \pm 5,1 cdB	58,3 \pm 2,2 dB	81,2 \pm 2,7 abA
6	18,7 \pm 2,2 Dc	23,9 \pm 2,7 dBC	27,6 \pm 1,6 eAB	33,3 \pm 3,3 eAB	35,9 \pm 3,2 dA
7	45,8 \pm 4,1 abB	66,7 \pm 3,4 aA	69,8 \pm 2,5 abA	69,8 \pm 4,9 bcdA	81,2 \pm 3,8 abA
12	55,7 \pm 2,3 aD	65,6 \pm 5,7 aCD	77,1 \pm 1,9 aABC	89,0 \pm 2,6 aAB	93,7 \pm 2,2 aA
15	55,2 \pm 2,2 aB	66,1 \pm 3,4 aB	68,7 \pm 3,5 abcB	86,4 \pm 2,5 abA	87,5 \pm 1,9 abA
30	39,0 \pm 2,9 bcC	54,2 \pm 2,9 abB	59,9 \pm 3,9 bcdB	80,7 \pm 2,1 abcA	90,1 \pm 2,9 abA
32	29,1 \pm 1,9 cC	37,5 \pm 4,7 cC	55,2 \pm 2,7 bcdB	66,7 \pm 1,5 cdAB	73,9 \pm 2,2 bcA
33	17,7 \pm 1,8 dB	24,0 \pm 3,0 dB	51,0 \pm 4,0 dA	59,4 \pm 7,5 dA	59,9 \pm 1,8 cA

Médias de 4 repetições com 48 lagartas/repetição. Valores seguidos da mesma letra minúscula (coluna) e maiúscula (linha) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A interação estatisticamente significativa entre NEPs e doses foi confirmada pelas curvas dose-resposta para cada NEPET (Figura 1). As curvas de dose-resposta foram estabelecidas e expressas pela relação entre a mortalidade proporcional (número de mortos em função do tempo) (Apêndice I) e dose. Com exceção dos NEPETs 7 e 33, a resposta dos NEPs situou-se na faixa de linearidade, com a mortalidade aumentando com a dose. Os parâmetros de dose letal (DL) 90 e 99 % foram estimados para cada NEPET (dados não mostrados). Considerando a DL_{90} , houve diferença entre os NEPETs 6 e 30, bem como entre o NEPET 15 e os NEPETs 30 e 32. Com base na DL_{99} , os NEPETs 12 e 15 não foram diferentes entre si, no entanto diferiram significativamente dos NEPETs 30 e 32. Os NEPETs 5, 6, 7 e 33 não foram diferentes entre si, em nenhum dos parâmetros de dose letal estimados (DL_{90} e DL_{99}).

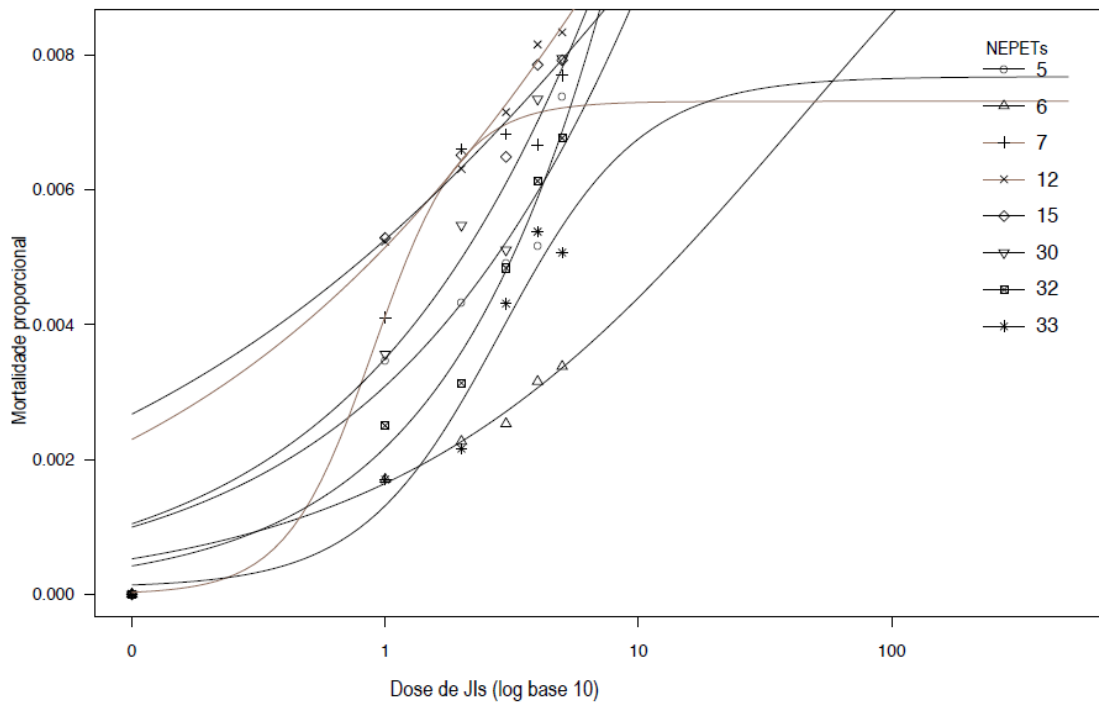


Figura 1. Curvas de dose-reposta dos isolados de nematóides entomopatogênicos (NEPETs) para larvas de último instar de *S. frugiperda*.

3.3. Virulência de isolados de NEPs para pré-pupas de *S. frugiperda*

Na avaliação *in vitro* do efeito dos nematóides em pré-pupas, também se verificou interação entre isolados e doses (Tabela II). Houve diferença significativa entre as doses de 100 e 500 JIs, com aumento de mortalidade em 44,4, 13,9 e 13,8 %, para os NEPETs 7, 32 e 33, respectivamente. Destacaram-se, porém, os isolados NEPETs 12, 15 e 30 pela mortalidade causada em ambas doses, as quais não diferiram significativamente entre si.

Tabela II. Mortalidade acumulada (porcentagem média \pm EP) de pré-pupas de *S. frugiperda* 96 horas após a aplicação *in vitro* de doses de isolados de NEPs.

Isolado de NEPs (NEPET)	Dose (JIs/pré-pupa)	
	100	500
5	47,2 \pm 2,8 cdA	55,6 \pm 5,6 bcA
6	38,9 \pm 2,8 deA	47,2 \pm 7,3 cA
7	25,0 \pm 4,8 eB	69,4 \pm 2,8 abA
12	80,6 \pm 2,8 aA	91,7 \pm 4,8 aA
15	75,0 \pm 4,8 abA	77,8 \pm 2,8 aA
30	80,6 \pm 7,3 aA	83,3 \pm 4,8 aA
32	58,3 \pm 4,8 abcB	72,2 \pm 2,8 abA
33	55,6 \pm 2,8 bcdB	69,4 \pm 2,8 abA

Médias de 3 repetições com 12 pré-pupas por repetição. Valores seguidos da mesma letra minúscula (coluna) e maiúscula (linha) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na avaliação em pré-pupas do efeito patogênico dos NEPs, aplicados no solo, não se constatou significância para a interação entre isolados e doses. Não houve diferença significativa na mortalidade gerada pela aplicação de 100 e de 500 JIs, em nenhum dos isolados (Figura 2). Os NEPETs 12, 15 e 32 proporcionaram, pela ordem, mortalidade máxima de 90,0, 91,0 e 89,0 %, enquanto o isolado NEPET 30 foi o menos eficiente, reduzindo 71,0 % do grupo de pré-pupas.

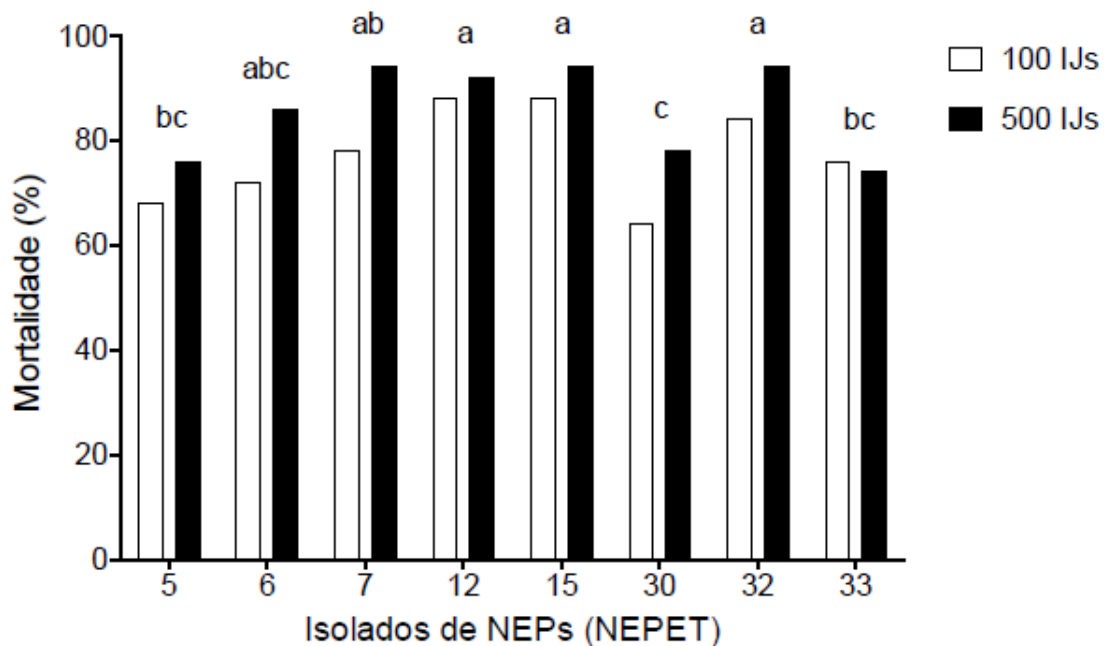


Figura 2. Mortalidade acumulada de pré-pupas de *S. frugiperda* 72 horas após a aplicação de doses de isolados de NEPs, no solo (médias de 10 repetições com 10 pré-pupas/repetição; valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$).

3.4. Multiplicação dos nematóides em larvas de *S. frugiperda*

Constatou-se que a capacidade de reprodução dos NEPs, medida por meio do número de JIs produzidos em larvas de *S. frugiperda*, independe da quantidade de nematóides inicialmente aplicada (Figura 3). As maiores produções de JIs por lagarta foram obtidas com os NEPETs 12 ($6225 \pm 262,8$), 15 ($5769 \pm 250,1$) e 30 ($6006 \pm 182,7$), enquanto os NEPETs 6 ($2134 \pm 80,9$) e 33 ($2066 \pm 111,1$) produziram as menores quantidades de JIs.

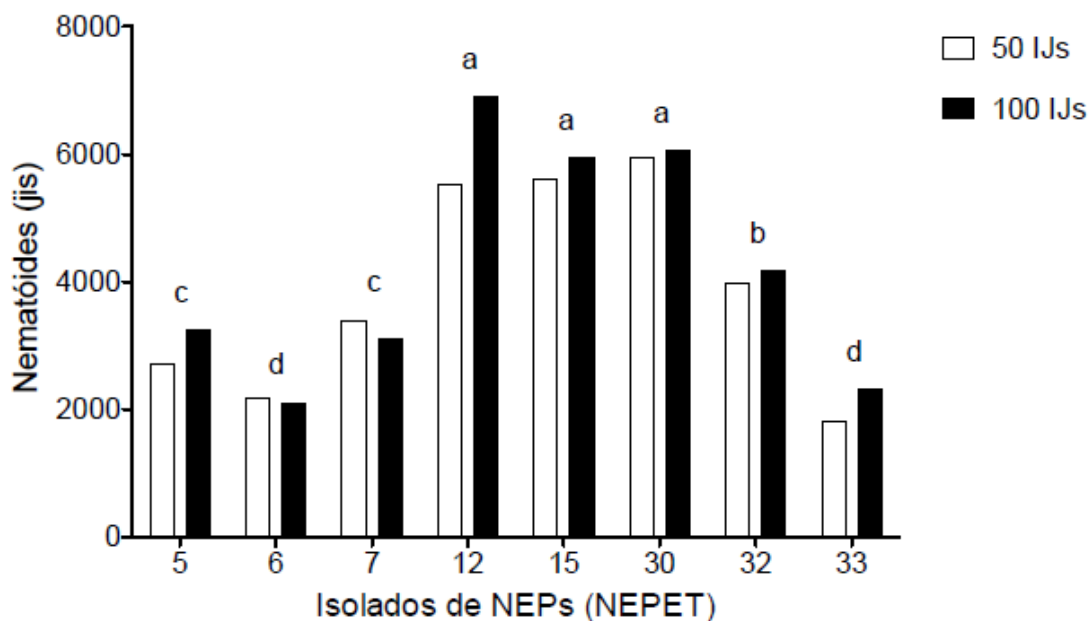


Figura 3. Número de JIs produzidos em larvas de último instar de *S. frugiperda* inoculadas com isolados de NEPs (médias de 16 repetições; valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$).

4. Discussão

Como alternativa de controle biológico para pragas agrícolas, o potencial de uso dos NEPs já foi extensamente descrito, pois reduzem a densidade de insetos e, conseqüentemente, os danos (Denno *et al.*, 2008). Tal uso depende de especificidades do isolado e do inseto hospedeiro (espécie, fase biológica, habitat etc.) e de fatores ambientais, principalmente de características do solo, atributos que ajudam a definir vantagens e limitações de novos isolados.

No presente estudo foi caracterizada a patogenicidade de isolados de NEPs, denominados NEPETs, para a lagarta-do-cartucho do milho (*S. frugiperda*) em situações em que está associada ao solo.

A classificação dos isolados dentro das famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae confirma o que vem sendo registrado quanto à identificação de NEPs, justificando o estudo da patogenicidade de novos isolados, como é o caso dos NEPETs (Emelianoff *et al.*, 2008).

Embora a mortalidade proporcionada pelos NEPETs 5, 12, 15, 32 e 33 tenha atingido níveis semelhantes para larvas de último instar e pré-pupas, nos testes *in vitro*, diferenças entre estas fases foram observadas para os isolados

de NEPETs 6, 7 e 30 (Tabelas I e II). Além disso, também foram evidenciadas diferenças para resposta a dose entre isolados da mesma família. Com aumento da dose de 100 para 500 JIs, observou-se incremento na mortalidade acumulada para larvas com os NEPETs 12, 15, 30 e 32 e para pré-pupas com os NEPETs 7, 32 e 33. Estes resultados são respaldados por diversos estudos que avaliaram NEPs para controle biológico de lepidópteros e, em especial para *S. frugiperda* (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 1996; Polanczyk & Alves, 2005). Diferenças entre fases biológicas foram evidenciadas em espécies de *Cydia* (Lepidoptera: Pyralidae) frente ao nematóide *Steinernema carpocapsae*. Para *Cydia pomonella* (traça-da-maçã), as pupas foram menos suscetíveis que larvas (Lacey *et al.*, 2005), enquanto para *C. latiferreana* larvas e pupas foram igualmente suscetíveis quando infectadas com o mesmo NEP (Chambers *et al.*, 2010). Gonzalez-Ramirez *et al.* (2000) demonstraram que em *Mocis latipes* (Lepidoptera: Noctuidae) a pré-pupa (mortalidade de 97,5 a 100,0%) foi mais suscetível que a pupa (mortalidade de 27,5 a 41,3%), frente à *Heterorhabditis bacteriophora*. Estudos têm demonstrado que a suscetibilidade de certas espécies de lepidópteros à nematóides entomopatogênicos está diretamente relacionada à idade do inseto, bem como à espécie e à concentração dos nematóides testados (Fuxa *et al.*, 1988; Molina *et al.*, 1996).

Em comparação com os resultados *in vitro*, no experimento com pré-pupas no solo houve redução no desempenho do NEPET 30 e melhora dos NEPETs 5, 6, 7, 12, 15, 32 e 33 com destaque para os três últimos, que proporcionaram valores próximos a 90,0% de mortalidade. Bruck & Walton (2007) demonstraram que no solo *Heterorhabditis marelatus* e *S. carpocapsae*, causaram mortalidade de 100,0% em *Cydia latiferreana*, na dose de 500 JIs/larva. Por outro lado, *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* foram altamente infectivos para *Synanthedon bibionipennis* (Lepidoptera: Sesiidae) em condições de laboratório (96,0 e 94,0%, respectivamente), proporcionando a campo 51,0 e 33,0% de mortalidade (Bruck *et al.*, 2008).

Fatores ambientais como umidade e temperatura, podem interferir diretamente na eficiência de NEPs. Outro fator importante é a capacidade de busca dos NEPs pelo inseto hospedeiro. Espécies emboscadoras estão adaptadas para infectar insetos que se movimentam sob a superfície do solo, pois esperam pela passagem do inseto apoiando-se sobre a cauda (Kondo &

Ishibashi, 1986). Já as espécies cruzadoras movem-se ativamente no solo à procura do hospedeiro, localizando-os pelos produtos de excreção, níveis de CO₂ e gradientes de temperatura.

As diferenças de resposta dos NEPETs constatadas em função da fase biológica (larvas de último instar e pré-pupas) e do ambiente (*in vitro* e solo) podem estar relacionadas a este comportamento de busca dos JIs que, por sua vez, dependem da mobilidade do inseto e dos fatores do microambiente, para o sucesso da penetração no hospedeiro (Lewis, 2002). O diferencial de suscetibilidade pode estar associado às aberturas naturais do hospedeiro (boca, ânus e espiráculos) pois estas também variam de acordo com a fase do inseto (Kaya, 1985).

Com relação à capacidade de reprodução e conservação de NEPs através do inseto hospedeiro, os dados obtidos neste trabalho demonstraram que as maiores produções de JIs em *S. frugiperda* foram dos NEPETs da família Heterorhabditidae, variando de 3975 e 6913 JIs/larva. A multiplicação dos NEPETs da família Steinernematidae (1813 a 3400 JIs/larva) foi inferior à de *S. carpocapsae* em *S. frugiperda* (Molina *et al.*, 2004).

As diferenças observadas entre os NEPETs em termos de mortalidade de larvas e de pré-pupas e de produção de JIs podem ser atribuídas ao hospedeiro em questão, *S. frugiperda*. A reprodução dos nematóides implica em superar o sistema imunológico do hospedeiro ou ainda escapar das reações de encapsulação e da melanização (Li *et al.*, 2007).

Os dados obtidos indicam a possibilidade de uso dos NEPETs no controle de *S. frugiperda*, uma vez que tanto lagartas de último instar quanto pré-pupas, foram suscetíveis nas doses e condições testadas. Apesar da variabilidade dos NEPETs quanto ao grau de patogenicidade, na dose de 100 JIs todos os isolados proporcionaram mortalidade de lagartas (27,6 a 69,8%) *in vitro* e de pré-pupas *in vitro* (25,0 a 80,6%) e no solo (64,0 a 84,0%). Ainda que altos níveis de mortalidade tenham sido obtidos em resposta à doses para larvas de último instar, o estudo revela que a aplicação de 100 JIs/larva teve efeito letal sobre o inseto nas fases associadas ao solo. No entanto, a mortalidade produzida pelos isolados de NEPETs precisa ser confirmada em ensaios à campo, simulando condições naturais e de aplicação dos JIs (Garcia *et al.*, 2008).

Considerando a virulência para larvas e pré-pupas de *S. frugiperda*, *in vitro* e no solo, e a capacidade de multiplicação, os isolados NEPETs 12 e 15 destacam-se como os principais candidatos para testes de eficácia em condições de campo, especialmente por se tratarem de organismos nativos já adaptados às condições locais e de ocorrência da praga.

CAPÍTULO II

CHARACTERIZATION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES AND SYMBIOTIC BACTERIA ACTIVE AGAINST *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) AND CONTRIBUTION OF BACTERIAL UREASE TO THE INSECTICIDAL EFFECT

Artigo submetido ao periódico *Biological Control*

Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect.

Juliana De Marco Salvadori^{a,b}, Marina Schumacher Defferrari^{a,#}, Rodrigo Ligabue-Braun^{a,#}, Elene Yamazaki Lau^c, José Roberto Salvadori^d, Celia Regina Carlini^{a,e,*}

^aGraduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

^bSecretaria de Saúde, Prefeitura Municipal de Passo Fundo, RS, Brazil;

^cEmpresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, Passo Fundo, RS, Brazil;

^dFaculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS, Brazil;

^eDept. Biophysics and Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil - <http://www.ufrgs.br/laprotox>

Juliana De Marco Salvadori (julianasalvadori@yahoo.com.br)

Marina Schumacher Defferrari (msdeff@gmail.com)

Rodrigo Ligabue-Braun (rodrigobraun@cbiot.ufrgs.br)

Elene Yamazaki Lau (yamazaki@cnpt.embrapa.br)

José Roberto Salvadori (salvadori@upf.br)

Celia Regina Carlini (ccarlini@ufrgs.br or celia.carlini@pq.cnpq.br)

these authors have contributed equally to this work

* Corresponding author:

Célia R. Carlini

Email: ccarlini@ufrgs.br or celia.carlini@pq.cnpq.br

Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Dept. Biophysics, Av. Bento Gonçalves 9500.

91501-970, Porto Alegre, RS, BR

tel: +55 51 3308 7606

fax: +55 51 3308 7003

Abstract

Entomopathogenic nematodes carrying symbiotic bacteria represent one of the best non-chemical strategies for insect control. Infective juveniles of *Heterorhabditidae* and *Steinernematidae* nematodes actively seek the host in the soil, penetrating through insect's openings to reach the hemocoel where symbiotic bacteria in the genera *Photorhabdus* or *Xenorhabdus*, respectively, are released. The bacteria replicate and produce virulence factors that rapidly kill the insect host, providing nutrients for the nematodes development and reproduction within the insect cadaver. More studies are necessary to better understand the factors implicated in the nematode-bacteria association, particularly focusing the bacterial symbionts, the final effectors of the insect death. Our group has shown that ureases are lethal to some groups of insects and may contribute to the entomopathogenic properties of the symbiotic bacteria.

The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) is one of the major insect pests in corn (*Zea mays* Linnaeus) crops in Brazil, with infestations resulting in reduction up to 39% yield and losses amounting US\$ 500 million annually. Native strains of entomopathogenic nematodes active against *S. frugiperda* represent a promising alternative to the intensive use of chemical insecticides to control fall armyworm population in corn plantations.

In this study we screened soil nematodes collected in the south region of Brazil for pathogenicity against *S. frugiperda*. Symbiotic bacteria associated with these nematodes were isolated and characterized. We also evaluated urease production by the symbiotic bacteria *in-vitro* and along the course of infection in *S. frugiperda* and demonstrated that urease production correlated positively to their entomopathogenicity.

Keywords: *Photorhabdus*, *Xenorhabdus*, insecticidal activity, virulence factor, urease, hemolymph

1. Introduction

Entomopathogenic nematodes carrying symbiotic bacteria represent one of the best non-chemical strategies supporting insect control (Boemare *et al.*, 1997; Forst *et al.*, 1997; Lang *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011). In the soil, the infective juveniles of these nematodes (*Heterorhabditis* or *Steinernema* genera) actively seek the host in the soil, penetrate through insect's natural openings, travel to the hemocoel and release symbiotic bacterial cells (mostly species of *Photorhabdus* or *Xenorhabdus*, respectively). The bacteria multiply and release a number of virulence factors, including complexes of toxins, hydrolytic enzymes, hemolysins, and antimicrobial compounds, that kill the insect host usually within 48 hours (Eleftherianos *et al.*, 2010; ffrench-Constant and Bowen, 2000; ffrench-Constant *et al.*, 2007), thus providing nutrients for the nematodes development and reproduction within the insect cadaver. More studies are still necessary to better understand the factors implicated in the nematode-bacteria association, particularly focusing the bacterial symbionts, which are final effectors of the insect death (Campos-Herrera *et al.*, 2009).

Our group described for the first time the insecticidal properties of plant ureases and urease-derived peptides (Carlini *et al.*, 1997; Follmer *et al.*, 2004; Mulinari *et al.*, 2007). The mode of entomotoxic action of these polypeptides is not yet completely elucidated (Carlini and Polacco, 2008), with distinct mechanisms and signaling pathways being triggered by the whole molecule or its derived peptide(s) (Staniscuaski *et al.*, 2009; Staniscuaski *et al.*, 2010). In the case of intact urease, several ureolysis-independent toxic effects are known and these can be cumulative or synergistic to the enzymatic release of highly toxic ammonia by the enzyme. Our initial studies have suggested that lepidopterans apparently are not susceptible to ureases (Carlini *et al.*, 1997) and that bacterial ureases are devoid of insecticidal activity (Follmer *et al.*, 2004). Contrasting with our observations, Martin *et al.* (2009) reported that urease-positive strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner were better-fitted as biological control agents against the gypsy moth *Lymantria dispar* Linnaeus than urease-negative isolates. Thus a re-evaluation of the entomotoxicity of bacterial ureases and the susceptibility of lepidopterans to ureases is needed.

The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) is one of the major insect pests in corn (*Zea mays* Linnaeus) crops in Brazil, with infestations resulting in reduction up to 39% yield and losses amounting US\$ 500 millions annually depending on climate conditions and stage of development of the attacked plants, among other factors (Cruz *et al.*, 1999; Cruz and Turpin, 1983; Mendes *et al.*, 2011). Native strains of entomopathogenic nematodes active against *S. frugiperda* represent a promising alternative to the intensive use of chemical insecticides to control fall armyworm populations in corn plantations.

In this study we screened soil nematodes collected in the south region of Brazil for pathogenicity against *S. frugiperda*. Symbiotic bacteria associated with these nematodes were isolated and characterized. We also evaluated urease production by the symbiotic bacteria and its potential contribution to entomopathogenicity.

2. Materials and Methods

2.1 Insects and nematodes

Spodoptera frugiperda larvae were provided by the Entomology Laboratory, EmbrapaTrigo, Passo Fundo, RS, Brazil. The insects were reared on artificial diets (Burton and Perkins, 1972) at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, a relative humidity of $60 \pm 10\%$ and a 14/10 hours light/dark cycle. The colony was managed as described by (Parra, 1998). Newly hatched larvae were transferred to glass vials containing the solidified diet and closed with cotton balls, and allowed to develop until pupation. The pupae were put in plates with vermiculite inside cages for the emergence of adults. One male and one female were then transferred to individual cages with the internal walls covered with filter paper (Whatmann n^o1) and with free access to a 10% v/v honey solution.

Entomopathogenic nematodes (EPN) were from a collection kept by the Insect Pathology Laboratory from EmbrapaTrigo, Passo Fundo, RS, Brazil. The EPNs were cultured in *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). For that a suspension of 20 infective juvenile nematodes in 500 μL of distilled water was applied to *T. molitor* larvae, kept in 90 mm Petri dishes with filter

paper-covered bottoms. The plates were maintained at $23 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ relative humidity during 4 days until death of the larvae. Dead insects were transferred to White traps in incubators at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ for emergence and capture of EPNs. Recovered infective juveniles were counted under a stereoscopic microscope and used for bioassays within 7 days.

2.2 Screening of nematode entomotoxicity

Eight EPN isolates (NEPETs 05, 06, 07, 12, 15, 30, 32 and 33) were evaluated for their pathogenicity towards *S. frugiperda* larvae. The bioassays were run in 12-well plates experimental units at $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ relative humidity, 14/10 hours light/dark cycle, with the bottom of cells covered with filter paper (Whatmann n°1). *S. frugiperda* 5th instar starved for 24 hours were placed inside the cells with small pieces of maize leaves and 100 infective juveniles (in 300 μL of distilled water) per insect larva were added to center of the cells. Control groups received 300 μL distilled water instead. Mortality of insects and typical signs of EPN infection were registered daily during 5 days. Experiments in quadruplicates were totally randomized with 48 insects for each EPN isolate. EPNs were identified taxonomically according to Adams and Nguyen (2002).

2.3 Bacteria isolation

Entomopathogenic bacteria (EB) were isolated from the insect's hemolymph according to the method of Poinar and Thomas, 1966. Each of the eight EPN isolates was incubated with *S. frugiperda* hemolymph in a BOD chamber at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ for 20 h and then the suspensions were plated in nutrient agar. After 24 hours, bacterial colonies were plated in NBTA agar and the process was repeated every 24 hours until isolated colonies were obtained. For the bioassays, the isolated bacterial colonies were inoculated in liquid LB medium and let multiply for 16 hours at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ and then the cell concentration was adjusted to 10^4 cells per 10 μL after counting on a Neubauer chamber.

2.4 Virulence assay of bacteria in *S. frugiperda*

EB suspensions were injected in 25 insects per isolate and LB medium diluted in saline was used as control. Before injection, the surface of the larvae was disinfected by immersing the insects in 1% NaOH for 10 seconds and then rinsed with distilled water. For injections, one of the insect's prolegs was cut and 10 μ L of the bacterial suspension containing 10^4 cells were inoculated into the abdominal cavity with a Hamilton syringe fitted with a 10 μ L needle. The insects were kept at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ and mortality was registered daily. Experiments in quadruplicates were totally randomized with 25 insects for each bacterial isolate and tested dose.

2.5 Extraction of bacterial DNA and sequencing of the 16S gene

For extraction of DNA, isolated bacteria colonies were collected from the agar plates into 500 μ L sterile 1.5 mL microtubes and 200 μ L of sterile MilliQ water was added. Cells were disrupted by heating at 100°C for 10 min and then centrifuged at 10,000 g for 2 min. Supernatants were deproteinized by addition of 200 μ L of chloroform:isoamyl alcohol (24:1 v/v) followed by centrifugation (10,000 g for 10 min). The aqueous phases containing nucleic acids were transferred to new 1.5 mL microtubes and stored at -20°C . Primers used to amplify the 16S rDNA region were: 5'- GAA GAG TTT GAT CAT GGC TC - 3' (sense) and 5'- AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA - 3' (antisense) (Kim *et al.*, 2009). Primers used for sequencing the amplified fragments were: 5' - GAA GAG TTT GAT CAT GGC TC - 3'; 5' - AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA - 3'; 5' - CTC CTA CGG GAG GCA GCA GTG GGG - 3' (16S362f); 5' - CGA AAG CGT GGG GAG CAA ACA GG - 3' (16S786f); 5' - TGC GCT CGT TGC GGG ACT TAA CC - 3' (16S760r) and 5' - GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC TG - 3' (16S455r) (Cruz *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2009).

PCR amplification was performed according to Saiki *et al.*, 1988, with some modifications. The standard 50 μ L PCR mixtures contained: 10 μ L of 5x

reaction buffer, 1 μ L of dNTP mixture (2.5mM each), 2 μ L of 5 μ M forward primer, 2 μ L of 5 μ M reverse primer, 0.25 μ L of Taq polymerase (5 U/ μ L), 3 μ L of template DNA and 31.75 μ L of distilled water. The negative controls contained all components of the PCR except the DNA template. The mixtures were incubated in a DNA thermal cycler for a 35-cycle amplification series. After initial denaturation at 94°C for 3min, each cycle included denaturation at 94°C for 45sec, annealing at 62°C for 45sec, and extension at 72°C for 2min. The final extension was carried out at 72°C for 7min. The reaction products were separated in a 1% agarose gel containing 0.5 μ g of ethidium bromide per mL and were visualized under UV light with an imager. PCR products were purified with illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK) according the manufacture's instructions.

Sequencing was carried out at the ACTGene Laboratory (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) using an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The genomic sequences were analyzed using the Phred / Phrap / Consed package.

2.6 Biochemical characterization of bacterial isolates

EB isolates grown in LB medium were submitted to biochemical characterization using the commercial kits BacTray I, II and III (Laborclin, Brazil) following the manufacturer's instructions.

2.7 Bacterial growth curves

Entomopathogenic bacterial strains 30H-B, 33S-C, 5S-L and 15H-S were cultivated in 300 mL of LB broth under agitation at 150 *rpm* in an orbital shaker, at 28°C. Bacterial growth was determined at time intervals by measuring the optical density (OD) at 600 nm. Aliquots of bacterial cultures were sampled for determination of urease content and protein concentration after 2, 8, 11 and 24 hours of growth when OD ranged 0.16-0.19; 0.38-0.42; 0.52-0.66 and 0.9-1.18, respectively.

2.8 Urease production by bacterial isolates in culture

Production of urease during growth of the bacterial isolates was visualized as a reddish color around the colonies grown on urea agar (McGee *et al.*, 1999).

Aliquots of bacterial cells grown in LB broth were lysed using an ultrasonic homogenizer, 10 pulses of 1 minute in an ice bath and then centrifuged at 10 min, 10,000 *g*, 4°C. After discarding the pellets, the supernatants were collected, diluted in 20 mM sodium phosphate pH 7.5 to a protein concentration of 1 mg/mL and used for enzymatic determination of urease. Protein concentration of the cell lysates was determined by their absorbance at 280nm.

Ammonia released by urease activity was determined colorimetrically at 570 nm using the phenol nitroprussiate method (Weatherburn, 1967). For the assays, triplicated points of 100 µg protein of bacterial cell lysates in multiwell plates were incubated with 5mM urea, in 50 mM sodium acetate (pH 5– 6); 50 mM sodium phosphate (pH 7– 8) or 50 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane (pH 9.0), at 37°C, for 12 hours. Absorbance was read in plate reader and urease activity is expressed as units of absorbance at 570 nm generated under the conditions described.

2.9 Collection of hemolymph

Hemolymph samples of *Spodoptera* larvae were collected 24 h after inoculation into the hemocoel of 10⁴ cells of 15 H-S, 30 H-B, 33 S-C and 5 S-L strains. For hemolymph collection, one proleg of ice-immobilized larvae was cut and the flowing hemolymph was collected with a pipette tip, and mixed with 10% of its volume of a chilled anticoagulant solution (0.01M EDTA, 0.1 M glucose, 0.062M NaCl, 0.026M citric acid, pH 4.6). Typically 25-30 µL of hemolymph were collected from each larva. The pH of the hemolymph was measured immediately after collection, before mixing with the anticoagulant, using pH indicator strips (pH 0-14, Merck Chemicals, Germany). The hemolymph was then centrifuged for 1 min, 5,000 x *g* at 4°C and tested for urease activity immediately after. Alternatively, hemolymph aliquots were mixed

with 5X-electrophoresis sample buffer and boiled for 5 min before electrophoretic analysis.

2.10 Urease detection in hemolymph

Hemolymph samples of control and infected larvae 24 h after inoculation were analyzed for ureolytic activity (Weatherburn, 1967), and 12% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) followed by Western blot (Towbin *et al.*, 1979) using a rabbit IgG raised against the *Helicobacter pylori* urease (1:20.000) (Santa Cruz Biotechnology, USA). An anti-rabbit IgG coupled to alkaline phosphatase (Sigma Chemical Co, USA) was used as the secondary antibody (1:25.000). The color reaction was developed with nitro blue tetrazolium chloride (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate (BCIP).

The urease-inhibitory activity of the hemolymph was tested by incubating aliquots of freshly collected hemolymph with 4 μ g of highly purified *Canavalia ensiformis* urease (type III, Sigma Chem. Co., USA) or 0.4 μ g *Helicobacter pylori* urease, purified according to Wassermann *et al.*, 2010, in the presence of 5mM urea, 20 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl buffer, at pH 7.5, for 2 h at 37 °C.

2.11 Phylogenetic and homology analyses

Phylogenetic analyses were performed by the Neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). Evolutionary distances were estimated using the Kimura-2 parameter (Kimura, 1980) using the MEGA version 5.0 software (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Tamura *et al.*, 2007). In total, 1,000 repetitions were performed using the bootstrapping method (Felsenstein, 1985), to determine the reliability of each node of the tree. Sequences similar to those being inspected for identification were acquired by BLAST over the NCBI database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul and Lipman, 1990).

2.12 Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error. Significance of differences between means was determined using one-way ANOVA. Results were considered statistically different when $p < 0.05$ (Tukey test).

3. Results

3.1 Entomopathogenic effect of nematodes and symbiotic bacteria in *Spodoptera frugiperda*

Table I shows the pathogenic effects of eight isolates of nematodes and their symbiotic bacteria on 5th instar *S. frugiperda*. The nematodes, classified into the *Steinernematidae* or *Heterorhabditidae* families, produced mortality in the range of 28 to and 56 % with a dose of 100 infective juveniles per larva. EPN strains number 07 (*Steinernema*), 12 and 15 (*Heterorhabditis*) killed 70-80% of the tested insects. Isolated symbiotic bacteria injected into *S. frugiperda* (10^4 cells per larva) produced high levels of lethality (Table 1), particularly those from *Heterorhabditis* EPN 12,15, 30 and 32.

Table I. Entomopathogenic effect of nematodes and symbiont bacteria in *Spodoptera frugiperda* 5th instars.

EPN strain	Source in Brazil* (State)	Nematode family	Bacterial isolate **	<i>S. frugiperda</i> mortality (%) ***	
				100 IJs per larva after 5 days	10 ⁴ bacterial cells per larva after 3 days
05	RS	<i>Steinernematidae</i>	5S-L	54 ± 5.1 c	34 ± 2.6 e
06	RS	<i>Steinernematidae</i>	6S-J	28 ± 1.5 d	66 ± 3.8 cd
07	RS	<i>Steinernematidae</i>	7S-U	70 ± 2.5 ab	33 ± 3.0 e
12	PR	<i>Heterorhabditidae</i>	12H-A	77 ± 1.9 a	96 ± 2.8 a
15	RS	<i>Heterorhabditidae</i>	15H-S	69 ± 3.5 ab	95 ± 1.9 a
30	SC	<i>Heterorhabditidae</i>	30H-B	56 ± 2.7 bc	89 ± 5.5 ab
32	SC	<i>Heterorhabditidae</i>	32H-E	55 ± 2.7 bc	75 ± 3.4 bc
33	RS	<i>Steinernematidae</i>	33S-C	51 ± 4.0 c	57 ± 5.5 d

* States: RS – Rio Grande do Sul; SC – Santa Catarina; PR – Paraná.

** Bacterial isolates were identified by the number of the EPN source followed by H or S (referring to EPN genera) and a letter.

*** Accumulated mortality (mean ± standard error). Quadruplicate points with 48 (infective juveniles) or 25 (bacterial cells) insects per point. Means in the same column followed by a different letter are statistically different (p<0.05).

Figure 1 depicts the time course of mortality induced by injection of 10^4 cells of symbiotic bacteria into the hemocoel of *S. frugiperda*. The data show that bacteria isolated from *Heterorhabditis* nematodes were more lethal than those from *Steinernema* nematodes, producing ca. 90% mortality after 3 days.

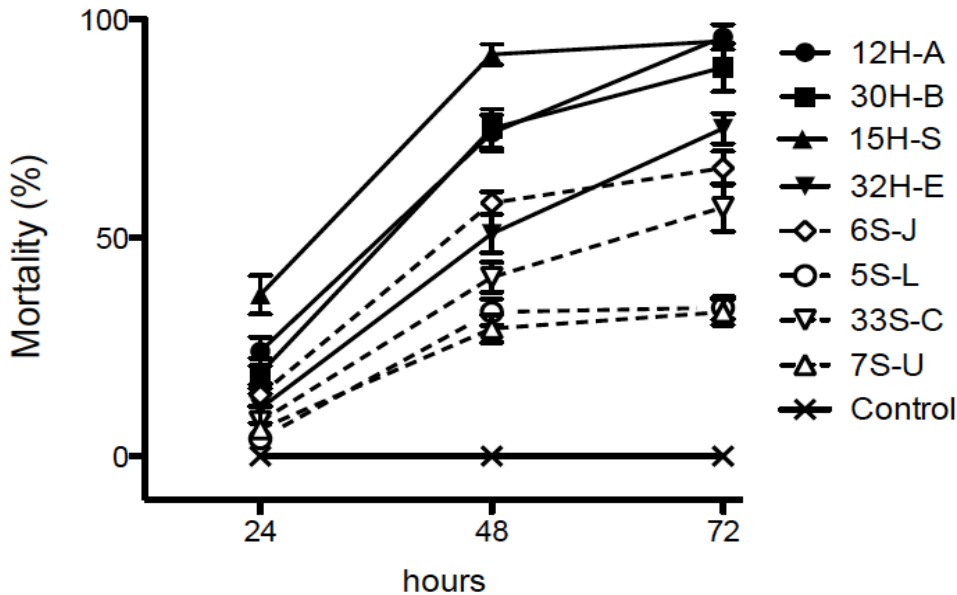


Figure 1. Time course of the mortality of *S. frugiperda* (5th instars) injected into the hemocoel with 10^4 bacterial cells isolated from entomopathogenic nematodes. Data represent mean \pm s.e.m. of quadruplicated points with 48 insects per point.

3.2 Identification of symbiotic bacteria isolates

Amplified rDNA sequences were submitted to the Ribosomal Database Project II server (<http://rdp.cme.msu.edu>). All sequences belong to Proteobacteria, Gammaproteobacteria class, Enterobacteriales order and Enterobacteriaceae family. At the genus level, the sequences were distributed (at 100% confidence level) into two taxa: 12H-A, 30H-B, 32H-E and 15H-S belong to the *Photorhabdus* genus while 33S-C, 6S-J, 5S-L and 7S-U, belong to *Xenorhabdus*. The sequences were submitted to BLAST against the NCBI nucleotide database for a similarity search. For *Xenorhabdus* bacteria, alignments with 99% identity were obtained for *X. szentirmaii* Lengyel *et al.* species. Bacterial isolates 33S-C, 6S-J, 5S-L matched sequence AJ810295.1, and 7S-U matched DQ211712. In the case of bacteria within the *Photorhabdus*

genus, isolates 12H-A and 30H-B showed 98 and 99 % identity with *Photorhabdus* sp. (AB355865), 15H-S matched *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* Fischer Le-Saux *et al.* (BX571863.1) with 98% identity and 32H-E was identified as *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* (Thomas and Poinar)(AY278641.1) with 99% identity. Figures 2 and 3 show the phylogenetic trees for the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria.

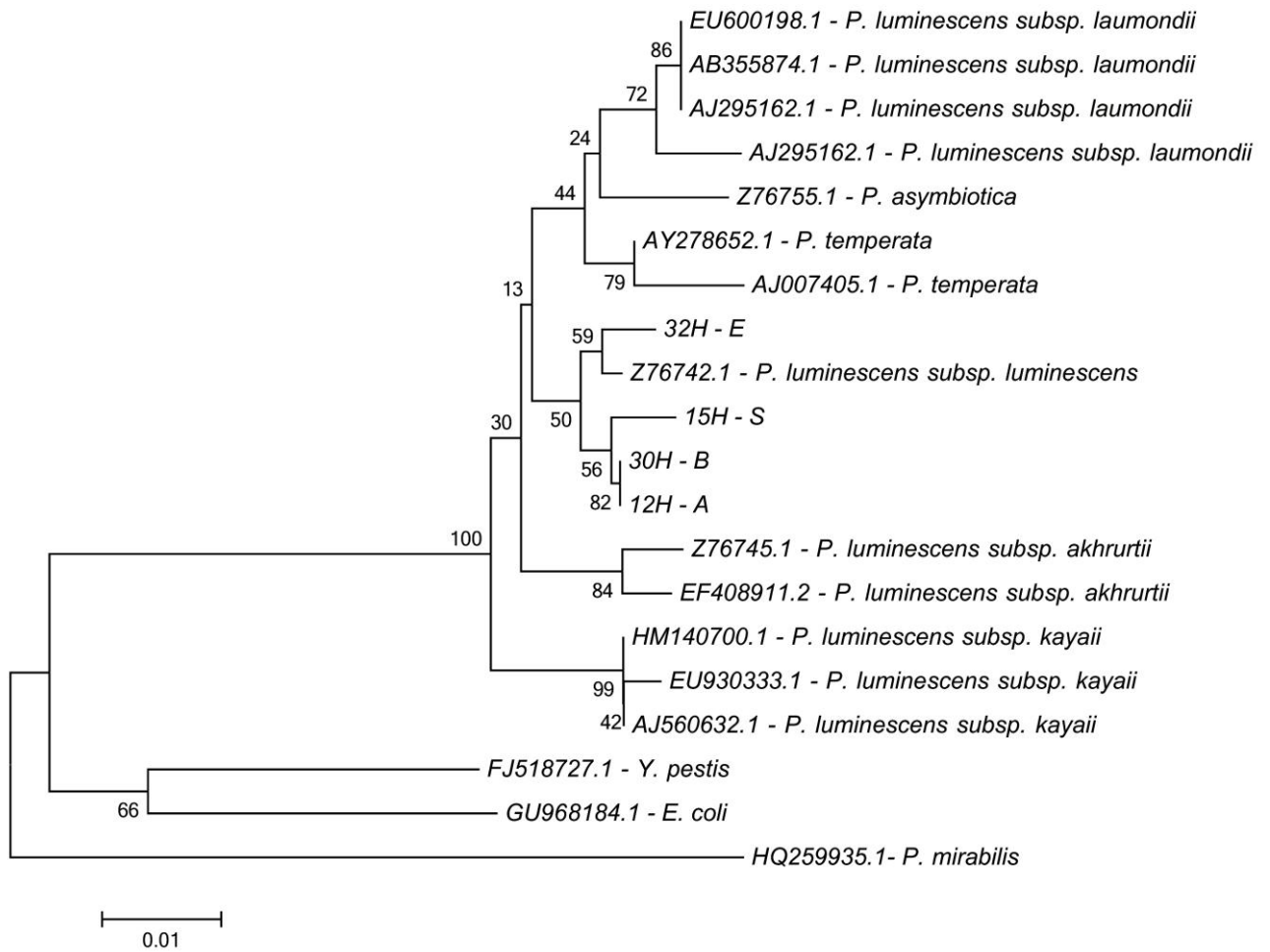


Figure 2. Distance tree of *Photorhabdus* bacterial symbionts. The tree was constructed from 16S rDNA sequences (n=20) by neighbor-joining using the Kimura 2-parameters model on MEGA 5.0 software. All positions containing gaps and missing data were eliminated.

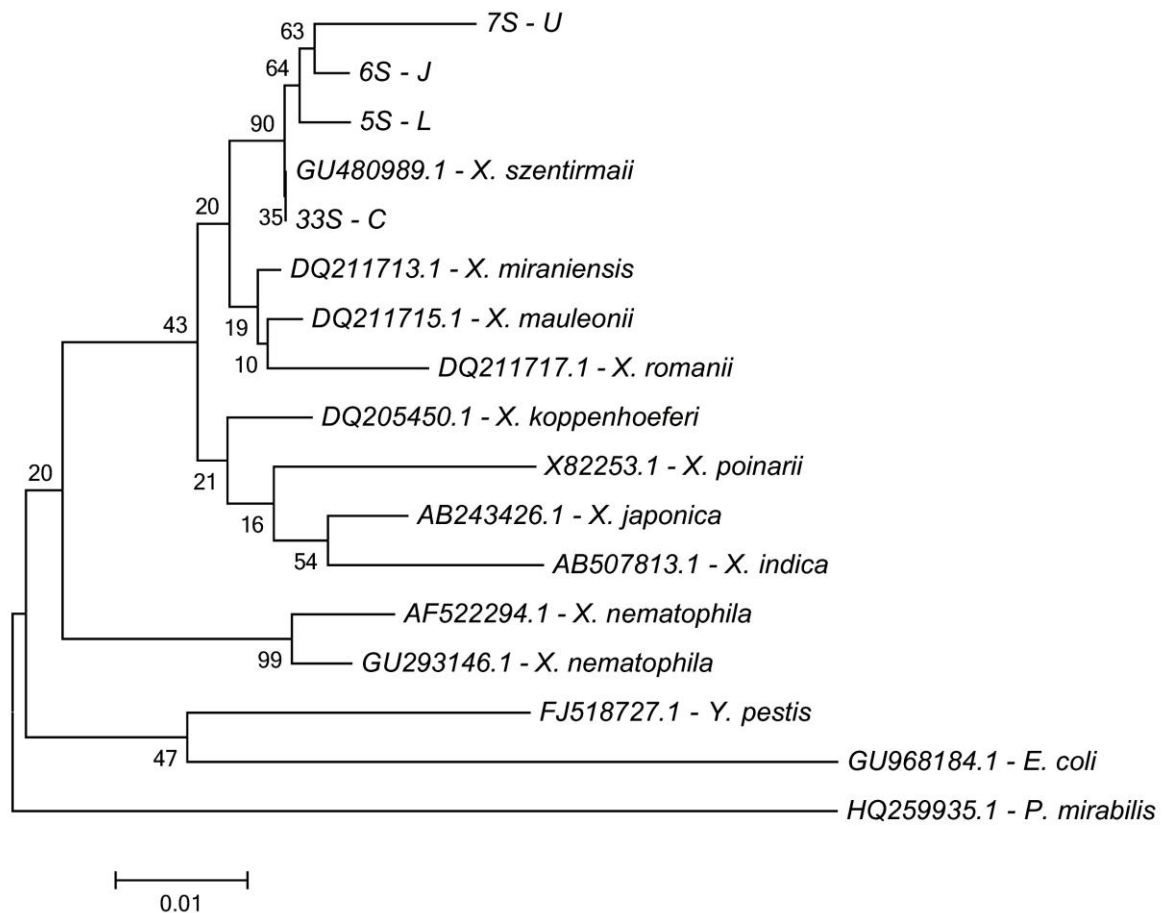


Figure 3. Distance tree of *Xenorhabdus* bacterial symbionts. The tree was constructed from 16S rDNA sequences (n=17) by neighbor-joining using the Kimura 2-parameters model on MEGA 5.0 software. All positions containing gaps and missing data were eliminated.

3.3 Biochemical characterization of symbiotic bacteria

All bacteria were positive for the activities of arginine decarboxylase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase and production of acetyl methyl carbinol. They were all negative for phenylalanine desaminase, enzymatic hydrolysis of thiosulfate and utilization of acetamide and malonate as a carbon source.

Bacteria belonging to the *Photorhabdus* genus (12H-A, 30H-B, 32H-E and 15H-S) were negative for fermentation of rhamnose, adonitol, salycine, arabinose or sorbitol and positive for manitol. All *Photorhabdus* bacteria hydrolyzed urea and esculin, were negative for oxidase and positive for indol

and citrate. *Xenorhabdus* bacteria were more diverse in their biochemical profile. Except for 6S-J, the other isolates were negative for hydrolysis of esculin, positive for oxidase and for fermentation of arabinose. Only 5S-L and 7S-U were positive for indol reaction and tolerance to cetrimide. Isolate 33S-C was the only one among the *Xenorhabdus* bacteria able to hydrolyze urea, while unable to grow in the presence of citrate, rhamnose, adonitol and salycine. These characteristics, summarized in Table II, are consistent with the taxonomical classification at the genus level (Boemare and Akhurst, 2006).

Table II. Biochemical profiles of entomopathogenic *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria.

	<i>Photorhabdus</i>				<i>Xenorhabdus</i>			
	12H-A	30H-B	32H-E	15H-S	33S-C	6S-J	5S-L	7S-U
Oxydase	-	-	-	-	+	-	+	+
β -galactosidase	+	+	-	-	-	-	-	-
Arginine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrogen sulfate	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+	-	-	-
Acetylmethylcarbinol	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine desaminase	-	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophan desaminase	+	+	+	+	+	+	-	-
Malonate	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	+	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	+	-	-	-
Salycine	-	-	-	-	+	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	+	-	+	+
Inositol	+	+	-	+	+	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	+	-	-	-
Sucrose	-	+	-	-	+	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	-	-	-
Rafinose	-	+	-	-	+	-	-	-
Cetrimide	-	-	-	-	-	-	+	+
Acylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	+	+	+	+	-	+	+	+
Maltose	+	+	-	+	+	-	+	+
Esculetin	+	+	+	+	-	+	-	-

3.4 Production of urease by entomopathogenic bacteria

Urease production by *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* entomopathogenic bacteria was assessed by the urea agar test and ureolytic activity. No urease activity was detected in the supernatants of cell cultures, even after 24 hours.

To evaluate the production of urease along the growth curve, four aliquots of the cultures of strains 5S-L, 33S-C, 15H-S and 30H-B were collected at three time points corresponding to the exponential phase of multiplication and a fourth aliquot was taken at the stationary phase (Figure 4). Urease content was determined by the hydrolysis of urea (Figures 5 and 6) in the supernatant of bacterial cell lysates.

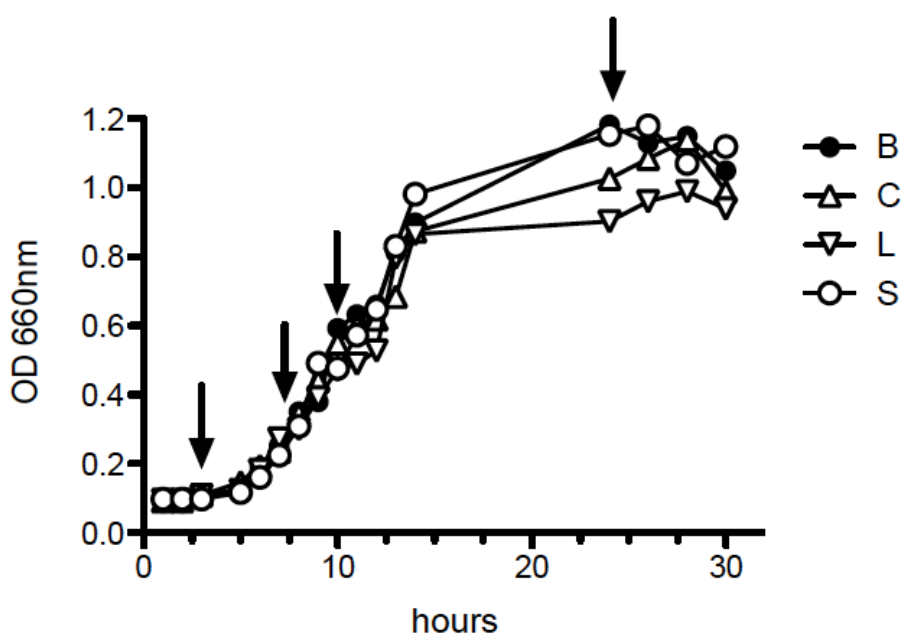


Figure 4. Growth curve of bacterial strains 5S-L, 33S-C, 15H-S and 30 H-B in LB broth under agitation at 150 *rpm* an orbital shaker, at 28 °C. The arrows indicate the points when the four aliquots were taken for determination of urease content.

Figure 5 shows the ureolytic activity at different pH of the cell lysates sampled during the growth curve of the strains 5S-L, 33S-C, 15H-S and 30H-B.

The patterns of urease production of strains 15H-S, 5S-L and 33S-C followed the growth curve approaching maximal levels at the stationary phase. In contrast, strain 30H-B apparently produces two urease isoenzymes, an acidic form with optimal pH ~5 at the beginning of the exponential phase and a basic one, with optimal pH 8, at the stationary phase. While the ureases produced by strains 15H-S and 5S-L showed similar levels of enzyme activities and optimal pH 6.0, strain 33S-C produced about 10-fold higher urease activity with optimal pH 8.0.

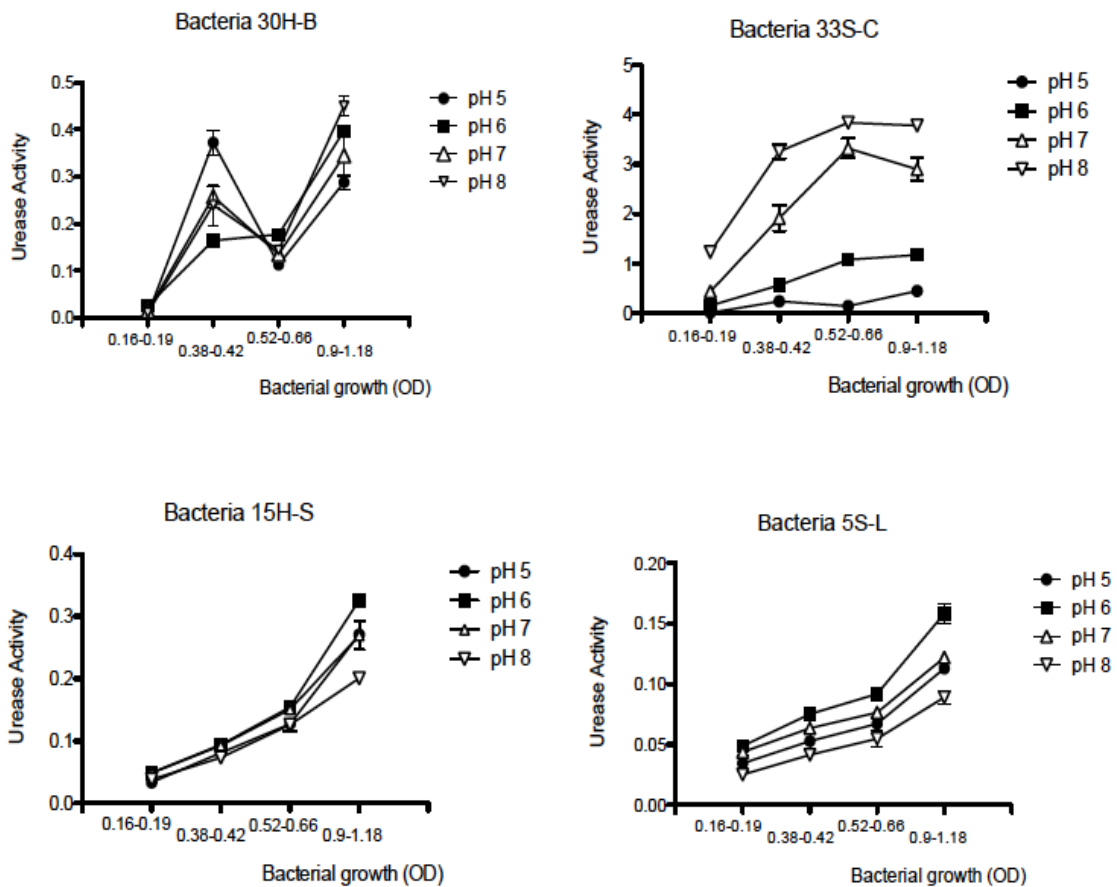


Figure 5. Urease activity at different pH measured at four points of the growth curve of entomopathogenic bacteria 30H-B, 15H-S, 33S-C and 5S-L. Aliquots of bacterial culture were sampled at 2, 8, 12 and 24 hours of growth. After centrifugation, the cell pellet was lysed and the supernatants were used for determination of urease activity. Data (mean \pm s.e.m) are expressed as absorbance at 570 nm/100 μ g protein/12 h at 37 $^{\circ}$ C of quadruplicated points.

Figure 6 illustrates the optimal pH of the ureases produced by the different bacterial isolates. While bacteria 30H-B (in the early exponential phase), 15H-S and 5S-L showed (near to) maximal urease activity at pH 5, urease produced by strain 33S-C had only 10% of its activity at this pH. Only the 33S-C urease had maximal activity at pH 8.0. All ureases were active in the pH range 7 to 8, while very low or no urease activity could be detected at pH 9.0 (not shown). Data in Tables II and III suggest a positive correlation between urease production by the bacteria and their entomopathogenic effect on *S. frugiperda* larvae. *Xenorhabdus* bacteria, except for 33S-C isolate, produced much less urease and were less effective in killing the larvae. Interestingly, we found a direct correlation between the specific activity of acidic ureases (optimal pH 5-6) produced in the stationary phase and mortality of *S. frugiperda* larvae injected with the bacteria (Figure 6B).

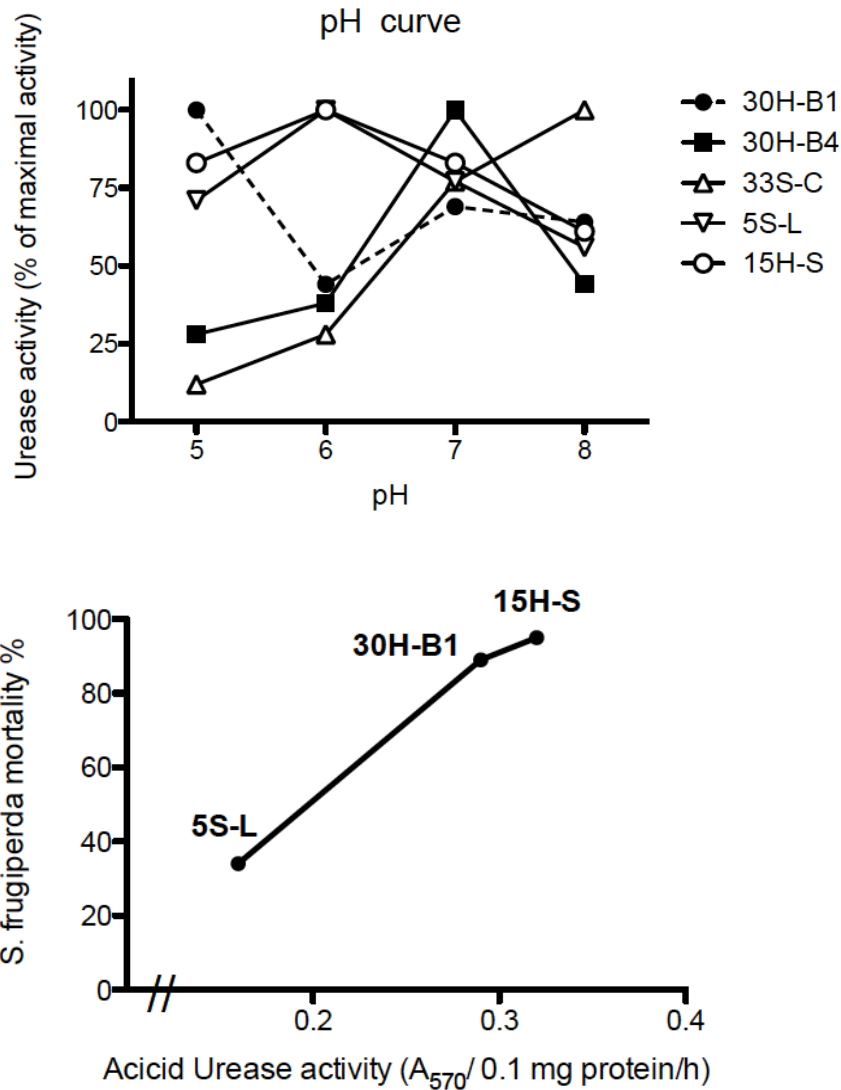


Figure 6. Panel A: Effect of pH on urease activity in cell lysates of entomopathogenic bacteria. Ureolytic activity is expressed as percentage of the maximal activity taken as 100 %. Bacterial cells of strains 15H-S, 33S-C and 5S-L were collected after 24 hours of growth. Strain 30H-B was sampled after 2 (B1) and 24 hours (B4) for comparison. Panel B: Correlation between the levels of acidic urease production by 5S-L 30H-B and 15H-S bacterial strains and the mortality of *S. frugiperda* larvae injected with 10^4 bacterial cells after 48 h.

3.5. Urease activity and pH of hemolymph in injected larvae

SDS-PAGE (Figure 7) and Western blots (data not shown) of hemolymph collected 24 h after injection of 10^4 bacterial cells into the larvae hemocoel revealed the presence of the 60 kDa subunit typical of bacterial urease in all

samples. This result confirms the production of urease by the symbiotic bacteria within the host.

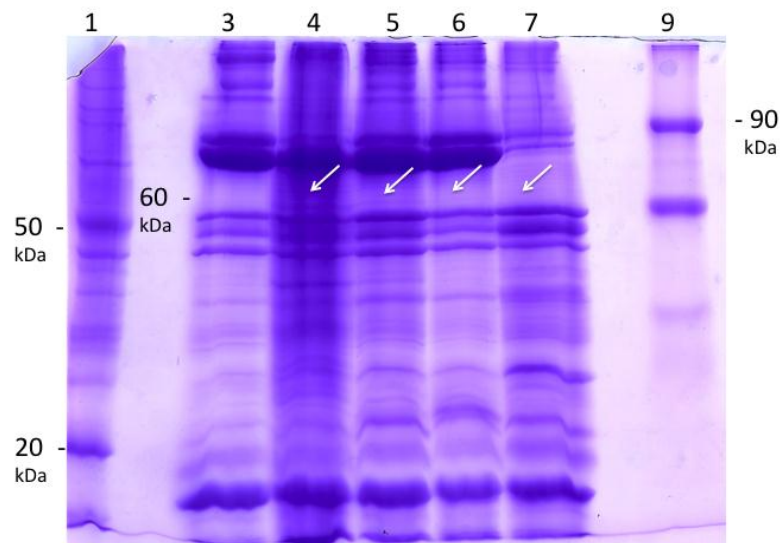


Figure 7. Electrophoretic analysis of *S. frugiperda* hemolymph 24 hours after bacterial infection. Aliquots (30 μ L) of hemolymph were applied to 12 % polyacrylamide gel containing 0.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). Lanes: 1) Mr markers; 3) control (larvae injected with LB broth); 4) larvae injected with 30H-B; 5) larvae injected with 33S-C; 6) larvae injected with 5S-L; 7) larvae injected with 15H-S; 9) jackbean urease (8 μ g). The arrows indicate the position of 60 kDa bands revealed in Western blots against anti-*Helicobacter pylori* urease.

The pH of the hemolymph was in the range 7.0-7.5 either for control (non-injected or buffer-injected) larvae or for the larvae injected with any of the four bacterial strains, after 24 hours. In all cases the hemolymph was transparent and slightly green except for the larvae injected with the 30H-B bacteria, for which it appeared melanized. Considering these pH values, it could be expected that bacterial urease would be active in the hemolymph along the entire course of infection.

The ureolytic activity of bacterial urease in the hemolymph of control and infected *S. frugiperda* was assayed using exogenous urea. Although the Western blots confirmed the presence of urease in the hemolymph of all larvae 24 hours after injection of the bacterial cells and its absence in non-infected ones, the enzyme activity of the bacterial urease could only be detected in the

hemolymph of larvae injected with strain 30H-B (ca. 0.072 A570/12 h/ μ L). Surprisingly, a strong inhibitory effect of the *S. frugiperda* hemolymph upon the enzyme activity of jackbean and *Helicobacter pylori* urease was detected (Figure 8). The urease-inhibitory property of *S. frugiperda* hemolymph was the same for control (non-injected) or bacteria-infected larvae. As shown in Figure 5, except for bacteria 33S-C, the production of urease continues after the bacteria reached the stationary phase, suggesting that along the course of infection, increases in bacterial urease levels could eventually overcome this inhibition.

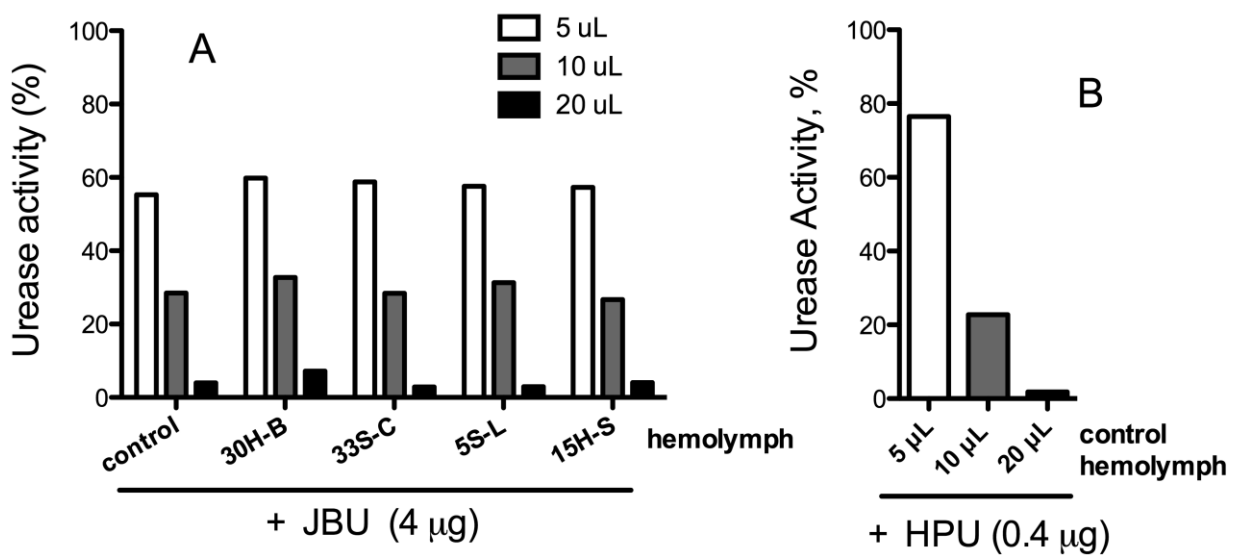


Figure 8. Urease Inhibitory Activity of *S. frugiperda* hemolymph. Jackbean urease (4 μ g; panel A) or *Helicobacter pylori* urease (0.4 μ g; panel B) were incubated with hemolymph collected from larvae 24 h after injection of the bacterial strains, in the presence of 5 mM urea, in 20 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl pH 7.5, in a final volume of 100 μ L, for 2 h at 37 $^{\circ}$ C. Hemolymph from non-injected larvae (control) was tested in the same conditions. The results (means of duplicated points) represent the residual urease activity as compared to the reaction carried out in the absence of hemolymph.

Table III summarizes the results of urease production by entomopathogenic bacteria.

Table III. Production of urease by entomopathogenic bacteria.

Bacterial strain	Urease production			<i>S. frugiperda</i>	
	Urea agar	Cell lysates		Urease in hemolymph*	Mortality %**
		A ₅₇₀ /0.1 mg/h	pH optimum		
<i>Xenorhabdus</i>					
5S-L	(-)	0.16	6	WB	34± 2.6 e
6S-J	(-)	n.d.	n.d.	n.d.	66± 3.8 cd
7S-U	(-)	n.d.	n.d.	n.d.	33± 3.0 e
33S-C	(+)	3.77	8	WB	57± 5.5 d
<i>Photorhabdus</i>					
12H-A	(+)	n.d.	n.d.	n.d.	96± 2.8 a
15H-S	(+)	0.32	6	WB	95± 1.9 a
30H-B***	(+)	0.45	8 (4)	WB + ureolysis	89± 5.5 ab
		0.29	5 (1)		
32H-E	(+)	n.d.	n.d.	n.d.	75± 3.4 bc

n.d. - not determined.

* The presence of bacterial ureases in the hemolymph of injected *S. frugiperda* larvae was detected by Western blot against anti-*Helicobacter pylori* urease and hydrolysis of urea (ureolysis).

** Mortality of *S. frugiperda* larvae 24 hours after injection of 10⁴ bacterial cells into the hemoecel. Means followed by a different letter are statistically different (p<0.05).

*** Bacterial strain 30H-B was sampled at two time points of the growth curve (see figure 4), corresponding to 2 h (1), and 24 h (4) of growth, respectively.

3.6 Homology and sequence analysis of *Photorhabdus* sp. Urease

The genome of two species of *Photorhabdus* are available at the NCBI genome data, the entomopathogen *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 and the human opportunistic pathogen *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *asymbiotica* (Fischer Le-Saux *et al.*) ATCC 43949. Table IV depicts values of a BLAST analysis of the similarity of *Photorhabdus* ureases deduced from the genome information compared to the single chain jackbean (*C. ensiformis*) urease, the di-chain urease of *Helicobacter pylori* and two bacterial tri-chain ureases (the soil bacterium *Bacillus pasteurii* (Miquel) and the insect pathogen *Yersinia enterocolitica* (Schleifstein and Coleman)). The identity among all ureases irrespective of their source is around 55 % (Mobley *et al.*, 1995). In that context, it can be seen that *Photorhabdus* ureases follow the expected trend with at least 53-60 % identity compared to the other ureases. Interestingly, *Y. enterocolitica* urease shares larger identity (70-83%) with *Photorhabdus* urease and both display optimal pH in acidic values (Bhagat and Viridi, 2009)(Supplementary Figure 1).

Table IV. BLAST hits for ureases from *Photorhabdus* genomes.

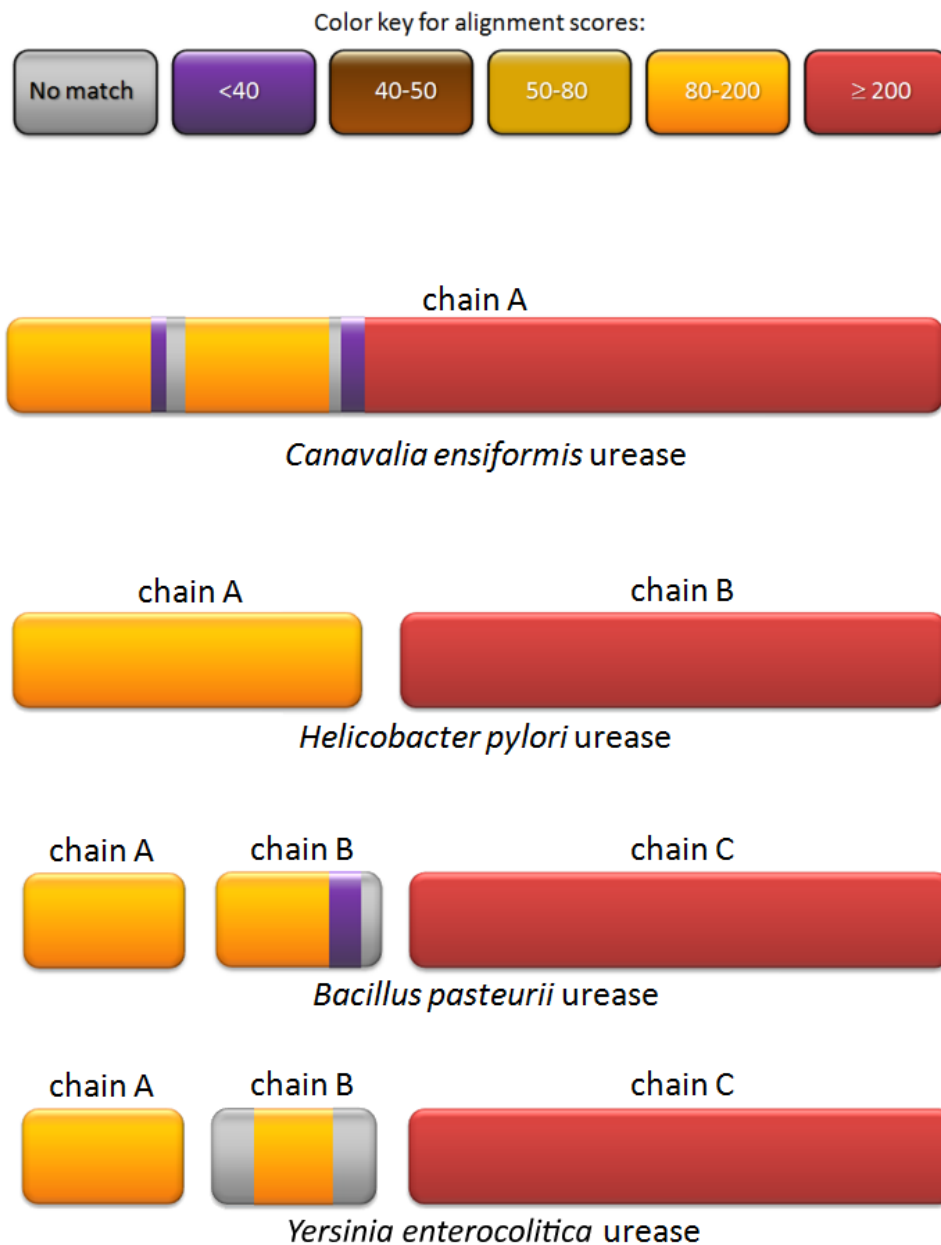
		UREASE / UREASE CHAINS *								
		JBU	HPU		BPU			YEU		
		A	A	B	A	B	C	A	B	C
<i>P. asymbiotica</i>	Query	90**	86	99	100	93	99	100	69	99
	coverage (%)									
	E value	0.0	2e ⁻⁵⁴	0.0	7e ⁻³⁵	5e ⁻²⁹	0.0	7e ⁻⁵²	2e ⁻⁵¹	0.0
	Max ident.(%)	55	53	57	56	52	57	79	68	83
<i>P. luminescens</i>	Query	94	86	99	100	89	99	100	66	99
	coverage (%)									
	E value	0.0	6e ⁻⁵⁵	0.0	6e ⁻³⁵	4e ⁻²⁹	0.0	3e ⁻⁵¹	4e ⁻⁵²	0.0
	Max ident.(%)	55	53	57	60	53	57	79	72	83

* JBU, jackbean (*Canavalia ensiformis*) urease; HPU, *Helicobacter pylori* urease; BPU, *Bacillus pasteurii* urease; YEU; *Yersinia enterocolitica* urease.

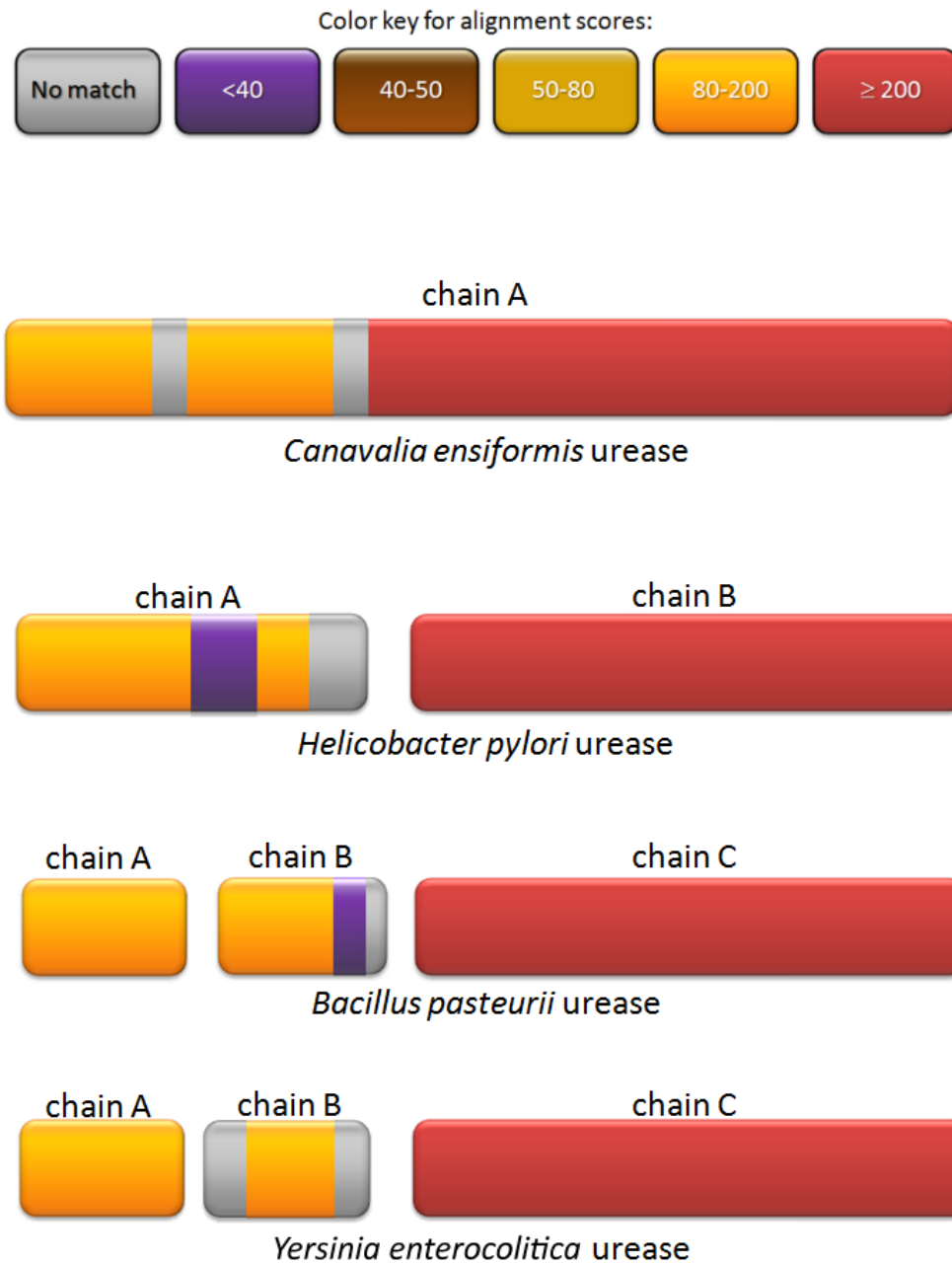
** Sequences analyzed (search translated nucleotide database using a protein query [tblastn]) were: JBU (gi 167228), BPU A(gi 157884143), BPU B (gi 6573658), BPU C (gi 6573659), HPU A(gi 16974910), HPU B (gi 16974911), YEU A (gi 431750), YEU B (gi 431751), YEU C (gi 431752).

Supplementary figure: Alignments and BLAST scores of ureases from different organisms with the amino acid sequences of ureases deduced from *P. asymbiotica* (panel A) and *P. luminescens* (panel B) genomes.

Panel A: Urease of *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *asymbiotica* ATCC 43949



Panel B: Urease of *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TTO1



4. Discussion

In this study we have identified eight isolates of entomopathogenic nematodes native to the south of Brazil that are potentially effective in controlling *S. frugiperda* populations in maize plantations. Among these isolates, two of *Heterorhabditis* genus and one of *Steinernema* killed about 70%

of infected larvae after five days under laboratory conditions. Similar levels of mortality of *S. frugiperda* were observed when the nematodes were tested upon the larvae or pupae in the soil (Salvadori, J.D.M., unpublished data).

Other screenings of entomopathogenic nematodes active against *Spodoptera* species were reported (Abdel-Razek, 2006; Garcia *et al.*, 2008; Glazar *et al.*, 1991). Negrisoli *et al.* (2010) studied the efficacy of three Brazilian strains of entomopathogenic nematodes in association with commercial insecticides to control *S. frugiperda* in laboratory conditions and in corn fields. Campos-Herrera *et al.* (2009) reported eighteen isolates of *Xenorhabdus* species associated with *Steinernema* nematodes from Spain and studied the pathogenicity of four of these isolates towards *Spodoptera littoralis* (Boisduval).

Symbiotic bacteria associated to the entomopathogenic nematodes were successfully isolated and classified taxonomically both by phenotypic-biochemical criteria and sequencing of 16S rDNA (Liu *et al.*, 2001). It is well-known that the relationship between the bacterium and the nematode is highly specific and nematodes only maintain mutual associations with their cognate bacteria or very closely related strains (Eleftherianos *et al.*, 2010). As expected, phylogenetic analysis assigned the bacteria isolated from *Heterorhabditis* and *Steinernema* nematodes respectively into the *Photorhabdus* or *Xenorhabdus* genus. In the case of *Photorhabdus* bacteria, all isolates were close to the well-known entomopathogenic bacterium *P. luminescens* subsp. *luminescens*. The isolates of *Xenorhabdus* bacteria clustered near to *X.szentirmaii*, which were recovered from nematodes occurring in Argentina, very close to the locations where the nematodes described here were collected (Lee and Stock, 2010).

The entomopathogenic potential of the isolated symbiotic bacteria was evaluated by injection into the hemocoel of 5th instars. All four *Photorhabdus* species produced 75-96% mortality of injected larvae after three days. On the other hand, *Xenorhabdus* bacteria were less active, with mortality rates in the range 33-57% after the same time. This higher lethality of *Photorhabdus* bacteria when injected into *S. frugiperda* larvae correlates with the better efficiency of *Heterorhabditis* nematodes to kill the insects.

A number of factors are implicated in the insecticidal properties of symbiotic bacteria associated with entomopathogenic nematodes. *Photorhabdus luminescens* (Thomas and Poinar) produces several types of

toxins, which are relevant in its trilateral symbiosis with nematodes and insects. A high molecular mass (~1 megaDa) insecticidal toxin (Tc) formed by three components (TcA-, TcB- and TcC-like proteins) complexes, is essential for symbiosis and insecticidal activity (French-Constant and Bowen, 2000; French-Constant *et al.*, 2007; Forst *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2002). The biologically active components of the Tc toxins are ADP-ribosyltransferases (Fieldhouse and Merrill, 2008), which modify actin and Rho GTPases (Lang *et al.*, 2010; Lang *et al.*, 2011). *Xenorhabdus* bacteria produce a similar toxin complex composed of three proteins (XptA2, XptB1 and XptC1) which *in-vitro* can form hybrid complexes with its *Photorhabdus* counterparts (Sheets *et al.*, 2011). The toxin “Makes caterpillars floppy 1” (Mcf1) is also implicated in the insecticidal property of *P. luminescens* (Daborn *et al.*, 2002). Mcf1 induces apoptosis and has sequence similarity with a BH3 (Bcl2-homology 3 domain); it also inhibits hemocyte motility and function, apparently through the Rho subfamily protein Rac (Dowling *et al.*, 2004; Dowling *et al.*, 2007).

Another factor that might contribute to the insecticidal properties of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria is the production of urease. In previous studies (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000) we have demonstrated that the entomotoxic activity of canatoxin (an isoform of *Canavalia ensiformis* urease)(Follmer *et al.*, 2001) relies mostly, but not exclusively, on the ability of insects to release an internal peptide from the ingested urease molecule upon the action of cathepsins-like digestive enzymes. Insects with trypsin-based digestion, as is the case of lepidopterans, were found to be insensitive to the lethal action of ingested urease, probably due to their inability to release the entomotoxic peptide(s) contained within the protein molecule (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). We also reported previously that the urease of the soil bacterium *Bacillus pasteurii* was innocuous when fed to the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* Guérin-Ménéville (Follmer *et al.*, 2004). Due of their tri-chain structure, bacterial ureases lack part of the amino acid sequence of the entomotoxic peptide identified in the single chain *C. ensiformis* urease (Mulinari *et al.*, 2007) and this might explain its inability to kill the bugs.

On the other hand, more recent studies have shown that picomolar concentrations of intact jackbean ureases, although not killing the kissing bug

Rhodnius prolixus Stal, exert a number of entomotoxic effects such as inhibition of diuresis (Carlini *et al.*, 1997), directly affecting Malpighian tubules (Staniscuaski *et al.*, 2009) and water transport in the crop, as well as increasing the frequency of crop contractions (Staniscuaski *et al.*, 2010). These effects might contribute to the toxicity of urease given orally to insects, acting synergistically with the entomotoxic peptide formed upon hydrolysis of the protein in the hemipteran midgut.

The observations made by Martin *et al.*, 2009, demonstrating that urease production correlated positively to the fitness of *B. thuringiensis* strains to control the gypsy moth *Lymantria dispar*, led us to re-evaluate the potential entomotoxic properties of bacterial ureases and the susceptibility of lepidopterans to entomotoxic effects of ureases. These authors described that among fifty *B. thuringiensis* isolates, only those producing urease activity had the ability to pass repeatedly from one gypsy moth larva to the next, without intervening growth on artificial media. The authors speculated that the role of *B. thuringiensis* urease could be related to biodegradation, improving the ability of the bacteria to replicate in the hemolymph (Martin *et al.*, 2009).

In the present work we studied the urease production of four entomopathogenic bacteria, two *Photorhabdus* spp. and two *Xenorhabdus* spp., both *in-vitro* and during the course of infection caused by injection of the bacteria into *S. frugiperda* hemocoel. The pattern of urease production *in-vitro* followed the curve of bacteria growth, accumulating in high levels towards the stationary phase. In three of the studied bacterial strains, the results suggest the presence of a single type of urease with optimal activity at an acidic (15H-S and 5S-L) or basic (33S-C) pH range. In contrast, the *Photorhabdus* 30H-B isolate produced predominantly an acidic urease during the exponential phase while a second type, more basic urease, was detected in the stationary phase. The urease specific activity (expressed as A570/12h/100 µg protein) in acidic media for all bacteria at the stationary phase was in the range of 0.1 – 1.0, whereas the basic urease produced by *Xenorhabdus* 33S-C bacteria reached specific activity levels of 3.0-4.0.

The data summarized in Table III suggest a positive correlation between urease production by the bacteria and their entomopathogenic effect on *S. frugiperda* larvae. *Xenorhabdus* bacteria, except for 33S-C isolate, produced

much less urease than *Photorhabdus* isolates and were less effective in killing the larvae. Interestingly, there is direct correlation between the specific activity reached by acidic ureases (optimal pH 5-6) in cell lysates sampled at the stationary phase and mortality induced by injecting bacteria into *S. frugiperda* larvae (Figure 6B).

Urease was produced by the bacteria *in vivo* during the course of infection in lepidopteran larvae and could be detected by SDS-PAGE/Western blot of hemolymph sampled 24 hours after injection. Urease activity was detected in the hemolymph of *S. frugiperda* injected with the *Photorhabdus* isolate 30H-B. Considering the pH values of hemolymph in infected larvae, it is expected that bacterial urease could be active in the hemolymph along the entire course of infection. Although most insects are uricotelic, urea has been detected in the hemolymph and in the excreta of many insects and arginase is widely distributed in insects (Burrnell, 1967; Cochran, 1985; Klowden, 2007; Pant and Kumar, 1978). It is noteworthy that in some insects urea concentration in the hemolymph increases depending on the diet and under certain physiological conditions, such as metamorphosis (Hirayama *et al.*, 1999; Pant and Kumar, 1978; Sumida *et al.*, 1993). An increased amount of urea in the infected *S. frugiperda* may result from the release of mitochondrial arginase and arginine from injured tissues. Hydrolysis of this endogenous urea by the bacterial ureases and the release of toxic ammonia would contribute to the entomotoxic effect.

On the other hand our results (Figure 8) showed the presence of urease inhibitor(s) in the hemolymph of control and bacterial-infected *S. frugiperda* implying that the enzyme's activity would be blocked. Thus, if urease contributes somehow to the entomopathogenic effect of the symbiotic bacteria, this is probably not related to its enzyme activity. Our previous data showed that the ureolytic activity of ureases is not relevant to their insecticidal properties in hemipterans and bruchid beetles (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Preliminary results indicated the presence of inhibitor(s) of urease activity in the hemolymph of the lepidopteran *Galleria melonella* Linnaeus and also in that of the hemipteran *Dysdercus peruvianus* (data not shown). As we previously reported, *D. peruvianus* is highly susceptible to ureolysis-independent entomotoxic effects of plant ureases (Follmer *et al.*, 2004;

Piovesan *et al.*, 2008; Staniscuaski *et al.*, 2005). Altogether, these facts raise the possibility that ureases also display ureolysis-independent entomotoxic effect in lepidopterans.

This is the first description of the presence of urease inhibitors in animals. The concentration of this (ese) inhibitor (s) apparently did not change in response to the bacterial infection. The same volume of hemolymph inhibited either 4 µg of jackbean urease or 0.4 µg of *H. pylori* urease, suggesting that this inhibitory activity is more adapted to counteract the action of dietary plant ureases than serving a defense role against infection by urease-producing bacteria.

The chemical nature of this (ese) inhibitor (s), apparently a ca. 10 kDa thermostable molecule (data not shown), was not investigated in the present work. The presence of inhibitors of metalloproteinases (Vilcinskis and Wedde, 2002; Wedde *et al.*, 2007), cysteine proteinases (Miyaji *et al.*, 2007) and serine proteinases (Zhen *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2006) in the hemolymph of insects of different orders has been described. As urease belongs to the superfamily of the amidohydrolases (Holm and Sander, 1997) which encompass some structurally related peptidases (Thoden *et al.*, 2003), a possibility exists that the observed inhibition is due to a proteinase inhibitor

In conclusion, in this work we have identified entomopathogenic nematodes native to the South region of Brazil, potentially effective for use in the biocontrol of *S. frugiperda*. Symbiotic bacteria associated to these nematodes were characterized biochemically and by their 16S rDNA as belonging to *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* genera. Urease production by the symbiotic bacteria correlated positively to their entomopathogenicity. The presence of urease inhibitors in the insect's hemolymph, described here for the first time, suggested that ureases display ureolysis-independent entomotoxic effects in lepidopterans, contributing to the overall toxicity of the nematodes-bacteria complexes.

Acknowledgements

This work was financed by grants from the Brazilian agencies CAPES-MEC (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq-MCT (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul). We are grateful to Dr. Lidia Fiuza (UNISINOS), Dr. Lucia Vargas (UCS) and Dr. Paulo Roberto Valle da Silva Pereira (EMBRAPA/Trigo) for supplying *S. frugiperda* larvae and granting access to laboratories facilities.

Authors contribution

J.D.M.S has conducted all experiments with EPNs and EB; M.S.D. carried out the studies on the presence of urease and inhibitors in hemolymph samples; R.L-B. analysed urease sequences; E.Y.L. worked on taxonomy of EB; J.R.S. collaborated with helpful suggestions and discussing data; C.R.C. conceived this work and wrote the paper .

DISCUSSÃO

A necessidade de reduzir as perdas causadas por insetos-praga e, por conseguinte, aumentar a eficiência na produção agrícola, requer estratégias que impactem positivamente no rendimento e na rentabilidade da agricultura. Nos dias de hoje, a demanda para controle de insetos-pragas ainda incide sobre a utilização de defensivos químicos, tanto nos processos produtivos, como na conservação dos estoques.

Quando bem estabelecido, o controle biológico de pragas pode ser alternativo ao uso de agrotóxicos, uma vez que apresenta vantagens como alta especificidade para o inseto-alvo, menor impacto ambiental e menor risco para a saúde humana. Este processo caracteriza-se pelo uso de um inimigo natural seja ele parasitóide, predador ou entomopatógeno (Parra *et al.*, 2002).

No primeiro capítulo deste trabalho, avaliou-se a virulência de nematóides entomopatogênicos, como estratégia de controle biológico para *S. frugiperda*, praga tradicionalmente controlada com agrotóxicos ou plantas *Bt*. A utilização de isolados de NEPs (NEPETs) mostrou-se bastante interessante no controle da lagarta-do-cartucho, uma vez que tanto lagartas de último instar quanto pré-pupas, foram suscetíveis às doses e condições testadas e, principalmente por serem organismos nativos, adaptados as condições de clima e à entomofauna local.

Apesar do uso de NEPs no Brasil ser incipiente, existe grande potencial para sua utilização como agentes de controle biológico de pragas e vetores, o que requer critérios na escolha do nematóide: eficiência na redução das populações do inseto-praga e segurança para o ambiente, homem e organismos não-alvo (Dolinski & Moino, 2006).

No Brasil, os NEPs são regulamentados pela Lei nº 7.802 (11/07/89) e pelo Decreto Regulador nº 4.074 (04/01/02) para liberação à campo. Segundo a INC nº 2 (23/01/06) espécies exóticas ou indevidamente introduzidas no País são consideradas ilegais.

No âmbito nacional, destacam-se insetos-praga com características importantes para serem considerados alvos dos NEPs (Salvadori *et al.*, 2004; Voss, 2006) e de relevância econômica:

- pragas que tem uma fase do seu ciclo no solo: cigarra-da-raiz do cafeeiro (*Quesada gigas*), cigarrinha-das-raizes em cana-de-açúcar (*Mahanarva* sp.),

broca-da-cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*), broca-do-rizoma-da-cana-de-açúcar (*Sphenosphorus levis*) e gorgulho-da-goiabeira (*Conotrachelus psidii*).

- alta mortalidade em ensaios laboratoriais: cascudinho de aviário (*Alphitobius diaperinus*), mosca-das-frutas (*Anastrepha fraterculus*), coró-das-pastagens (*Diloboderus abderus*), larva-alfinete (*Diabrotica speciosa*) e tamanduá-da-soja (*Sternechus subsignatus*).

- histórico de infecção por NEPs: coró-da-soja (*Phyllophaga cuyabana*), coró-sulino-da-soja (*Demodema brevitarsis*), coró-do-trigo (*Phyllophaga triticophaga*), curculionídeos-das-raízes em citros (*Pantomorus*, *Naupactus*, etc.), filoxera-da-videira (*Daktulospharia vitifoliae*), lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*), lagarta-elasma (*Elasmopalpus lignosellus*), broca-da-cana-de-açúcar (*Migdolus fryanus*), percevejos-castanhos (*Scaptocoris castanea*), bicheira-da-raiz do arroz (*Oryzophagus oryzae*) e grilos (*Gryllus assimilis*, *Gryllotalpa hexadactyla*).

Como alternativa aos agrotóxicos, a produção de plantas resistentes ao ataque de insetos, geneticamente modificadas com toxinas bacterianas, vem crescendo em aceitação mundial e é amplamente utilizada na agricultura de alguns países, entre eles o Brasil. No entanto, o risco de surgimento de insetos resistentes a esta estratégia implica na busca constante de novas toxinas com potencial inseticida que possam ser utilizadas no controle de insetos-alvo, principalmente das ordens Lepidoptera e Coleoptera.

No segundo capítulo desta tese, bactérias simbiotes de isolados de nematóides entomopatogênicos ativos contra *S. frugiperda* foram caracterizadas e investigadas quanto à virulência e a produção de urease, *in vitro* e *in vivo*.

Isolados bacterianos do gênero *Photorhabdus* produziram 75-96% mortalidade das larvas injetadas após 72 horas, enquanto os isolados do gênero *Xenorhabdus* foram menos agressivos induzindo, no mesmo período, mortalidade na faixa de 33-57%.

Estudos iniciais sobre as propriedades entomotóxicas de ureases vegetais apontaram que lepidópteros não são susceptíveis à ingestão destas proteínas e, que a ausência da atividade inseticida nas ureases bacterianas é atribuída à parte faltante da sequência correspondente ao domínio entomotóxico (Carlini *et al.*, 1997; Follmer *et al.*, 2004). Contrastando com

estas observações Martin *et al.* (2009) referiram que linhagens urease-positivas de *B. thuringiensis* foram eficientes como agentes de controle biológico para o lepidóptero *Lymantria díspar*. Com base nesta evidência, objetivou-se re-avaliar a potencial entomotóxico de ureases bacterianas, usando como modelo *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* em *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).

B. thuringiensis é uma bactéria de solo que durante a fase estacionária de seu desenvolvimento produz cristais protéicos tóxicos para insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (Ibrahim *et al.*, 2010). Como proteínas inseticidas, as ureases vegetais compartilham aspectos funcionais com estas toxinas bacterianas (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002; Carlini & Polacco, 2008). Ambas passam por uma etapa de ativação proteolítica para formar a toxina ativa e produzem efeitos tóxicos nos insetos-alvo. Enquanto o mecanismo de ação da JBU e da canatoxina envolve a hidrólise por enzimas acídicas (tipo catepsinas), as proteínas *Bt* precisam ser hidrolisadas por enzimas alcalinas (tripsina) para gerar a toxina funcional (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000; Tojo & Aizawa, 1983).

No caso das toxinas *Bt*, estas se ligam a receptores de membrana das células epiteliais do intestino, formam poros transmembrana causando a aumento do volume citoplasmático o que acarreta em lise celular e morte do inseto (Ibrahim *et al.*, 2010).

Dados de Piovesan (2008) apontaram que a JBU nativa altera *in vitro* propriedades elétricas de membranas bilipídicas artificiais, sugerindo a formação de poros e aumento da permeabilidade celular. Micheletto (2010) demonstrou, por espalhamento de raios X, que a JBU de fato se insere na membrana de lipossomos. Sob esta ótica, os efeitos das ureases e das proteínas *Bt* são comparáveis, uma vez que ambas são capazes de alterar propriedades da membrana celular.

Os dados apresentados nesta tese sugerem que o efeito inseticida das ureases de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* não seja exclusivamente dependente da liberação de peptídeos entomotóxicos e que outros efeitos da JBU já descritos *in vitro* possam contribuir para a toxicidade observada em *S. frugiperda*. Stanisçuaski *et al.* (2010) mostraram que a JBU contribui para o efeito entomotóxico, sendo transportada na forma ativa para a hemolinfa após administração na dieta de *Rhodnius prolixus*.

O processo de transporte da urease mostrou-se semelhante no bicho-da-seda *Bombyx mori* (Sumida *et al.*, 1993). Os autores observaram a presença de urease na hemolinfa apenas na fase de pré-pupa e que a mesma tinha origem na fonte alimentar do inseto, no caso folhas de amoreira (*Morus alba*).

Os resultados também apontam a presença de inibidores de urease na hemolinfa de *S. frugiperda* e *D. peruvianus*, sugerindo que a enzima proveniente da dieta e presente na hemolinfa de *R. prolixus* e de *B. mori*, estimada pela atividade ureolítica da proteína, seja ainda maior do que o detectado por esses autores (Sumida *et al.*, 1993; Stanisçuaski *et al.*, 2010).

Assim como as ureases de leguminosas não induzem mortalidade por via oral em insetos da ordem Lepidoptera, p.ex. canatoxina em *Manduca sexta*, a JBU ou urease de soja em *S. frugiperda* (Carlini *et al.*, 1997; Mulinari *et al.*, 2007), *B. mori* também não é afetada pela urease da amoreira. Por outro lado, ureases bacterianas parecem ter efeitos deletérios em lepidópteros, como os resultados obtidos neste trabalho e nos dados obtidos por Martin *et al.* (2009).

Nesse contexto é oportuno observar:

- a) a via de administração pode ser um fator determinante na ação das ureases em lepidópteros, sendo inefetiva a via oral, requerendo a produção da proteína diretamente na hemolinfa durante a infecção pela bactéria;
- b) apesar da alta identidade compartilhada por todas as ureases, há diferenças importantes entre as ureases de *Photorhabdus* e a JBU, particularmente nas cadeias menores das proteínas bacterianas.

A produção de urease por bactérias entomopatogênicas *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* foi caracterizada durante o crescimento bacteriano *in vitro* e *in vivo*, durante a infecção das lagartas de *S. frugiperda*. A cinética de produção de urease *in vitro* foi semelhante para os isolados analisados e atingiu níveis máximos na fase estacionária. Concordando com o fato de que, em outros organismos produtores de urease, essa é uma enzima de localização citosólica, não foi detectado atividade ureolítica no sobrenadante das culturas bacterianas em fase exponencial e início de fase estacionária. Essa observação sugere que houve lise bacteriana com liberação da proteína na hemolinfa.

A urease produzida pela bactéria 33S-C distinguiu-se das demais pois apresenta pH ótimo na faixa alcalina, enquanto que as ureases das outras bactérias apresentaram atividade máxima entre os pHs 5 e 6. A bactéria 30H-B parece produzir duas isoformas de urease, uma acídica e outra neutro-alcalina. A capacidade inseticida das bactérias mostrou paralelismo com o nível de atividade das ureases acídicas. Interessante é observar que a urease das bactérias entomopatogênicas do gênero *Yersinia* também são acídicas (Bhagat & Viridi, 2009). Uma hipótese a se considerar é que essas bactérias possam ter desenvolvido duas isoformas de urease, uma de carácter neutro-alcalino, relacionada com o metabolismo de nitrogênio, e outra mais ácida, atuante como fator de virulência.

Considerando que o pH medido na hemolinfa de lagartas controle ou infectadas variou entre 7,0-7,5, e que uréia pode derivar dos tecidos lesados durante a infecção, seria de se esperar que a enzima estivesse ativa, contribuindo com a amônia gerada para o efeito entomopatogênico. No entanto, não foi possível medir a atividade ureolítica na hemolinfa das lagartas infectadas, apesar da presença da banda imunorreativa consistente com uma banda de 60 kDa detectada por Western-blot. Apenas para a bactéria 30H-B, a mais entomotóxica entre as testadas, detectou-se uma pequena atividade enzimática. A hemolinfa de lagartas controle ou infectadas causou significativa inibição da atividade enzimática de ureases de diferentes fontes, parecendo mais eficiente na inibição de ureases bacterianas do que as vegetais. Essa propriedade inibitória de urease não é exclusiva de lagartas de *S. frugiperda*, uma vez que a hemolinfa do percevejo manchador de algodão, *D. peruvianus*, apresentou a mesma capacidade de inibição.

Uma vez que as ureases são abundantes em fontes vegetais e que a urease ingerida por insetos fitófagos pode ser transportada para a hemolinfa, seria de se esperar que os insetos tivessem desenvolvido alguma forma de proteção contra os efeitos potencialmente tóxicos das ureases. O inibidor de urease presente na hemolinfa de *S. frugiperda* não aumentou com a infecção bacteriana, provavelmente representando proteção contra os níveis de urease presentes na dieta, mas oferecendo pouca proteção contra microrganismos produtores de urease.

Essa é a primeira descrição de um inibidor de urease em animais. A natureza química do inibidor não foi elucidada, sendo que uma caracterização preliminar sugeriu tratar-se de uma molécula termoestável de baixo peso molecular.

Assim, esses resultados indicam que se as ureases de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* contribuem de alguma forma como fatores de virulência desses organismos, não deve ser através da atividade enzimática ou pela geração de peptídeos entomotóxicos equivalentes ao pepcanatox/jaburetox, e sim por propriedades da molécula proteica intacta.

CONCLUSÕES

- Nematóides entomopatogênicos (NEPETs) provenientes de solos da região Sul do Brasil foram caracterizados quanto à virulência para lagartas e pré-pupas de *Spodoptera frugiperda*, os quais apresentaram potencial para uso no controle biológico desse inseto-praga.
- Considerando os resultados de lagartas e pré-pupas *in vitro*, de pré-pupas em solo e da capacidade de multiplicação dos NEPs no inseto hospedeiro, os NEPETs do gênero *Heterorhabditis* parecem ser as melhores alternativas para o controle de *S. frugiperda*.
- Bactérias associadas aos NEPETs *Heterorhabditis* e *Steinernema* foram isoladas, caracterizadas por provas bioquímicas e sequenciamento do rDNA e, definidas como membros dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, respectivamente.
- Dois isolados de cada gênero bacteriano foram analisados quanto à cinética de multiplicação *in vitro* e à produção de urease, evidenciando uma correlação positiva entre os níveis de urease produzidos na fase estacionária, pH ótimo da enzima e atividade inseticida dos simbiossomas bacterianos.
- A hemolinfa dos lepidópteros *S. frugiperda* e *G. melonella*, e do hemíptero *D. peruvianus* contém um inibidor da atividade enzimática de ureases, mais ativo para urease vegetal do que para microbiana. Os níveis do inibidor na hemolinfa de *S. frugiperda* não se alteraram 24 horas após a inoculação das bactérias entomopatogênicas.
- Os dados sugerem que as ureases das bactérias dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* possuem propriedades entomotóxicas quando liberadas na hemolinfa de *S. frugiperda*, atuando sinergicamente com os demais fatores de virulência e agindo por mecanismos que independem da atividade enzimática ou da geração de peptídeos tipo pepcanatox/jaburetox 2-Ec.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAZEK, A., 2006. Infectivity prospects of both nematodes and bacterial symbionts against cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Biosduval) (Lepidoptera: Noctuidae). J Pest Sci 79, 11-15.

ADAMS, B.J., NGUYEN, K.B., 2002. Taxonomy and Systematics. In: Gaugler, R. (ed.). Entomopathogenic Nematology. New Jersey: Rutgers University, 1-28.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. Revista de Saúde Pública, 40(2): 361-363.

AKHURST, R.J., 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplanta* and *Heterorhabditis*. Journal of General Microbiology, 121: 303-309.

AKHURST, R.J., 1983. Taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes. International Journal of Systematic Bacteriology, 33: 38-45.

AKHURST, R. J., DUNPHY, G., 1993. Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes and their insect hosts. In: Beckage, N.; Thompson, S.; Federici, B. Parasites and pathogens of insects (vol 2). Academic Press, 1-23.

AKHURST, R., SMITH, K., 2002. Regulation and safety. In: Gaugler, R. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing New York, 311-332.

ALTSCHUL, S.F., LIPMAN, D.J., 1990. Protein database searches for multiple alignments. Proc Natl Acad Sci USA 87, 5509-5513.

BANTHI, M., TANEJA, A., 2007. Contamination of vegetables of different seasons with organophosphorous pesticides and related health risk assessment in northern India. *Chemosphere*, 69: 163-168.

BARCELLOS, G.B.S., ALMEIDA, L.A., MOREIRA, R.A., SOUSA-CAVADA, B., OLIVEIRA, J.T.A., CARLINI, C.R., 1993. Canatoxin-, concanavalin A-, and canavalin cross reactive materials during maturation of *Canavalia ensiformis* seeds. *Planta*, 18: 397-402.

BARJA-FIDALGO, T.C., GUIMARÃES, J.A., CARLINI, C.R., 1991 a. Lipoxygenase mediated secretory effect of canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon*, 29: 453-459.

BARJA-FIDALGO, T.C., GUIMARÃES, J.A., CARLINI, C.R., 1991 b. Canatoxin, a plant protein, induces insulin secretion from isolated pancreatic islets. *Endocrinology*, 128: 675-679.

BATHON, H., 1996. Impact of entomopathogenic nematodes on non-target hosts. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 421-434.

BECKER-RITT, A.B., MULINARI, F., VASCONCELOS, I.M., CARLINI, C.R., 2007. Antinutritional and/or toxic factors in soybean (*Glycine max* (L) merrill) seeds: comparison of different cultivars adapted to the southern region of Brazil. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 84: 263-270.

BENNETT, J., WREN, E.A., 1977. The interaction of *p*-nitrophenyl carbamate with urease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 482: 421-426.

BERTOLDO-VARGAS, L., 2008. Efeito inseticida de proteínas inativadoras de ribossomo tipo I e do jaburetox-2Ec em lepidópteros. Tese de Doutorado. PPGBCM. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BHAGAT, N., VIRDI, J.S., 2009. Molecular and biochemical characterization of urease and survival of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A in acidic pH *in-vitro*. BMC Microbiol 9, 262.

BOEMARE, N., 2002. Biology, taxonomy and systematic of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R. Entomopathogenic nematology. Rutgers University, 35-56.

BOEMARE, N., AKHURST, R.J., 2006. The genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. Springer Science+Business Media, New York.

BOEMARE, N., AKHURST, R. J., MOURANT, R. G., 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (*Enterobacteriaceae*), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen.nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 43: 249-255.

BOEMARE, N. E., LAUMOND, C., MAULEON, H., 1996. The nematode-bacterium complexes: biology, life cycle, and vertebrate safety. Biocontrol Science and Technology, 6: 333-345.

BOEMARE, N., THALER, J.O., LANOIS, A., 1997. Simple bacteriological tests for phenotypic characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* phase variants. Symbiosis 22, 167-175.

BRUCK, D.J., WALTON, V.M., 2007. Susceptibility of the filbertworm (*Cydia latiferreana*, Lepidoptera: Tortricidae) and filbert weevil (*Curculio occidentalis*, Coleoptera: Curculionidae) to entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96: 93-96.

BRUCK, D.J., EDWARDS, D.L., DONAHUE, K.M., 2008. Susceptibility of the strawberry crown moth (Lepidoptera: Sesiidae) to entomopathogenic nematodes. *Journal of Economical Entomology*, 101: 251-255.

BURNE, R.A., CHEN, Y.Y., 2000. Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and Infection*, 2: 533-542.

BURRSELL, E., 1967. The excretion of nitrogen in insects. *Adv Insect Physiol* 4, 33-67.

BURTON, R.L., PERKINS, W.D., 1972. WSB, a new laboratory diet for corn earworm Lepidoptera-Noctuidae and fall armyworm Lepidoptera-Noctuidae. *J Econ Entomol* 65, 385-&.

CAMPBELL, J., E. LEWIS, YODER, F., GAUGLER, R., 1996. Entomopathogenic nematode spatial distribution in turfgrass. *Parasitology*, 113: 473-482.

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

CARLINI, C.R., BARCELLOS, G.B.S., BAETA-NEVES, A.D.V., GUIMARÃES, J.A., 1988. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin A among proteins from leguminous seeds. *Phytochemistry*, 27: 25-30.

CARLINI, C. R., GUIMARÃES, J. A., 1981. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*, 19: 667-675.

CARLINI, C.R., GUIMARÃES, J.A., 1991. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon*, 29: 791-806.

CARLINI, C. R., GOMES, C., GUIMARÃES, J.A., MARKUS, R.P., SATO, H., TROLIN, G., 1984. Central nervous effects of the convulsivant protein canatoxin. *Acta Pharmacological et Toxicological*, 54: 161-166.

CARLINI, C.R., GUIMARÃES, J.A., RIBEIRO, J.M.C., 1985. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidences for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. *British Journal of Pharmacology*, 84: 551-560.

CARLINI, C.R., GROSSI-DE-SÁ, M. F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties: A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40: 1515-1539.

CARLINI, C.R., OLIVEIRA, A.E., AZAMBUJA, P., XAVIER-FILHO, J., WELLS, M.A., 1997. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *J Econ Entomol* 90, 340-348.

CARLINI, C.R., POLACCO, J.C., 2008. Toxic properties of urease. *Crop Sci* 48, 1665-1672.

CHAMBERS, U., BRUCK, D.J., OLSEN, J., WALTON, V.M., 2010. Control of overwintering filbertworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae with *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Economical Entomology*, 103(2): 416-422.

COCHRAN, D.G., 1985. Nitrogen excretion. Pergamon Press, Oxford.

CORTEZ, M.G.R., WAQUIL, J.M., 1997. Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento do sorgo. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 26: 407-410.

COSTA, S.C.P., GIRARD, P.A., BREHÉLIN, M., ZUMBIHL, R., 2009. The emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* is a facultative intracellular bacterium and induces apoptosis of macrophage-like cells. *Infection and Immunity*, 77(3): 1022-1030.

COX, G.M., MUKHERJEE, J., COLE, G.T., CASADEWALL, A., PERFECT, J.R., 2000. Ureases as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infection and Immunity*, 68: 443-448.

CRUZ.; I; VIANA, P.A., WAQUIL, J.M., 1998. Manejo das pragas iniciais de milho mediante o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos. EMBRAPA CNPMS, Circular Técnica 31, EMBRAPA-CNPMS: 39 p.

CRUZ, I., FIGUEIREDO, M.L.C., OLIVEIRA, A.C., VASCONCELOS, C.A., 1999. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. *Int J Pest Manage* 45, 293-296.

CRUZ, I., TURPIN, F.T., 1983. Yield impact of infestations of the fall armyworm (Lepidoptera-Noctuidae) to midwhorl growth stage of corn. J Econ Entomol 76, 1052-1054.

CRUZ, L.M., DE SOUZA, E.M., WEBER, O.B., BALDANI, J.I., DOBEREINER, J., PEDROSA, F.D., 2001. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). Appl Environ Microbiol 67, 2375-2379.

DABORN, P.J., WATERFIELD, N., SILVA, C.P., AU, C.P.Y., SHARMA, S., FFRENCH-CONSTANT, R.H., 2002. A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. Proc Natl Acad Sci USA 99, 10742-10747.

DEFFERRARI, M.S., DEMARTINI D.R., MARCELINO, T.B., PINTO, P.M., CARLINI, C.R., 2011. Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 41: 388-399.

DENNO, R.F., GRUNER, D.S., KAPLAN, I., 2008. Potential for entomopathogenic nematodes in biological control: a meta-analytical synthesis and insights from trophic cascade theory. Journal of Nematology, 40(2): 61-72.

DIXON, N.E., GAZZOLA, C., BLAKELEY, R. L., ZERNER, B., 1975. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). a metalloenzyme: A simple biological role for nickel? Journal of the American Chemical Society, 97: 4131-4133.

DOLINSKI, C., MOINO JR., 2006. A. utilização de nematóides entomopatogênicos nativos ou exóticos: o perigo das introduções. *Nematologia Brasileira*, 30(2): 139-149.

DOWLING, A.J., DABORN, P.J., WATERFIELD, N.R., WANG, P., STREULI, C.H., FFRENCH-CONSTANT, R.H., 2004. The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy (Mcf) promotes apoptosis in mammalian cells. *Cell Microbiol* 6, 345-353.

DOWLING, A.J., WATERFIELD, N.R., HARES, M.C., LE GOFF, G., STREULI, C.H., FFRENCH- CONSTANT, R.H., 2007. The Mcf1 toxin induces apoptosis via the mitochondrial pathway and apoptosis is attenuated by mutation of the BH3-like domain. *Cell Microbiol* 9, 2470-2484.

DUCHAUD, E., CHRISTOPHE RUSNIOK, C., FRANGEUL, L., BUCHRIESER C., GIVAUDAN, A., TAOURIT, S., BOCS, S., BOURSAUX-EUDE, C., CHANDLER, M., CHARLES, J.F., DASSA, E., DEROSE, R., SYLVIANE DERZELLE, S., FREYSSINET, G., SOPHIE GAUDRIAULT, S., CLAUDINE MÉDIGUE, C., ANNE LANOIS, A., POWELL, K., SIGUIER, P., VINCENT, R., WINGATE, V., ZOUINE, M., GLASER, P., BOEMARE, N., DANCHIN, A., KUNST, F., 2003. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature Biotechnology*, 21: 1307-1313.

EIDELS, L., PROIA, R.L., HART, D.A., 1983. Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiology Reviews*, 47: 596-620.

EHLERS, R.U., HOKKANEN, H.M.T., 1996. Insect biocontrol with nonendemic entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp): conclusions and recommendations of a combined OECD and COST workshop on scientific and regulatory policy issues. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 295-302.

ELEFThERIANOS, I., JOYCE, S., FFRENCH-CONSTANT, R.H., CLARKE, D.J., REYNOLDS, S.E., 2010. Probing the tri-trophic interaction between insects, nematodes and *Photorhabdus*. Parasitol 137, 1695-1706.

EMELIANOFF, V., LE BRUN, N., PAGES, S., STOCK, P., TAILLIEZ, P., MOULIA, C., SICARD, M., 2008. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Herault and Gard (Southern France). Journal of Invertebrate Pathology, 98: 211-217.

FEDER, V., 2008. Purificação e caracterização de uma urease de *Cryptococcus gattii*. Dissertação de mestrado. PPGBCM. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FELSENSTEIN, J., 1985. Confidence-limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791.

FERREIRA-DASILVA, C.T., GOMBAROVITS, M.E., MASUDA, H., OLIVEIRA, C.M., CARLINI, C.R., 2000. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. Arch Insect Biochem Physiol 44, 162-171.

FFRENCH-CONSTANT, R.H., BOWEN, D.J., 2000. Novel insecticidal toxins from nematode-symbiotic bacteria. Cell Mol Life Sci 57, 828-833.

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

FIELDHOUSE, R.J., MERRILL, A.R., 2008. Needle in the haystack: structure based toxin discovery. Trends Biochem Sci 33, 546-556.

FISHBEIN, W.N., 1969. Urease catalysis. 3. Stoichiometry, kinetics and inhibitory properties of a third substrate: dihydroxyurea. *The Journal of Biological Chemistry*, 244: 1188-1193.

FOLLMER, C., 2008. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*, 69: 18-28.

FOLLMER, C., BARCELLOS, G.B., ZINGALI, R.B., MACHADO, O.L., ALVES, E.W., BARJA-FIDALGO, C., GUIMARÃES, J.A., CARLINI, C.R., 2001. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem J* 360, 217-224.

FOLLMER, C., CARLINI, C.R., YONEAMA, M.L., DIAS, J.F., 2002. Analysis of urease isoenzymes isolated from *Canavalia ensiformis* (jackbean) seeds. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 189: 482-486.

FOLLMER, C., REAL-GUERRA, R., WASSERMAN, G.E., OLIVERA-SEVERO, D., CARLINI, C.R., 2004. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur J Biochem* 271, 1357-1363.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2002. World Agriculture 2030: Global food production will exceed population growth, Disponível em <http://www.fao.org/english/newsroom/news/2002/7828-en.html>.

FORST, S., DOWDS, B., BOEMARE, N., STACKEBRANDT, E., 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: Bugs that kill bugs. *Ann Rev Microbiol* 51, 47-72.

FRAENKEL, G., BLEWETT, M., COLES, M., 1950. The nutrition of the meal worm *Tenebrio molitor* L. *Physiological Zoology*, 23: 92-188.

FUXA, J.R., RICHTER, A.R., AGUEDO-SILVA, F., 1988. Effect of host age and nematode strain on susceptibility of *Spodoptera frugiperda* to *Steinernema feltiae*. *Journal of Nematology*, 20(1): 91-95.

GARCIA, L.C., RAETANO, C.G., LEITE, L.G., 2008. Application technology for the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *Steinernema* sp (Rhabditida : Heterorhabditidae and Steinernematidae) to control *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera : Noctuidae) in corn. *Neotrop Entomol* 37, 305-311.

GEORGIS, R., KOPPENHOFER, A. M., LACEY, L. A., BÉLAIR, G., DUNCAN, L. W., GREWAL, P. S., SAMISH, M., TAN. L., VAN TOL, R. W. H. M., 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological Control*, 38: 103-123.

GHAZALEH, F.A., FRANCISCHETTI, I.M., GOMBAROVITZ, M.E., CARLINI, C.R., 1997. Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339: 362-367.

GLAZAR, I., GALPER, S., SHARON, E., 1991. Virulence of the nematode (Steinernematidis and Heterorhabditis) bacteria (*Xenorhabdus* spp.) complex to the Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) *J Invertebr Pathol* 57, 94-100.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, M., LEZAMA-GUTIÉRREZ, R., MOLINA-OCHOA, J., REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O., LÓPEZ-EDWARDS, M., PESCADOR RUBIO, A., 2000. Susceptibility of *Mocis latipes* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae). Journal of Economical Entomology, 93(4): 1105-1108.

GATEHOUSE, J.A., 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. New phytologist, 156(2): 145-169.

GATEHOUSE, A.M.R., HILDER, V.A., GATEHOUSE, J.A., 1992. Control of insect pests by plant genetic-engineering. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B – Biological Sciences, 99: 51-60.

GERRARD, J., WATERFIELD, N., VOHRA, R., FFRENCH-CONSTANT, R., 2004. Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. Microbes and Infection. 6, 229-237.

GERRARD, J.G., JOYCE, S.A., CLARKE, D.J., FFRENCH-CONSTANT, R.H., NIMMO, G.R., LOOKE, D.F.M., FEIL, E.J.F., PEARCE, L., WATERFIELD, N.R., 2006. Nematode symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*. Emerging Infectious Diseases, 12, 1562-1564.

GREWAL, P.S., NARDO, E.B., AGUILLERA, M.M., 2001. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. Neotropical Entomology, 30: 191-205.

GREWAL, P.S., GEORGIS, R., 1998. Entomopathogenic nematodes. In: Hall, F.R.; Menn J.J. Biopesticides: use and delivery. Humana Press: 271-299.

HIRAYAMA, C., SUGIMURA, M., SHINBO, H., 1999. Recycling of urea associated with the host plant urease in the silkworm larvae, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol* 45, 15-20.

HOLM, L., SANDER, C., 1997. An evolutionary treasure: Unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Protein-Struct Funct Gen* 28, 72-82.

HYNES, H.B.N., 1942. Lepidopterous pests of maize in Trinidad. *Tropical Agriculture*, (vol 19), 10: 194-202.

IBRAHIM, M.A., GRIKO, N., MATTHEW JUNKER, M., BULLA, L.A., 2010. *Bacillus thuringiensis*: A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1): 31-50. KAYA, H. K., 1990. *In*: Gaugler, R. & Kaya, H. K. Entomopathogenic nematodes in biological control. *Soil Ecology*, 93-116. CRC Press: 350p.

KAYA, H. K., 1985. Susceptibility of early larval stages of *Pseudaletia unipuncta* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 46: 58-62.

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

KAYA, H.K., KOPPENHÖFER, A.M., 1999. Biology and ecology of insecticidal nematodes. *In*: Polavarapu, S. Optimal use of insecticidal nematodes in pest management. Rutgers University: 1-8.

KIM, Y., KIM, K., SEO, J., SHRESTHA, S., KIM, H.H., NALINI, M., YI, Y.K., 2009. Identification of an Entomopathogenic Bacterium, *Serratia* sp ANU101, and Its Hemolytic Activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 314-322.

KLOWDEN, M.J., 2007. *Physiological systems in insects*. London: Elsevier Academic Press. 688p.

KIMURA, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111-120.

KOPPENHÖFER, A.M., GREWAL, P.S., FUZY, E.M., 2007. Differences in penetration routes and establishment rates of four entomopathogenic nematode species into four white grub species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94: 184-195.

KONDO, E., ISHIBASHI, N., 1986. Nictating behavior and infectivity of entomogenous nematodes, *Steinernema* spp., to the larvae of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), on the soil surface. *Applied Entomology and Zoology*, 21: 553-560.

LABRADOR, S.J.R., 1967. *Studio de biologia y combate del gusano cogollero del maíz *Laphygma frugiperda**, 83p.

LACEY, L. A.; NEVEN, L.G., HEADRICK, H.L., FRITTS J.R., 2005. Factors affecting entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) for control of overwintering codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in fruit bins. *Journal of Economical Entomology*, 98: 1863-1869.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

LANG, A.E., SCHMIDT, G., SHEETS, J.J., AKTORIES, K., 2011. Targeting of the actin cytoskeleton by insecticidal toxins from *Photorhabdus luminescens*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 383: 227-235.

LANG, A.E., SCHMIDT, G., SCHLOSSER, A., HEY, T.D., LARRINUA, I.M., SHEETS, J.J., MANNHERZ, H.G., AKTORIES, K., 2010. *Photorhabdus luminescens* toxins ADPribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science* 327, 1139-1142.

LEE, M.M., STOCK, S.P., 2010. A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp. (gamma-Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. *J Invertebr Pathol* 104, 67-74.

LEIDERMAN, L., SAUER, H.F.G., 1953. A lagarta dos milharais. *O biologico*, 6(9): 105-113.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R., ALTORRE-ROSAS, R., BOJALIL-JABER, L. F., MOLINA-OCHOA, J., ARENAS-VARGAS, M., GONZÁLEZ-RAMÍREZ, M., REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O., 1996. Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae. *Vedalia*, 3: 35-39.

LEWIS, E.E., 2002. Behavioral ecology. In: Gaugler, R. *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, 205-224.

LI, X.Y., COWLES, R.S., COWLES, E.A., GAUGLER, R., COX-FOSTER, D.L., 2007. Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. *International Journal for Parasitology*, 37(3-4): 365-74.

LIU, J., BERRY, R.E., BLOUIN, M.S., 2001. Identification of symbiotic bacteria (*Photorhabdus* and *Xenorhabdus*) from the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis marelatus* and *Steinernema oregonense* based on 16S rDNA sequence. *J Invertebr Pathol* 77, 87-91.

MARTIN, P.A.W., FARRAR, R.R., BLACKBURN, M.B., 2009. Survival of diverse *Bacillus thuringiensis* strains in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) is correlated with urease production. *Biol Control* 51, 147-151.

MCGAUGHEY, W.H., WHALON, M.E., 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*, 258: 1451-1455.

MCGEE, D.J., MAY, C.A., GARNER, R.M., HIMPSL, J.M., MOBLEY, H.L., 1999. Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *J Bacteriol* 181, 2477-2484.

MEDEIROS, J., ROSA, J.S., TAVARES, J., SIMÕES, N., 2000. Susceptibility of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) isolated in the Azores: effect of nematode in strain and host age. *Journal of Economical Entomology*, 93: 1403-1408.

MENDES, S.M., BOREGAS, K.G.B., LOPES, M.E., WAQUIL, M.S., WAQUIL, J.M., 2011. Fall armyworm responses to genetically modified maize expressing the toxin Cry 1A(b). *Pesqui Agropecu Bras* 46, 239-244.

METCALF, C., FLINT, W.P.J., METCALF, R.L., 1962. Destructive and useful insects: their habits and control. Mc Graw – Hill: 1087p.

MICHELETTO, Y.M.S., 2010. Estudo físico-químico da interação da urease de jackbean com lipossomas miméticos de plaquetas humanas. Dissertação de mestrado. PPGQ. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MILES, C., BLETHEN, C., GAUGLER, R., 2000. Using beneficial nematodes for crop insect pest control. Farming West of the Cascades, PNW0544: 1-12.

MIRBOD, F., SCHALLER, R.A., COLE, G.T., 2002. Purification and characterization of urease isolated from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. Medical Mycology, 40: 35-44.

MIYAJI, T., KOUZUMA, Y., YAGUCHI, J., MATSUMOTO, R., KANOST, M.R., KRAMER, K.J., YONEKURA, M., 2007. Purification of a cysteine protease inhibitor from larval hemolymph of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) and functional expression of the recombinant protein. Insect Biochem Mol Biol 37, 960-968.

MOBLEY, H.L., HAUSINGER, R.P., 1989. Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization. Microbiology Reviews, 53: 85-108.

MOBLEY, H.L.T., ISLAND, M.D., HAUSINGER, R.P., 1995. Molecular biology of microbial ureases. Microbiol Rev 59, 451-480.

MOLINA, J.P.A., MOINO, A.JR., CAVALCANTI, R.S., 2004. Produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. Arquivos do Instituto Biológico, 71(3): 347-354.

MOLINA-OCHOA, J., HAMM, J.J., LEZAMA-GUTIÉRREZ, R., BOJALIL JABER, L.F., ARENAS-VARGAS, M., GONZÁLES-RAMÍREZ, M., 1996. Virulence of six entomopathogenic nematodes (*Steinernatidae* and *Heterorhabditidae*) on immature stages of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Vedalia*, 3: 25-29.

MULINARI, F., 2004. Ureases da *Canavalia ensiformis* e peptídeo inseticida derivado. Tese de doutorado. PPGBCM. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MULINARI, F., STANISCUASKI, F., BERTHOLDO-VARGAS, L.R., POSTAL, M., OLIVEIRA-NETO, O.B., RIGDEN, D.J., GROSSI-DE-SA, M.F., CARLINI, C.R., 2007. Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides* 28, 2042-2050.

MUSSER, F.R., SHELTON, A.M., 2003. Bt sweet corn and selective insecticides: Impacts on pests and predators. *Journal of Economic Entomology*, 96(1): 71-80.

NEGRISOLI, A.S., GARCIA, M.S., NEGRISOLI, C., BERNARDI, D., DA SILVA, A., 2010. Efficacy of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) and insecticide mixtures to control *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn crops. *Crop Prot* 29, 677-683.

OLIVEIRA, A.E.A., GOMES, V.M., SALES, M.P., FERNANDES, K.V.S., CARLINI, C.R., XAVIER-FILHO, J., 1999. The toxicity of of jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) Dc] canatoxin to plant pathogenic fungi. *Revista Brasileira de Biologia*, 59: 59-62.

ORTEGA, A.C., 1987. Insect pests of maize: a guide for field identification. CIMMYT: 104p.

PANT, R., KUMAR, S., 1978. 787 Is a urea cycle present in insects ? *Biochem J* 174, 341-344.

PARRA, J.R.P., 1998. Criação de insetos para estudos com patógenos. FEALQ, Piracicaba.

PARRA, J.R.P., BOTELHO, P.S.M., CORRÊA-FERREIRA, B.S., BENTO, J.M.S., 2002. Controle Biológico no Brasil. Parasitóides e Predadores. 646p.

PETERS, A., 1996. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 389-402.

PIOVESAN, A.R., 2008. Urease de *Canavalia ensiformis*: processamento diferencial por ninfas e adultos de *Dysdercus peruvianus* e formação de canal *in vitro*. Dissertação de mestrado. PPGBCM. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PIOVESAN, A.R., STANISCUASKI, F., MARCO-SALVADORI, J., REAL GUERRA, R., DEFFERRARI, M.S., CARLINI, C.R., 2008. Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease. *Insect Biochem Mol Biol* 38, 1023-1032.

PLICHTA, K.L., JOYCE, S.A., CLARKE, D., WATERFIELD, N., STOCK, S.P., 2009. *Heterorhabditis gerrardi* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): the hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (Enterobacteriaceae: gamma-Proteobacteria). *Journal of Helminthology*, 83: 309-320.

POLACCO, J.C., HOLLAND, M.A., 1993. Roles of urease in plant cells. *International Review of Cytology*, 145: 56-103.

POINAR, G.O., 1979. Nematodes for biological control of insects. CRC Press: 277p.

POINAR, G.O., 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and heterorhabditiade. In: Gaugler, R.; Kaya, H.K. Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press: 23-60.

POINAR, G.G., THOMAS, G.M., 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteraceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoplectana* sp., Steinernematidae). Parasitol 56.

POLANCZYK, R.A., ALVES, S.B., 2005. Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatogénos no controle de *Spodoptera frugiperda*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología, 74: 24-33.

RITZ, C., STREIBIG, J.C., 2005. Bioassay Analysis using R. Journal of Statistical Software, 12(5): 1-22.

ROSA, J.S., SIMÕES, N., 2004. Evaluation of twenty-eight strains of *Heterorhabditis bacteriophora* isolated in azores for biocontrol of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). Biological Control, 29: 409-417.

RUPPERT, E.E., BARNES, R.D., 1993. Invertebrate Zoology. 6d. Harcourt Brace College Publishers: 928p.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. Science 239, 487-491.

- SAITOU, N., NEI, M., 1987. The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- SALVADORI, J. R., AVILA, C. J., SILVA, M. T. B., 2004. Pragas de solo no Brasil, EMBRAPA TRIGO, 541p.
- SALVADORI, J. R., LORINI, I., PEREIRA, P.R.V.S., 2007. Insetos-praga da cultura do milho. In: Sistema de produção para milho, sob plantio direto. EMBRAPA TRIGO: 205-227.
- SHEETS, J.J., HEY, T.D., FENCIL, K.J., BURTON, S.L., NI, W.T., LANG, A.E., BENZ, R., AKTORIES, K., 2011. Insecticidal toxin complex proteins from *Xenorhabdus nematophilus*. Structure and pore formation. *J Biol Chem* 286, 22742-22749.
- SIEGEL, J., LACEY, L.A., FRITTS J.R., HIGBEE, B.S., NOBLE, P., 2004. Use of Steinernemid nematodes for post harvest control of navel orange worm (Lepidoptera: Pyralidae, *Amyelois transitella*) in fallen pistachios. *Biological Control*, 30: 410-417.
- SILVA, C.C.A., 2002. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 24: 68- 72.
- SILVA, C.P., WATERFIELD, N.R., DABORN, P.J., DEAN, P., CHILVER, T., AU, C.P.Y., SHARMA, S., POTTER, U., REYNOLDS, S.E., FFRENCH-CONSTANT, R.H., 2002. Bacterial infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. *Cell Microbiol* 4, 329-339.
- SIRKO, A., BRODZIK, R., 2000. Plant ureases: Roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, 47: 1189-1195.

SOBERÓN, M., GILL, S.S., BRAVO, A., 2009. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66: 1337-1349.

STANISCUASKI, F., BRUGGE, V.T., CARLINI, C.R., ORCHARD, I., 2009. In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox 2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *J Insect Physiol* 55, 255-263.

STANISCUASKI, F., BRUGGE, V.T., CARLINI, C.R., ORCHARD, I., 2010. Jack bean urease alters serotonin-induced effects on *Rhodnius prolixus* anterior midgut. *J Insect Physiol* 56, 1078-1086.

STANISCUASKI, F., FERREIRA-DASILVA, C.T., MULINARI, F., PIRES ALVES, M., CARLINI, C.R., 2005. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45, 753-760.

SUMIDA, M., HAGA, K., TANAKA, Y., SHIMABUKURO, J., ICHIDA, M., MATSUBARA, F., 1993. Developmental changes in urea in the hemolymph (determined by a urease-indophenol method) in hybrid strains of the silkworm *Bombyx mori*, and the effect of starvation in the 5th instar larvae, fed an artificial diet, on urea level in subsequent development. *Comp Biochem Physiology A Physiol* 105, 563-570.

SUMNER, J.B., 1926. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *Journal of Biological Chemistry*, 69: 435-441.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S., 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.

TERRA, W.R., FERREIRA, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109(B), 1-62.

THODEN, J.B., MARTI-ARBONA, R., RAUSHEL, F.M., HOLDEN, H.M., 2003. High-resolution X-ray structure of isoaspartyl dipeptidase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 42, 4874-4882.

TOJO, A., AIZAWA, K., 1983. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* δ endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 576-580.

TOMAZETTO, G., MULINARI, F., STANISÇUASKI, F., SETTEMBRINI, B., CARLINI, C.R., AYUB, M.A.Z., 2007. Expression, kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 821-827.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354.

TURLIN, E., PASCAL, G., ROUSSELLE, J.C., LENORMAND, P., NGO, S., DANCHIN, A., DERZELLE, S., 2006. Proteome analysis of the phenotypic variation process in *Photobacterium luminescens*. *Proteomics*, 6(9): 2705-2725.

VILCINSKAS, A., WEDDE, M., 2002. Insect inhibitors of metalloproteinases. *IUBMB Life* 54, 339-343.

VOSS, M., 2006. Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematóides entomopatogênicos. Documentos on line EMBRAPA TRIGO nº19.

WAQUIL, J.M., VILLELA, F.M.F., FOSTER, J.E., 2002. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (Bt) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Brasileira de Milho e Sorgo, 1: 2-11.

WASSERMANN, G.E., OLIVERA-SEVERO, D., UBERTI, A.F., CARLINI, C.R., 2010. *Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. J Cell Mol Med 14, 2025-2034.

WEATHERBURN, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal Chem 39, 971-&.

WEDDE, M., WEISE, C., NUCK, R., ALTINCICEK, B., VILCINSKAS, A., 2007. The insect metalloproteinase inhibitor gene of the lepidopteran *Galleria mellonella* encodes two distinct inhibitors. Biol Chem 388, 119-127.

WEST, R.J., VRAIN, T.C., 1997. Nematode control of black army cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory and field conditions. Canadian Entomology, 129: 229-239.

WHITE, G.F., 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. Science 66, 302-303.

WILKINSON, P., WATERFIELD, N.R., CROSSMAN, L., CORTON, C., SANCHEZ-CONTRERAS, M., ISABELLA VLISIDOU, I., BARRON, A., BIGNELL, A., CLARK, L.,

ORMOND, D., MAYHO, M., BASON, N., SMITH, F., SIMMONDS, M., CHURCHER, C., HARRIS, D., NICHOLAS R THOMPSON, N.R., QUAIL, M., PARKHILL, J., FFRENCH-CONSTANT, R.H., 2009. Comparative genomics of the emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* with the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*. BMC Genomics, 10: 302.

WILLIAMS, W.P., DAVIS, F.M., 1990. Response of corn to artificial infestation with fall armyworm and south western corn borer larvae. Southwestern Entomologist, 15: 163-166.

WISEMAN, B. R., 1999. Corn earworm. In K. L. Steffey, M. E. Rice, J. All, D. A. Andow, M. E. Gray, AND J. W. Van Duyn. Handbook of corn insects. Entomological Society of America, Lanham MD: 59- 61.

WRIGHT, K.A., 1991. Microscopic anatomy of invertebrates, vol. 4: Aschelminthes. Wilmington, DE, USA: Wiley-Liss Inc.,111-195.

YU, J.J., SMITHSON, S.L., THOMAS, P.W., KIRKLAND, T.N., COLE, G.T., 1997. Isolation and characterization of the urease gene (URE) from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. Gene, 198: 387-391.

ZERNER, B., 1991. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, Urease. Bioorganic Chemistry. 19: 116-131.

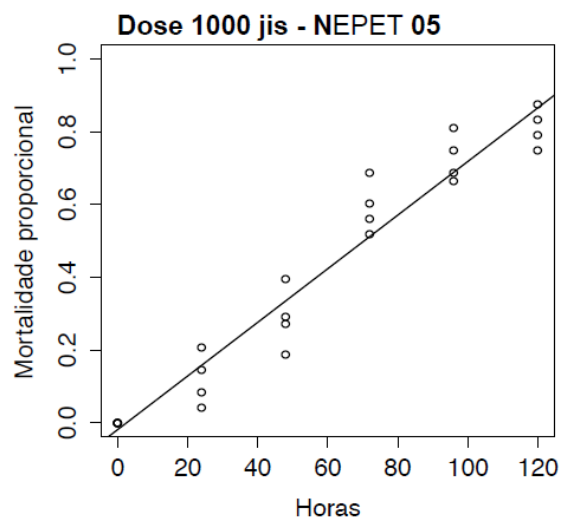
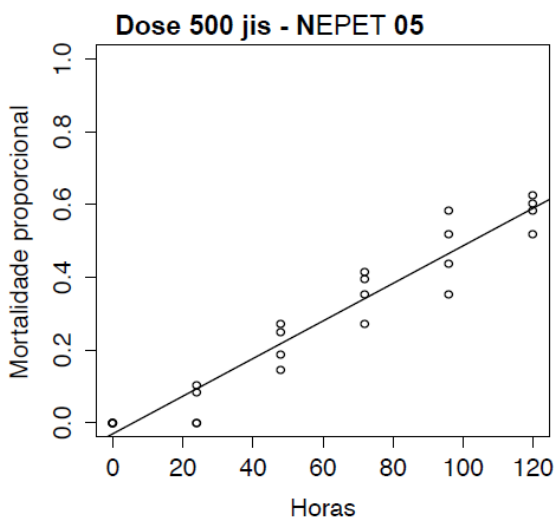
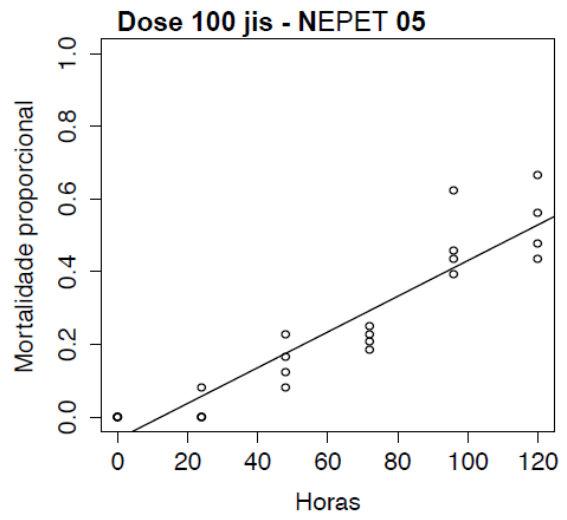
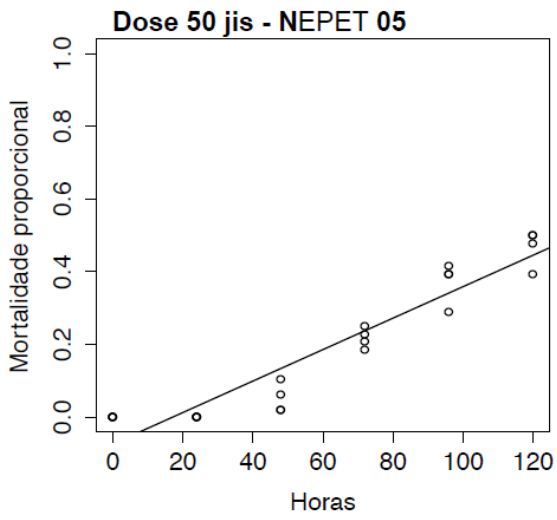
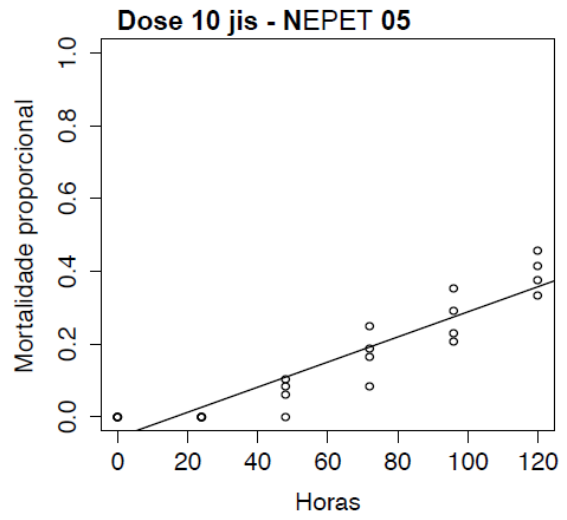
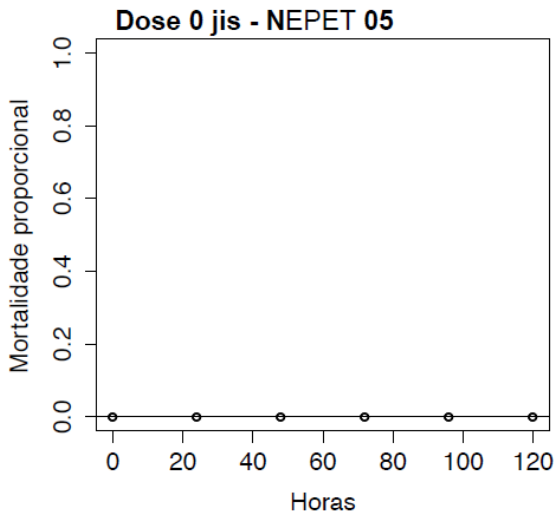
ZHEN, Z., ZHAO, P.C., HUA, W., MITA, K., JIANG, H.B., 2009. A comparative analysis of serpin genes in the silkworm genome. Genomics 93, 367-375.

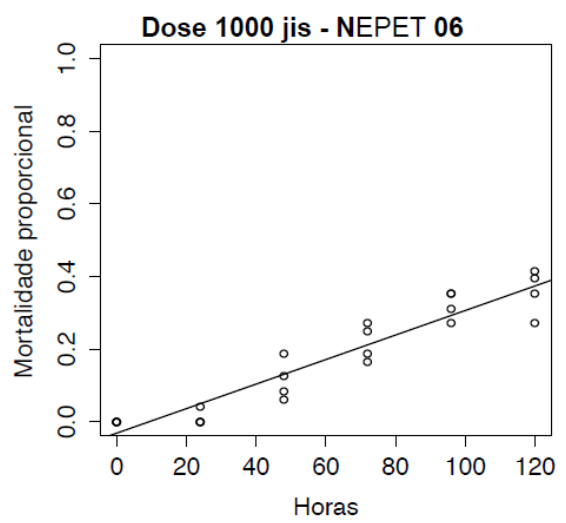
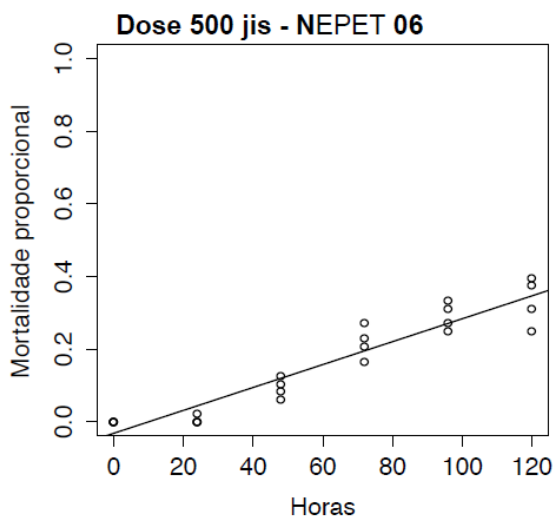
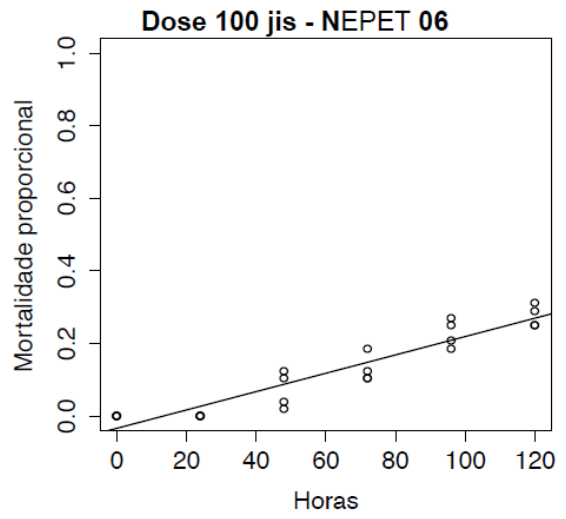
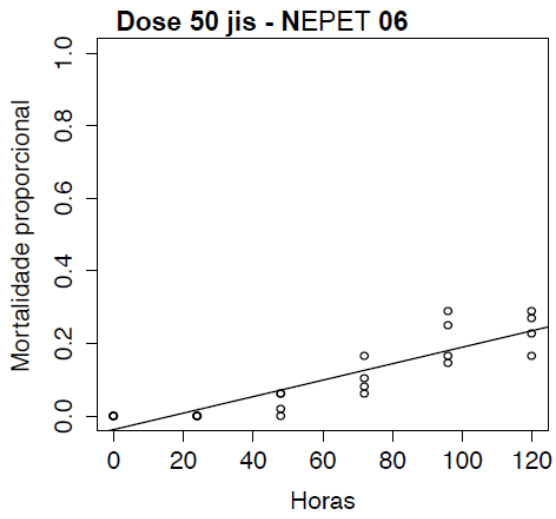
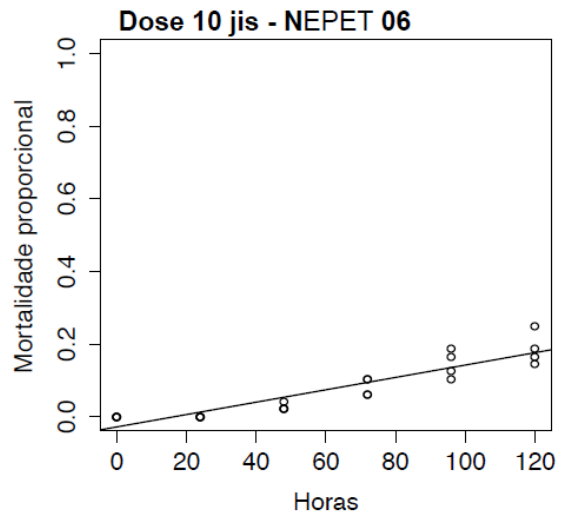
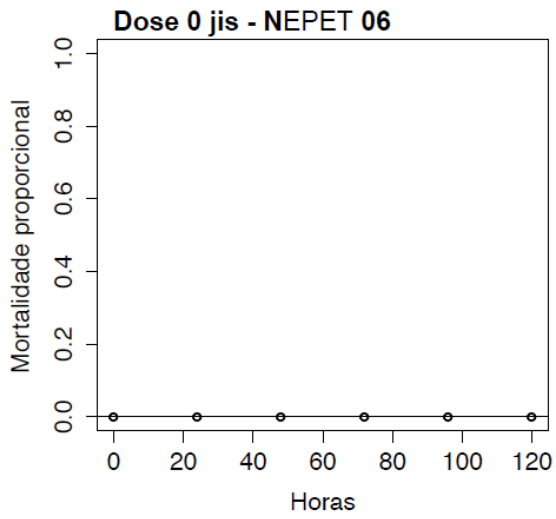
ZHU, H., GREWAL, P.S., REDING, M.E., 2011. Development of a dessicated cadaver delivery system to apply entomopathogenic nematodes for control of soil pests. *Appl Eng Agric* 27, 317-324.

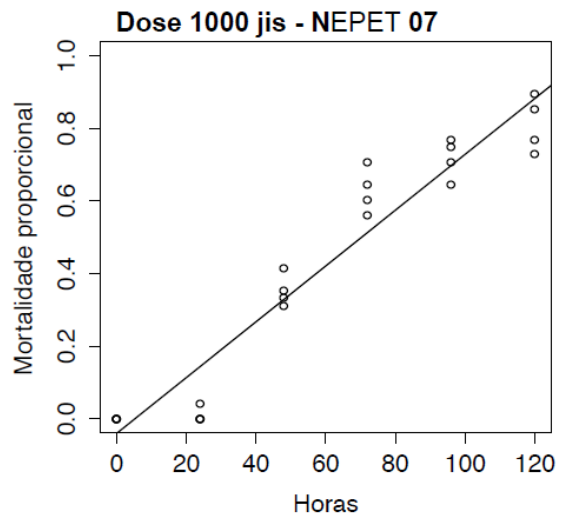
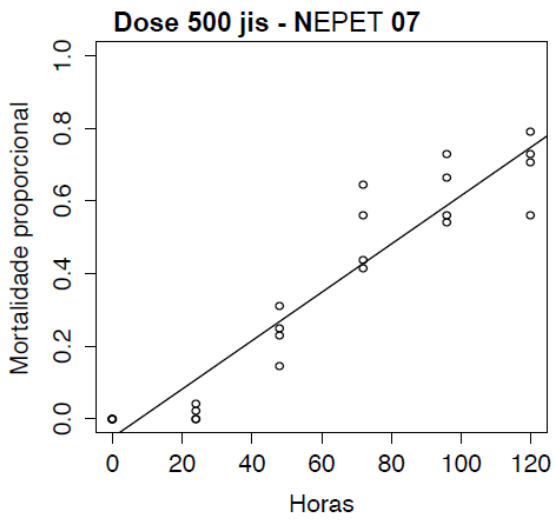
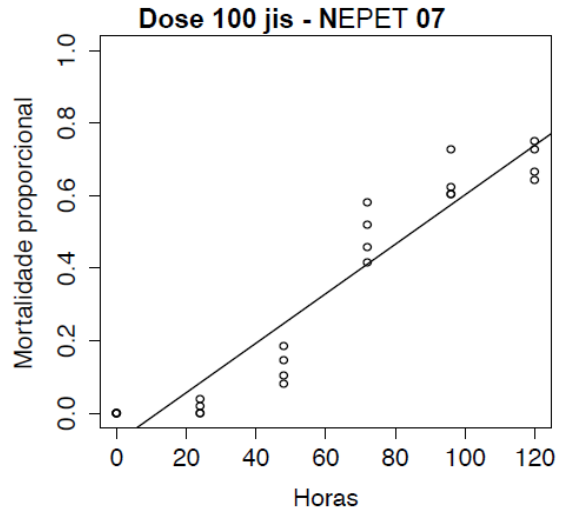
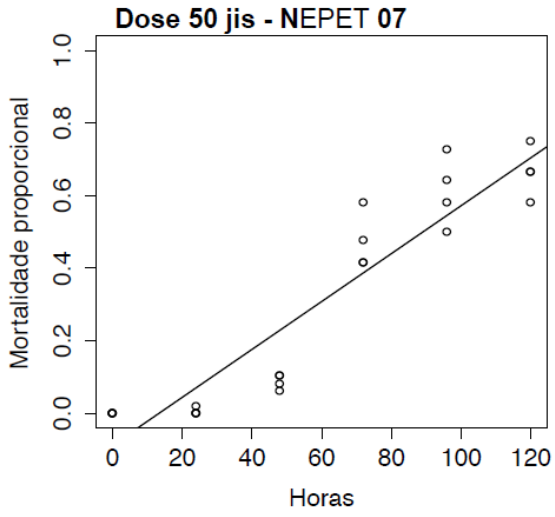
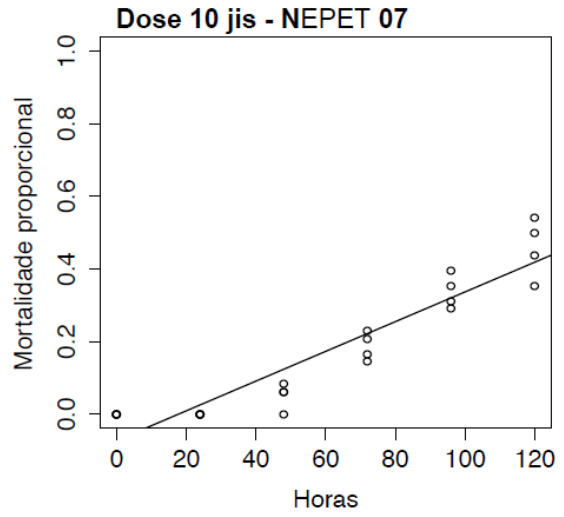
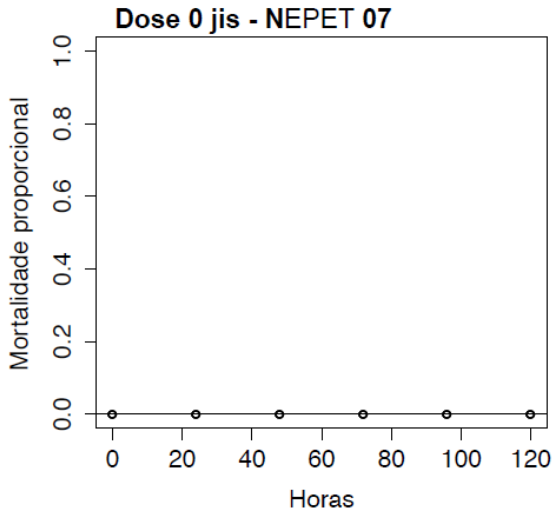
ZOU, Z., LOPEZ, D.L., KANOST, M.R., EVANS, J.D., JIANG, H.B., 2006. Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Mol Biol* 15, 603-614.

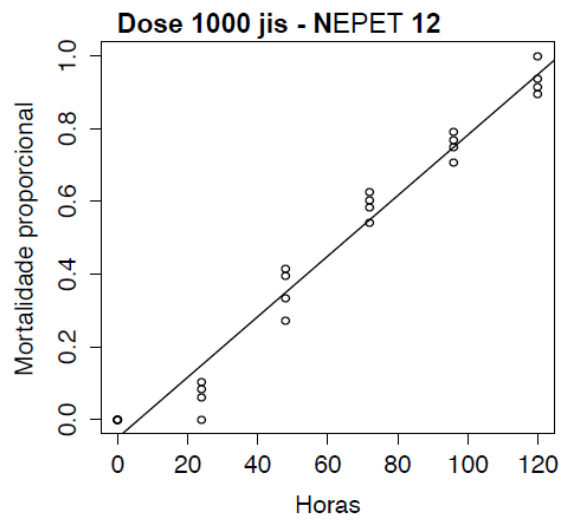
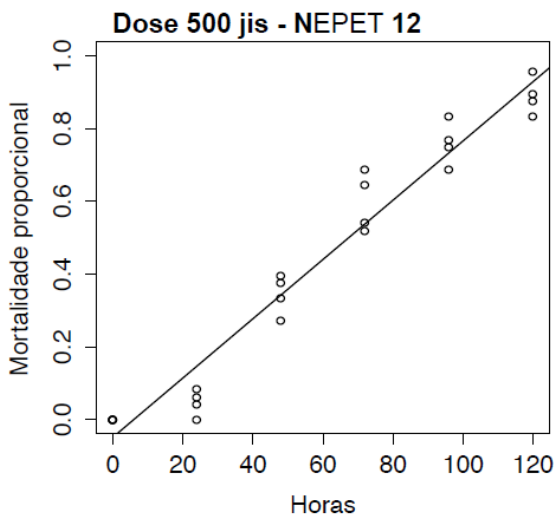
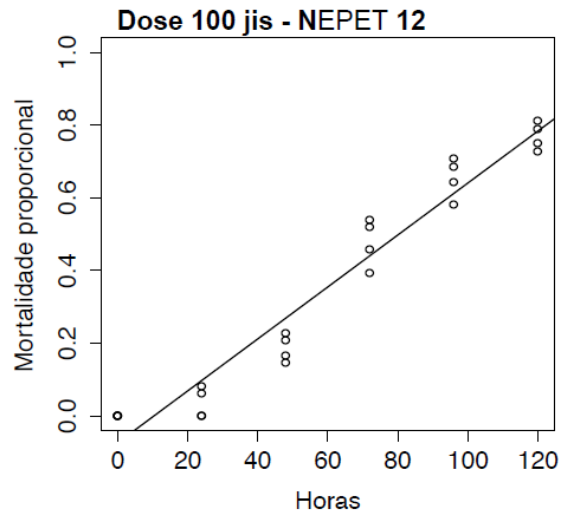
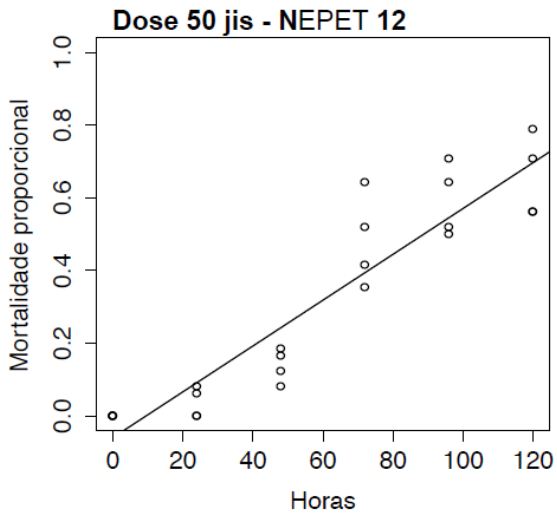
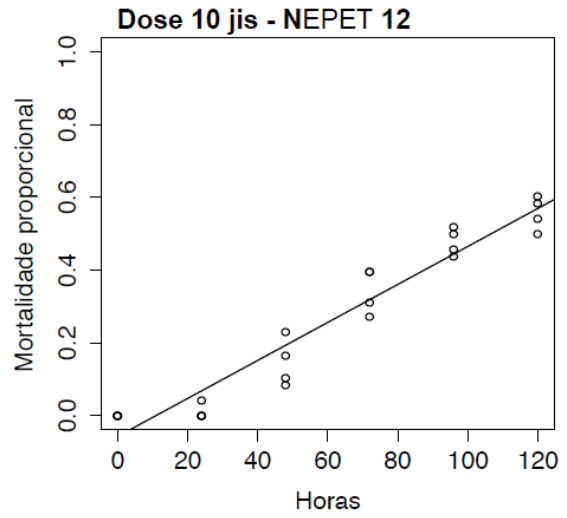
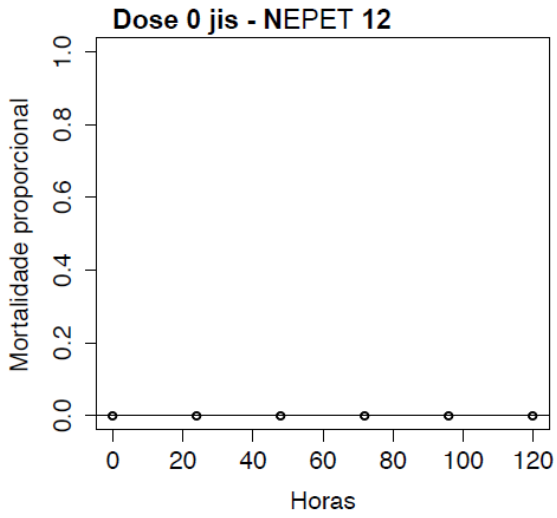
APÊNDICES

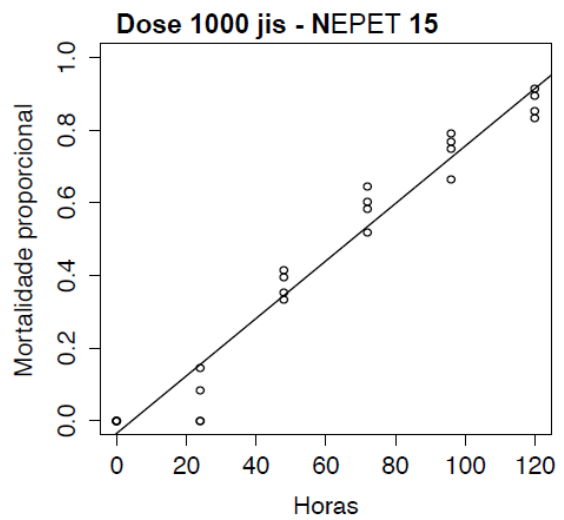
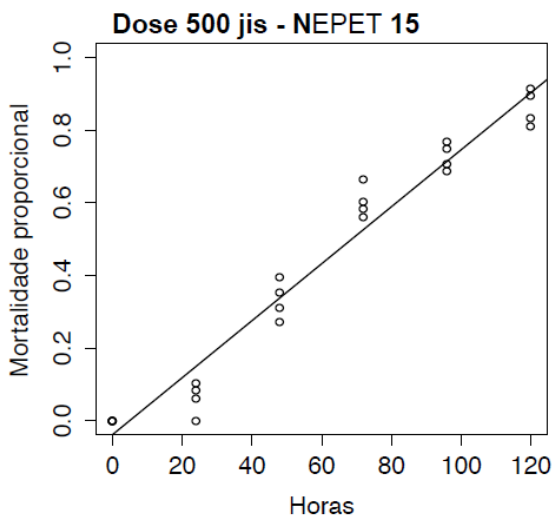
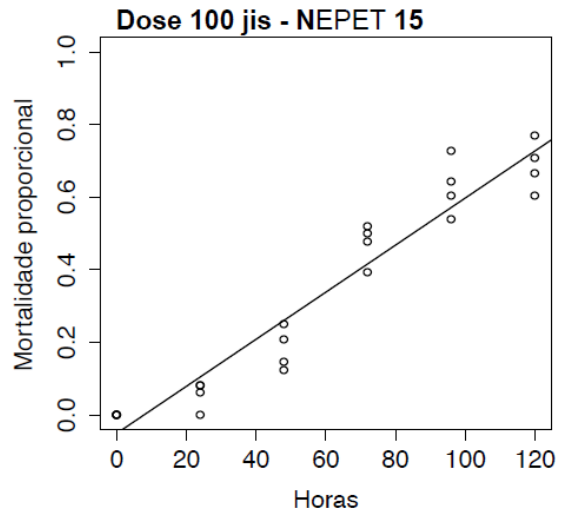
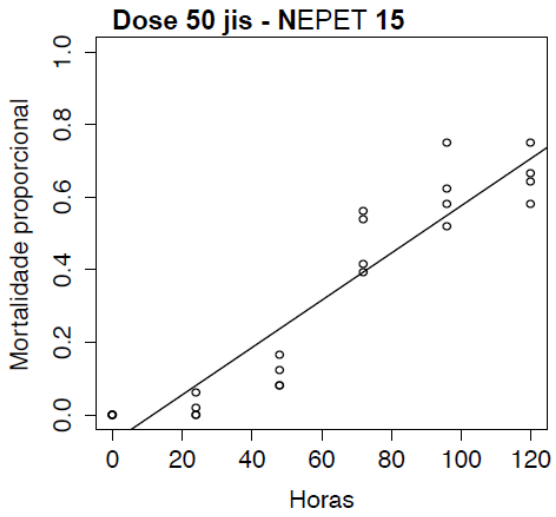
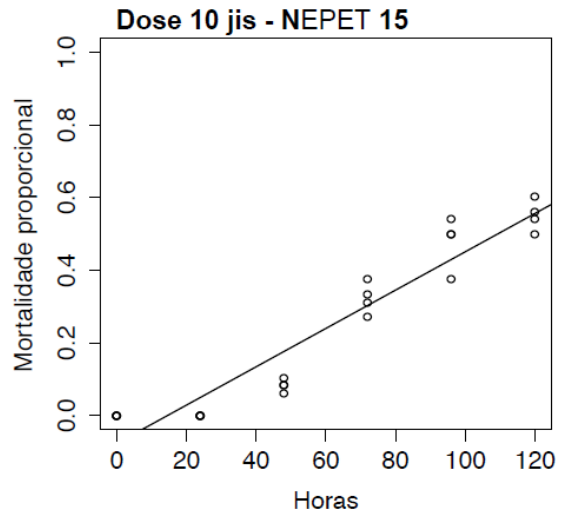
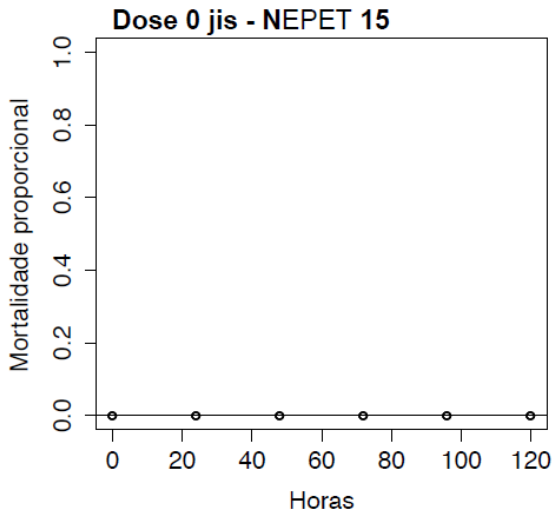
I. Virulência dos nematóides entomopatogênicos (NEPETs) para lagartas de último instar de *S. frugiperda* - Regressão linear da mortalidade proporcional e dose para cada tempo

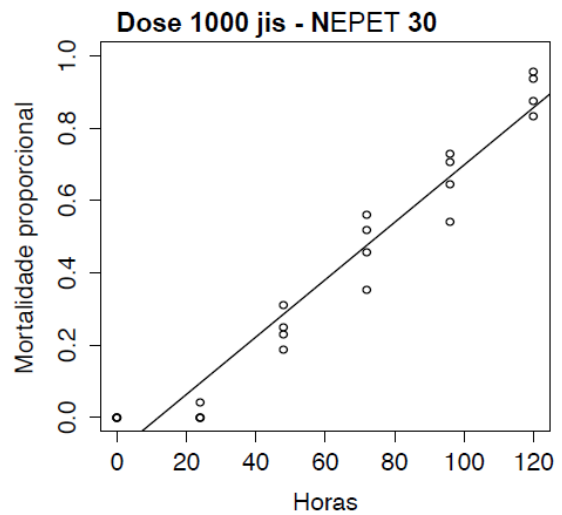
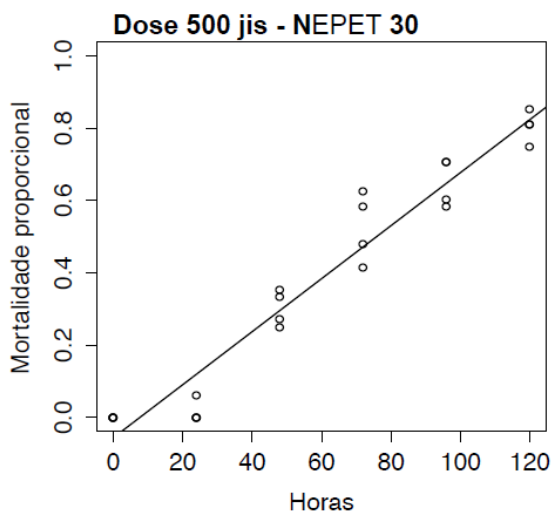
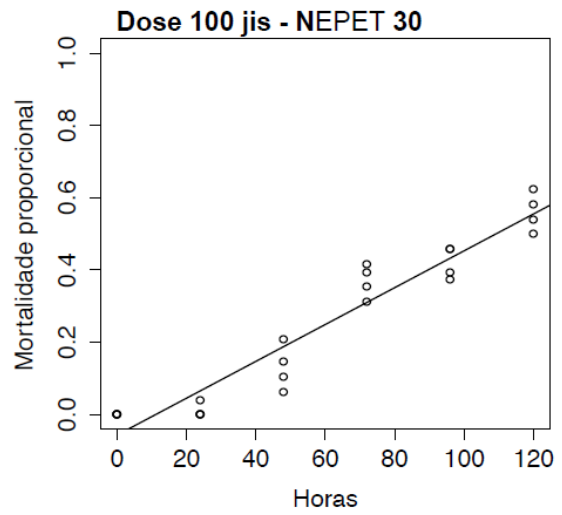
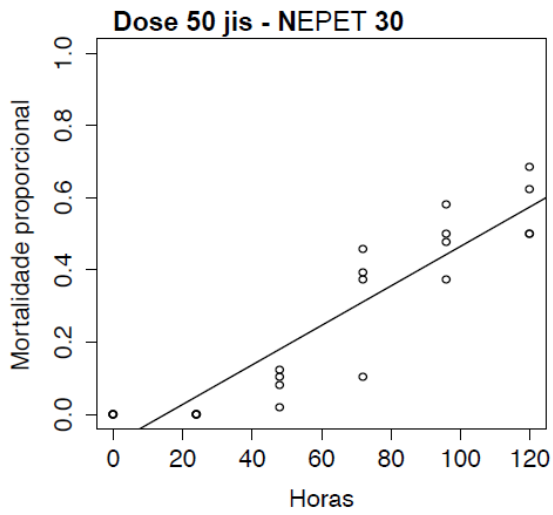
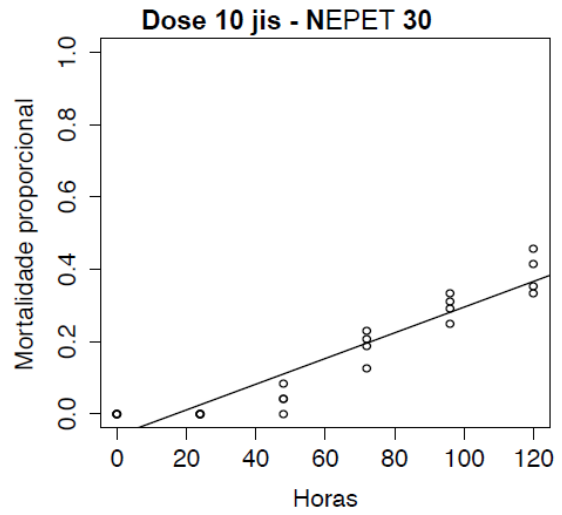
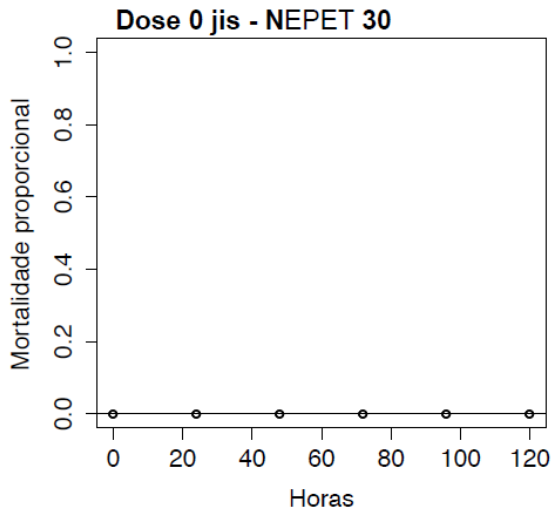


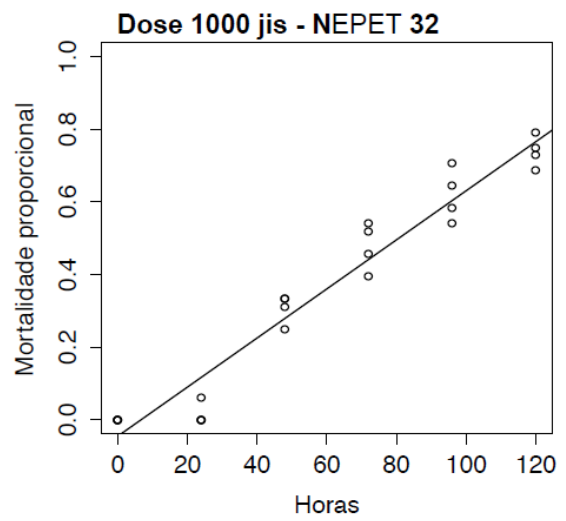
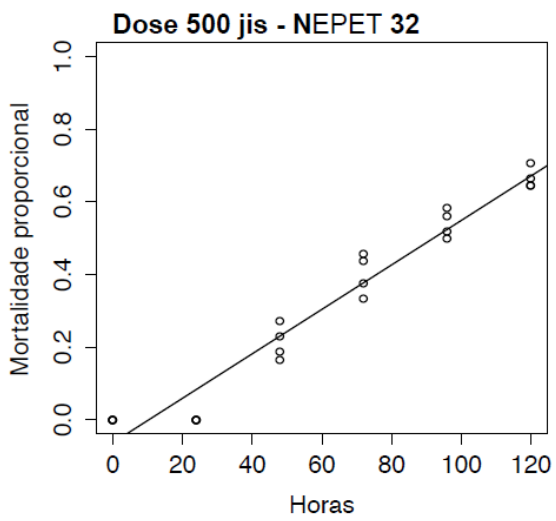
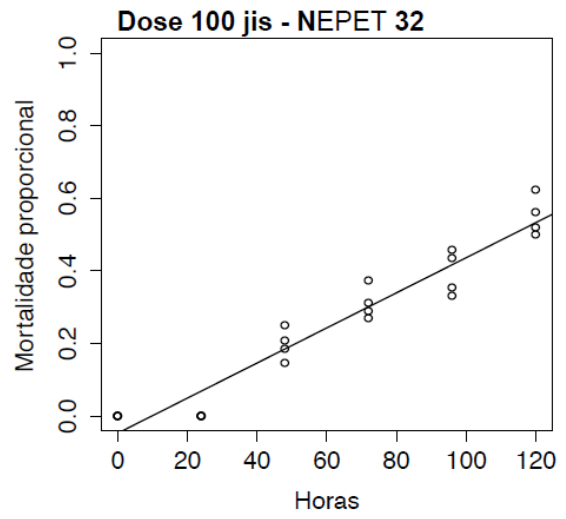
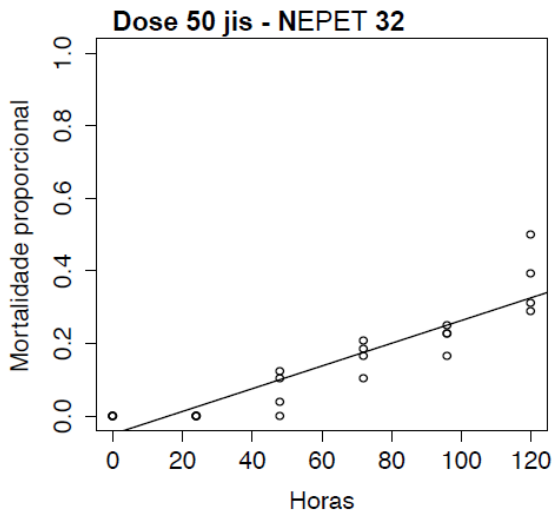
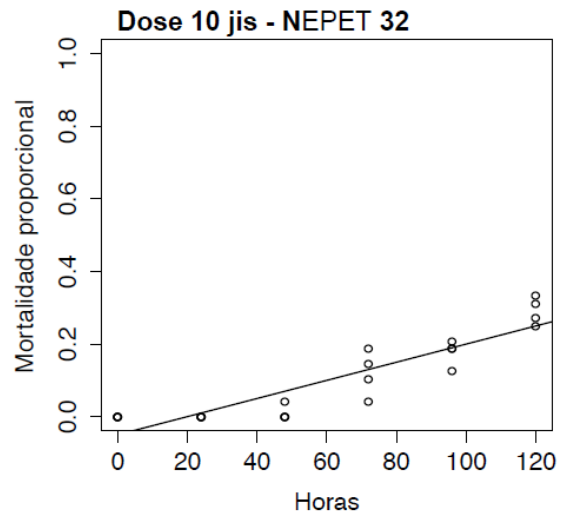
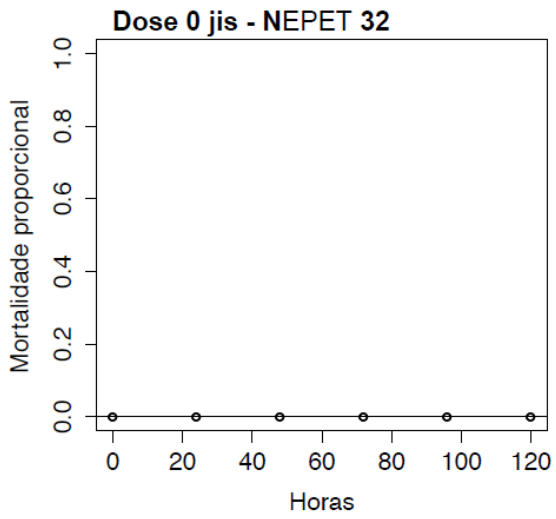


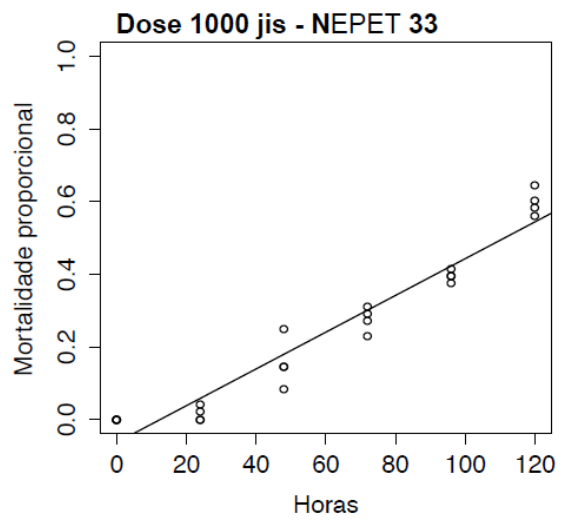
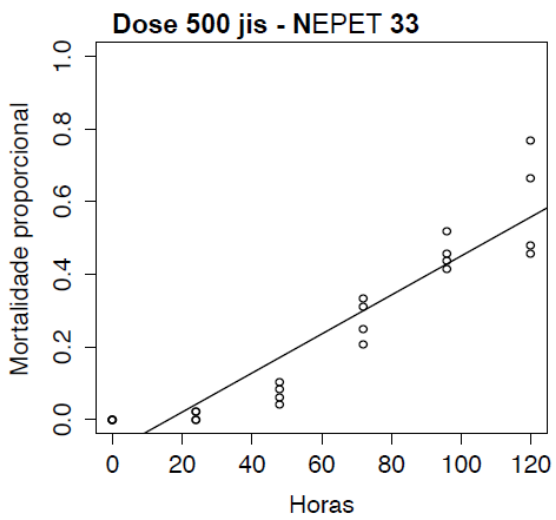
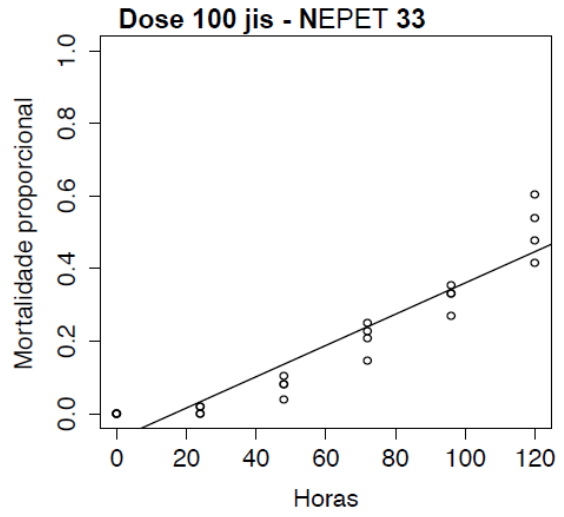
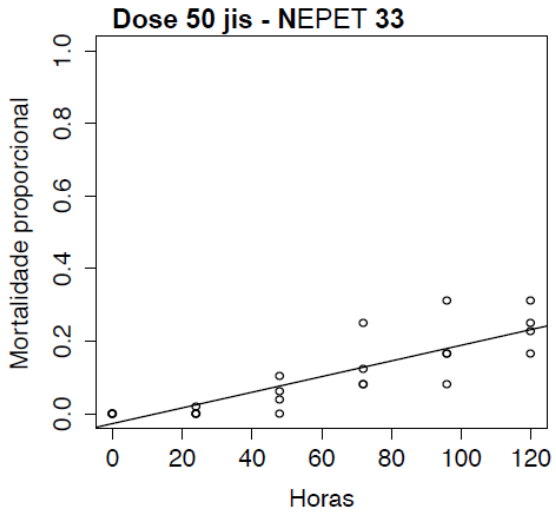
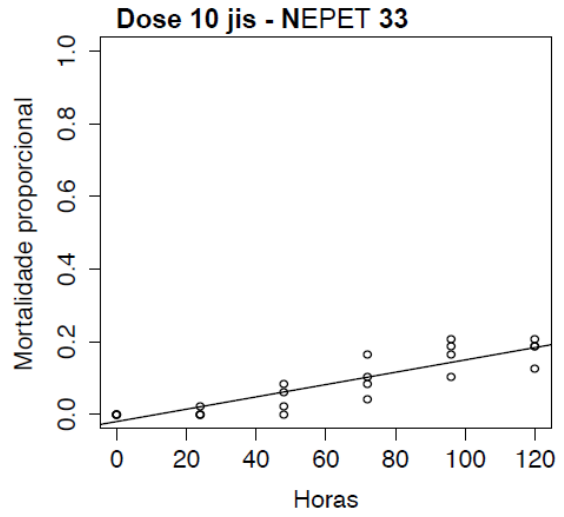
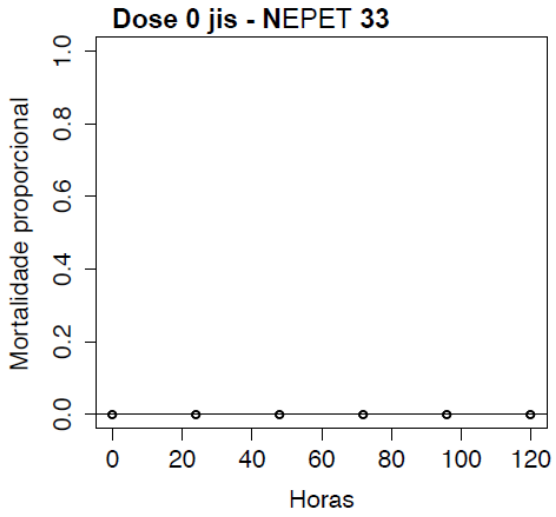












II. Submissão do manuscrito para o periódico *Biological Control*

Elsevier Editorial System(tm) for Biological Control
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect

Article Type: Regular Article

Keywords: *Photorhabdus*;
Xenorhabdus;
insecticidal activity;
virulence factor;
urease;
hemolymph

Corresponding Author: Dr. Celia Regina Carlini, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Juliana Marco-Salvadori, M.Sc.

Order of Authors: Juliana Marco-Salvadori, M.Sc.; Marina S Defferrari, M.Sc.; Rodrigo Ligabue-Braun, M.Sc.; Elene Y Lau, Ph.D.; José Roberto Salvadori, Ph.D.; Celia Regina Carlini, Ph.D.



CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
LABORATÓRIO DE PROTEÍNAS TÓXICAS
LAPROTOX



September 30th, 2011.

Dear Editor

We are submitting for publication in *Biological Control* a manuscript entitled "Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect" by Juliana de Marco-Salvadori, Marina Schumacher Defferrari, Rodrigo Ligabue-Braun, Elene Yamazaki Lau, José Roberto Salvadori, and myself - Celia R. Carlini (corresponding author).

All co-authors have agreed upon the content and form of the manuscript, which is not being submitted, entire or parts of it, to any other journal.

We declare no conflict of interest related to the data in this work.

We hope our manuscript fulfills the requirements for publication in *Biological Control*.

Sincerely yours

Célia R. Carlini



CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
LABORATÓRIO DE PROTEÍNAS TÓXICAS
LAPROTOX



July 18th, 2012.

Dear Editor
Dr. Edwin E. Lewis

Ref: BIOCON-11-353R1

Our manuscript "Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect" by Juliana de Marco Salvadori, and co-author, has been revised/corrected according to all your remarks (text in red).

All co-authors have agreed upon the content and form of the manuscript, which is not being submitted, entire or parts of it, to any other journal.

We declare no conflict of interest related to the data in this work.

We hope our manuscript fulfills the requirements for publication in *Biological Control*.

Sincerely yours

Célia R. Carlini

III. Aceite do manuscrito no periódico *Biological Control*

----- Mensagem original -----

Assunto: BCON-11-353R2 - Final Decision

Data: 13-08-2012 20:59

Remetente: "BIO-CON (ELS)" <biocon@elsevier.com>

Para: ccarlini@ufrgs.br

Ms. No.: BCON-11-353R2

Title: Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect

Corresponding Author: Dr. Celia Regina Carlini

Authors: Juliana Marco-Salvadori, M.Sc.; Marina S

Defferrari, M.Sc.; Rodrigo Ligabue-Braun, M.Sc.; Elene Y

Lau, Ph.D.; José Roberto Salvadori, Ph.D.;

Dear Dr. Carlini,

I am pleased to inform you that your manuscript referenced above has been accepted for publication in *Biological Control*.

Many thanks for submitting your fine paper to *Biological Control*. I look forward to receiving additional papers from you in the future.

With kind regards,

Edwin E. Lewis

Editor

Biological Control

E-mail: bio-con@elsevier.com

***CURRICULUM VITAE* resumido**

DADOS PESSOAIS

Nome completo: Juliana De Marco Salvadori

Local e data de nascimento: Passo Fundo, 20 de Setembro de 1979

Endereço profissional:

- Prefeitura Municipal de Passo Fundo - Secretaria Saúde
Núcleo de Vigilância Epidemiológica
Rua Silva Jardim 727 / F. 3046-0087 / Passo Fundo

- Faculdade meridional IMED
Escola de Odontologia
Rua Senador Pinheiro, 304 / F. 3045-6100 / Passo Fundo

Email: julianasalvadori@yahoo.com.br

FORMAÇÃO

Pós-graduação: (2006-2011) Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS. Porto Alegre, RS

Orientador: Célia Regina R. da Silva Carlini, Ph.D.

(2004-2006) Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS. Porto Alegre, RS. Bolsista CAPES.

Orientador: Célia Regina R. da Silva Carlini, Ph.D.

Graduação: (1997-2001) Farmacêutico Bioquímico - UPF.
Passo Fundo, RS.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Prefeitura Municipal de Passo Fundo, Passo Fundo

Vínculo: Servidor Público.

Enquadramento funcional: Farmacêutico Bioquímico.

Período: 2007-Atual.

Área de atuação: Assistência Farmacêutica, Vigilância Epidemiológica e Vigilância Sanitária.

IMED Faculdade Meridional, Passo Fundo

Vínculo: Colaborador.

Enquadramento funcional: Professor.

Período: 2012-atual.

Área de atuação: Farmacologia.

Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo

Vínculo: Preceptor acadêmico PET-Saúde / Vigilância em Saúde.

Enquadramento funcional: Colaborador.

Período: 2010-2012.

Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo

Vínculo: Professor visitante.

Enquadramento funcional: Professor convidado.

Período: 2008.

Área de atuação: Especialização em Saúde Coletiva / Módulo: Epidemiologia e Estatística.

Farmácia Agafarma, Capão Novo

Vínculo: Celetista formal.

Enquadramento funcional: Farmacêutico.

Período: 2003.

Área de atuação: Responsável técnico.

Farmácia Medicare, Passo Fundo

Vínculo: Celetista formal, Enquadramento funcional: Farmacêutico.

Período: 2002.

Área de atuação: Responsável técnico.

PRÊMIOS E TÍTULOS

Destaque - Mostra de Pós-Graduação da Embrapa Trigo. 2008.

Título: Mecanismos de ação da urease de *Canavalia ensiformis*: descrição dos efeitos biológicos e identificação de receptores para a toxina proteica em pentatomídeos fitófagos.

ARTIGO COMPLETO PUBLICADO EM PERIÓDICO

PIOVESAN A.R. ; STANISÇUASKI F. ; MARCO-SALVADORI, J. ; GUERRA, R. R. ; DEFFERRARI, M. ; CARLINI C.R. Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: Role in the Release of Entomotoxic Peptides from *Canavalia ensiformis* Urease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, p. 1023-1032, 2008.

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

SALVADORI, J.D.M.; DEFFERRARI, M.; Ligabue-Braun, R.; LAU, E.Y.; SALVADORI, J.R.; CARLINI C.R. Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect. *Biological control*, 2012.