

Nematodes Entomopatogénicos: Uso e novas perspectivas

J.M. Neves¹, N. Simões¹ & M. Mota²

¹Departamento de Biologia e
Centro de Investigação em Recursos Naturais
Universidade dos Açores
9501 - 801 Ponta Delgada

²Departamento de Engenharia Biológica
Universidade do Minho
4709 Braga Codex

1. Introdução

Os nemátodes dos géneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são patógenos de insectos. Estes nemátodes formam uma simbiose obrigatória com duas Enterobacteriaceae, *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* associadas respectivamente a cada um dos nemátodes referidos. Este complexo só se desenvolve no interior de insectos e as bactérias não têm vida indepen-

dente do nemátode (ver caixa 1).

Desde os anos 30 que estes nemátodes entomopatogénicos (NEPs) têm sido utilizados em controlo de pragas agrícolas (ver caixa 2). São várias as características que fazem dos NEPs agentes de controlo biológico (BCAs) de grande interesse: têm um largo espectro, procuram activamente o hospedeiro, apresentam uma elevada virulência e têm altas taxas de reprodução. Em

Caixa 1

Os nemátodes são vermes cilíndricos, não segmentados e sem apêndices (Fig. 1). Podem ter vida livre, ser predadores ou parasitas. Muitas das espécies parasitas podem causar doença em plantas, animais e humanos. No entanto, outras espécies há que são benéficas na medida em que parasitam insectos-praga de culturas. De entre eles, destacam-se os nemátodes entomopatogénicos dos géneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*. Estes nemátodes são englobados no grupo dos patógenos tal como as bactérias, os fungos e os vírus, talvez por estarem associados simbioticamente com uma Enterobacteriaceae, dos géneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, que os estados infectantes (IJs) do nemátode transportam num divertículo do intestino. Estes IJs localizam o hospedeiro pela detecção de produtos de excreção dos insectos, níveis de CO₂ e gradientes de temperatura e iniciam a infecção penetrando o insecto pelas cavidades naturais (boca, espiráculos e ânus) e invadem a cavidade geral onde libertam a bactéria simbiote causando a morte do insecto por septicémia no espaço de 24-48 h. Os nemátodes alimentam-se dos tecidos do hospedeiro e células da bactéria simbiote, desenvolvem-se até atingirem o estado adulto, acasalam e reproduzem-se no interior do insecto. Quando os nutrientes escasseiam dá-se o aparecimento de novos estados infectantes que abandonam o cadáver do insecto, procuram e infectam novo hospedeiro.

termos de segurança, estes complexos são considerados ambientalmente seguros e não tóxicos para mamíferos estando, por isso, isentos de registo e regulamentação nomeadamente na maioria dos países da União Europeia e nos Estados Unidos (veja-se Ehlers e Hokkanen, 1996 em Recomendações da OCDE) o que simplifica consideravelmente a sua utilização e o desenvolvimento e comercialização de novas formulações. A partir dos anos 90 e com o crescente interesse pelas plantas transgénicas resistentes a insectos, estes patógenos começaram a ser investigados para identificação de genes insecticidas.

O presente texto detalha aspectos ligados à utilização destes nemátodes enquanto BCAs e enquanto fonte de genes insecticidas. Numa perspectiva de BCAs tem-se feito um especial esforço i) na selecção de novos *patovars* e no melhoramento genético de isolados com maior potencial; ii) na compreensão das condições ecológicas de aplicação de modo a favorecer a sobrevivência do patógeno e a infecção e iii) na produção em massa. No que se refere à sua exploração enquanto fonte de genes insecticidas tem-se dado particular atenção aos factores de virulência da bactéria simbiote.

2. Selecção e Melhoramento

Numa perspectiva de utilização em controlo de insectos, as características do complexo que têm sido consideradas como mais relevantes no complexo nemátode-bactéria dizem respeito i) à virulência do estado infectante (IJ), ii) ao espectro de hospedeiros, iii) à tolerância às condições ambientes e

Caixa 2

O primeiro relato da utilização de nemátodes entomopatogénicos no controlo de insectos data dos anos 30 e foi feito contra o escaravelho japonês, *Popillia japonica* na costa Leste dos EUA. A partir dos anos 70 têm sido inúmeras as aplicações de *Steinernema* e de *Heterorhabditis* com sucesso contra lepidópteros, coleópteros e dípteros, pragas de plantas. Também se têm feito aplicações contra insectos com importância em saúde pública, nomeadamente mosquitos vectores, piolhos em humanos, carraças em animais e térmitas e baratas em ambientes domésticos.

Os melhores resultados têm sido obtidos em insectos do solo e em insectos em galerias aonde os nemátodes se podem deslocar e alcançar a praga, superando mesmo o uso de pesticidas. A aplicação em ambientes controlados, como são as estufas, conduz a resultados comparáveis aos obtidos com pesticidas. Outra das áreas de grande interesse são as plantas em viveiro aonde a aplicação se tem considerado de grande sucesso. As aplicações contra insectos que vivem nas folhas tem tido menor sucesso, devido à susceptibilidade do estado infectante a radiações e à dessecação. Embora alguns ensaios tenham mostrado que o uso de aditivos protectores podem aumentar a eficácia do nemátode a sua utilização é ainda muito limitada.

Nos Açores estes BCAs têm sido experimentados com sucesso em pequenos ensaios de controlo do escaravelho japonês, *Popillia japonica* (Fig. 2) e em laboratório contra a lagarta das pastagens, *Mythimna unipuncta* (Fig. 3).

se que terá de passar pelo melhoramento genético. Mostrou-se que os valores de hereditariedade de caracteres como a capacidade de procurar o hospedeiro e a tolerância a UV eram elevados em *H. bacteriophora*, o que deixa admitir que a aplicação de cruzamentos selectivos seria uma metodologia apropriada à selecção destes caracteres (Glazer et al., 1991). Foi aplicando esta metodologia em *S. carpocapsae* que se fez o melhoramento da capacidade de procura do hospedeiro e da eficácia do parasitismo (Gaugler & Campbell, 1991; Tomalak, 1994). No entanto, os resultados obtidos em laboratório não foram confirmados no campo, necessitando-se, por isso, de um conhecimento mais aprofundado dos mecanismos de transmissão. Uma via alternativa parece ser o melhoramento por engenharia genética que tem sido aplicada, com sucesso, a organismos muito próximos destes, nomeadamente a *Cenorhabditis elegans* e *Escherichia coli*. Porém, para desenvolver um projecto de engenharia genética é necessário conhecer alguns dos

iv) à sobrevivência fora do hospedeiro.

A variabilidade encontrada em novos isolados é grande e tem permitido a selecção de isolados naturais com características fenotípicas cada vez mais adequadas às condições específicas de cada aplicação. Em especial, a recolha e selecção de isolados de maior virulência tem motivado um particular interesse nos investigadores e utilizadores destes BCAs sendo, actualmente, o aspecto determinante em toda a utilização de NEPs. Embora determinante numa perspectiva de aplicação inoculativa a persistência do IJ, fora do hospedeiro, não tem merecido particular atenção. Há, porém, isolados naturais cujos IJs apresentam uma capacidade de sobrevivência no solo muito grande.

Apesar da variabilidade natural existente, a obtenção dos BCAs mais adequados aos fins desejados pensa-



Figura 1. Estado infectante de *Steinernema carpocapsae*. Em detalhe a vesícula (v) aonde é transportada a bactéria simbiote.



Figura 2. Aplicação de NEPs em microparcelas contra o escaravelho japonês na Ilha Terceira (Açores).

mecanismos nomeadamente o da virulência, que só recentemente começam a ser identificados.

Salvo a penetração do complexo no hemocélio do hospedeiro em que se admite apenas a participação do estado infeccioso do nemátode, todas as outras etapas do processo patogénico devem ter a participação de ambos os agentes. Na realidade, ambos os agentes secretam inúmeras enzimas e outras proteínas com actividade tóxica e com actividade depressora do sistema de defesa do insecto. Sejam quais forem os mecanismos, é um facto que na virulência deste complexo deve participar um número relativamente importante de genes, o que dificulta particularmente a definição de estratégias de melhoramento genético.

Desde há anos que o nosso laboratório tem vindo a desenvolver investigação no melhoramento do complexo *Heterorhabditis bacteriophora-Photorhabdus luminescens*. Essa investigação, tem por objectivo a construção de um novo complexo nemátode-bactéria transformada. Para tal, tem-se feito por um lado, o cruzamento de linhas homozigóticas de *H. bacteriophora* obtidas a partir da selecção de dois isolados naturais distintos, um de grande virulência e outro de grande capacidade de sobrevivência, por

outro lado, procede-se à modificação da bactéria simbiote pela super-expressão de uma protease envolvida no processo patogénico.

3. Condições Ecológicas de Aplicação

Como se verifica com todos os BCAs o sucesso das aplicações está ligado às condições ambientais em que se fazem. Os nemátodes são particularmente sensíveis à falta de humidade e são inactivos a baixas temperaturas. Para aplicações contra insectos que se desenvolvem em

ambientes frios tem-se pesquisado estirpes activas a baixas temperaturas enquanto que, contra insectos activos a temperaturas elevadas mas com baixa humidade, se tem recorrido às aplicações suplementares de água e/ou às aplicações das IJs directamente através dos sistemas de irrigação.

4. Produção em Massa

Nos últimos anos, foram conseguidos avanços significativos no que respeita à produção à escala comercial destes nemátodes de tal forma que actualmente, já são competitivos com os insecticidas químicos no controlo de pragas em culturas de médio e alto valor acrescentado na base custo/benefício e facilidade de aplicação. O alargamento da sua utilização a sistemas agrícolas sustentados, à agricultura biológica ou aos sistemas de controlo integrado está, contudo, dependente dos avanços tecnológicos capazes de os produzir à escala industrial e a custos de produção que não constituam um factor limitante.

São três os sistemas que correntemente se usam na produção em massa de nemátodes entomopatogénicos: produção *in vivo*, produção *in vitro* em substrato

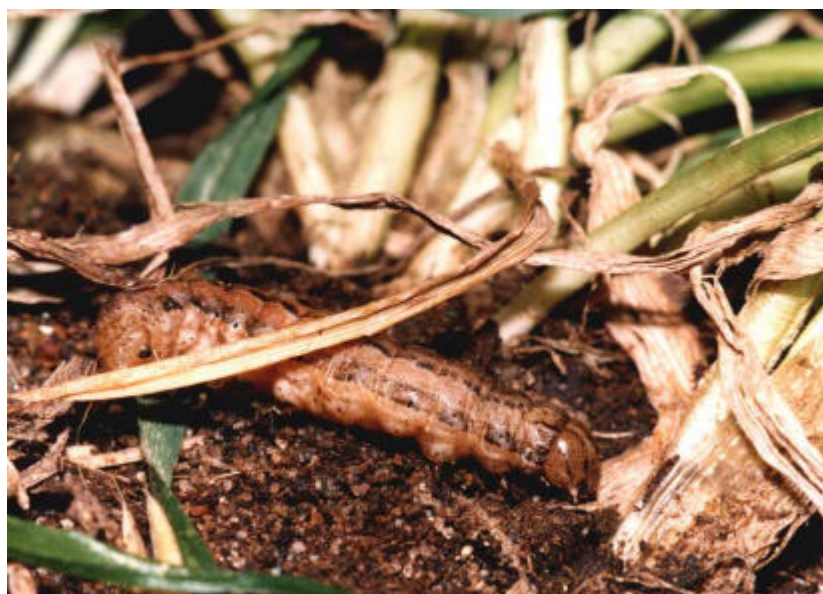


Figura 3. Larva da lagarta das pastagens, *Mythimna unipuncta*, susceptível a NEPs.



Figura 4. Produção *in vivo* de *Steinernema carpocapsae*. Saída dos estados infectantes do cadáver do hospedeiro.

sólido e produção *in vitro* em cultura líquida.

Produção *in vivo*

A primeira técnica realmente operacional de produção em massa de *S. carpocapsae* nasceu nos Estados Unidos (Dutky, 1964) e baseia-se no parasitismo de um insecto, *Galleria mellonella*, pelo nemátode (Fig. 4). É uma técnica simples mas cujo o custo de produção é elevado e não permite uma economia de escala. De facto, a duplicação da capacidade de produção requer a duplicação da área e a duplicação do capital. Acresce que, se o processo não for automatizado o custo da mão de obra aumenta linearmente uma vez que o processo exige muita mão de obra. Para além disso, requer a multiplicação, em paralelo, dum insecto hospedeiro que, por sua vez, também não permite uma economia de escala. Tão importante como os aspectos referidos, é o facto de não haver uma economia de qualidade na ampliação da escala. Antes pelo contrário. À medida que a escala aumenta, a produção de nemátodes é cada vez mais sensível aos surtos epidémicos tão característicos das práticas culturais intensas.

Produção *in vitro* em suporte sólido

Face às limitações acima referidas muitas tentativas foram feitas para produzir *in vitro* e em massa *Steinernema* e *Heterorhabditis* (House et al., 1981; Bedding, 1981). De todos os métodos desenvolvidos, o método Bedding mostrou ser o de maior sucesso (Friedman, 1990) tendo sido com este método que se iniciou a exploração comercial dos nemátodes com potencial de controlo biológico. Usando pedaços de um suporte inorgânico, esponja de

poliuretano, embebidos num homogenato de tecidos animais e óleo ou banha como substrato, Bedding, introduziu a tridimensionalidade aumentando a razão área de superfície/volume para a reprodução e desenvolvimento do complexo nemátode/bactéria e obtendo produções de da ordem dos 10^9 nemátodes em sacos de 3 Kg de meio de cultura (Fig. 5).

O método Bedding representa um avanço muito significativo no processo produtivo dos nemátodes entomopatogénicos. É um método flexível, com custos de capital baixos e não necessita de mão de obra especializada sendo, por isso, atractivo para muitas empresas americanas, europeias e chineses após melhoramento dos processos de mistura do meio com o suporte, de inoculação e recolha. Contudo, quando se faz o "scale-up" da capacidade produtiva verifica-se que os custos de mão de obra aumentam muito mais que os custos de capital tornando-o economicamente viável apenas para produções da ordem dos 10×10^{12} IJs/mês (Friedman, 1990). Esta limitação aliada à necessidade de mais espaço termo-estativado para incubação, maiores gastos no consumo de água para extracção e eliminação de resíduos, leva a que o processo Bedding só tenha



Figura 5. Produção *in vitro* de *Heterorhabditis bacteriophora* segundo o método de Bedding.



Figura 6. Bioreactor convencional para produção de NEPs à escala piloto.

viabilidade em países com custos de mão de obra baixo.

Produção *in vitro* em cultura líquida

Presentemente, a cultura monoaxénica em meio líquido e em fermentador tem sido o principal alvo na produção à escala comercial de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Fig. 6). Pace et al. (1986) em fermentadores do tipo tanque agitado de 10 L obtiveram concentrações de 90×10^3 IJs/ml. Friedman et al. (1989) referem concentrações superiores a 95×10^3 IJs/ml em fermentadores do tipo "airlift".

Apesar dos aspectos positivos destes sistemas, que incluem a facilidade de "scale-up" e de "downstream", a segurança, o controlo e a flexibilidade os rendimentos continuam a ser insatisfatórios. Friedman et al. (1989) verificaram, no decurso dos seus trabalhos que o arejamento é a exigência mais difícil de satisfazer e as tensões de corte a limitação mais significativa para uma produção eficiente. A estes factores Neves et al. (1998) acrescentam as baixas taxas de cópula, fruto da necessidade de elevadas taxas de arejamento e agitação, como um dos factores relevantes nos baixos rendimentos que se obtêm. Tendo em atenção estas dificuldades uma

alternativa a considerar, e que se tem mesmo revelado interessante, é o uso de fermentadores com desenho não convencional. Assim, e com base no conhecimento das propriedades físicas – tamanho, forma e densidade – dos componentes da fase sólida (nematode) (Neves et al., 1997) foi desenvolvido, num trabalho de cooperação entre o Centro de Investigação de Recursos Naturais (CIRN) da U. dos Açores e o Centro de Engenharia Química (CEQ) da U. Minho, um fermentador do tipo "airlift" com uma zona de circulação e uma zona de desaceleração com anteparos de decantação concêntricos (Fig. 7), funcionando esta última como uma zona de baixa velocidade de circulação do líquido onde a concentração de fêmeas é elevada permitindo, deste modo, o aumento da taxa de acasalamento com os machos circulantes pelo fermentador. Apesar dos resultados obtidos com este desenho traduzirem uma melhoria relativamente aos obtidos por Pace et al. (1986) e Friedman et al. (1989) expressa num factor reprodutivo (RF = concentração final/concentração inicial) superior a realidade é que há ainda questões por resolver com grande impacto nos rendimentos finais. A título de exemplo, refira-se apenas o processo de "recovery" (retoma do ciclo de desenvolvimento) do estado infectante. A importância deste processo reside na influência que exerce sobre a dinâmica populacional, a duração do processo fermentativo e, obviamente sobre o rendimento final. Acontece que a percentagem de "recovery" em cultura *in vitro* é muito baixa, e muito pouco se sabe acerca do(s) factor(es) que desencadeia(m) todo este processo.

Em jeito de conclusão, podemos dizer que embora os nemátodes entomopatogénicos já sejam produzidos para fins comerciais, havendo mesmo "joint ventures" entre empresas e laboratórios de investigação, muita investigação é ainda necessária para melhorar os sistemas de produção por forma a

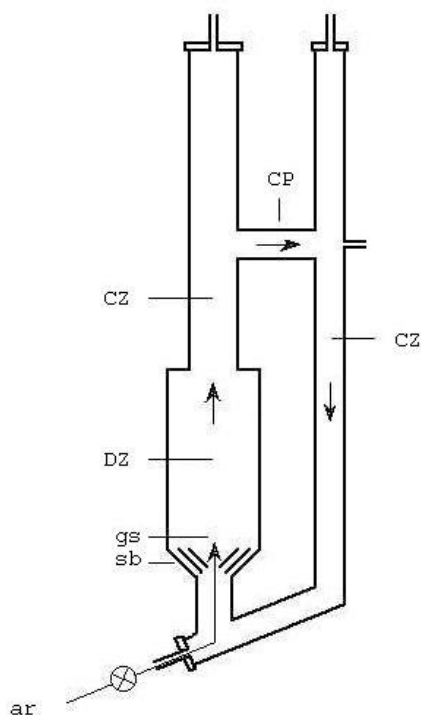


Figura 7. Esquema do bioreactor "airlift" de desenho não convencional desenvolvido pelo CIRN/CEQ para a produção de *Steinernema* sp. CZ - Zona de circulação; DZ - Zona de desaceleração; gs - difusor de gás; sb - anteparos concêntricos; CP- tubo de ligação.

diminuir os custos e a aumentar os rendimentos do processo.

5. Proteínas Insecticidas

Como já se referiu, a actividade patogénica do complexo nemátode-bactéria deve-se, em grande parte, à actividade secretora do complexo. A penetração do nemátode na cavidade geral do insecto está associada a proteases que o IJ liberta na fase inicial do parasitismo e que lisam localmente o intestino do insecto abrindo pequenos orifícios por onde penetra transportando a bactéria. Estes pequenos orifícios cicatrizam rapidamente impedindo a entrada de bactérias da flora intestinal e a consequente septicémia, mantendo, deste modo, o ambiente asséptico desejável para o estabelecimento da bactéria transportada pelo nemátode.

Após a penetração do complexo, a morte do insecto sobrevém em menos de 48 h. Esta eficiência com que o complexo mata o insecto

depende da espécie de insecto parasitada e do seu estado fisiológico e imunológico. Depende ainda da capacidade do complexo em não ser reconhecido como corpo estranho e da sua capacidade em produzir substâncias tóxicas e suprimir as defesas do insecto.

Relativamente ao reconhecimento do nemátode como corpo estranho, são poucos os insectos capazes de o fazer. O mecanismo de evasão não está ainda esclarecido mas parece estar ligado a lípidos que recobrem a cutícula destes parasitas. Quanto aos insectos que são capazes de reconhecer o nemátode como corpo estranho fazem um encapsulamento melanótico (dípteros) ou um encapsulamento celular (lepidópteros e coleópteros).

Para além de garantir a sua própria evasão o complexo nemátode-bactéria também produz toxinas e destrói factores anti-bacterianos da hemolinfa do insecto, provocando a imunodepressão do hospedeiro e

facilitando a instalação da bactéria simbiote. Identificou-se uma proteína de massa molecular próxima de 65 kDa que causa a morte, em poucos minutos, dos insectos são (Simões, 1998). Também foram identificadas proteínas tóxicas de massa molecular próxima dos 40 kDa, e com uma actividade letal mais retardada (Palha et al., 1998) produzidas por *S. carpocapsae* em cultura *in vitro* e em axenia. Foram ainda associadas outras enzimas à toxicidade de *S. carpocapsae* (Simões et al., 1999). Por outro lado, em ensaios *in vitro* onde *X. nematophilus* cresceu em axenia obteve-se uma protease de 94 kDa (Cherqui et al., 1999) cujo modo de acção e os alvos ainda não estão definidos, no entanto, sugere-se que esta protease esteja ligada à imunodepressão que o complexo causa no insecto, destruindo factores anti-bacterianos induzidos do tipo das cecropinas.

À semelhança do complexo *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophilus* também o complexo *Heterorhabditis bacteriophora-Photorhabdus luminescens* produz proteínas com actividade insecticida e imunodepressora como o demonstram os trabalhos de Jaroz & Boemare (1997). *Photorhabdus luminescens* em cultura *in vitro* e em axenia liberta um complexo proteico de elevada massa molecular contendo pelo menos 2 toxinas, uma com 208 kDa e outra com 63 kDa (Guo et al., 1999) que causam uma lise intensa do epitélio intestinal do insecto (Bowen et al., 1998). Para além das toxinas acima referidas, também se mostrou a existência, no meio de cultura, de duas proteases (Cherqui et al., 1999) que se pensa intervirem na maturação do complexo proteico insecticida.

6. Perspectivas

Depositam-se actualmente grandes esperanças nos resultados de investigação sobre a produção em

massa dos NEPs e sobre as proteínas que participam no processo patogénico e na identificação dos seus genes codificantes.

O trabalho por nós desenvolvido na área da engenharia da fermentação, de que resultou a concepção de um novo fermentador com desenho não convencional, representa um avanço significativo que poderá ser incrementado quando aspectos de biologia fundamental do complexo forem conhecidos, especialmente os que se referem ao processo de "recovery" do nemátode e ao papel da bactéria simbiote no desenvolvimento do complexo.

Por outro lado, o interesse por novas proteínas inseticidas que possam vir a juntar-se à δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* cresceu bastante nestes últimos tempos e tem a ver com o facto dos insectos estarem a desenvolver resistências às proteínas expressas por plantas transformadas com genes da δ -endotoxina de *B. thuringiensis*. As toxinas do complexo nemato-bacteriano *Steinernema-Xenorhabdus* e *Heterorhabditis-Photorhabdus* podem constituir-se nos bio-inseticidas que se procura. É neste contexto, que se desenvolve um programa de investigação no nosso laboratório do Centro de Investigação de Recursos Naturais (CIRN) da Universidade dos Açores, com o objectivo de identificar os genes das proteases participantes no processo patogénico e investigar o papel destas proteases na virulência do complexo e na sua especificidade.

Referências

- Bedding, R.A. 1981. Low cost in vitro mass production species of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* for field control of insect pests. *Nematologica* 27, 109-114.
- Bowen D, Rocheleau TA, Blackburn M, Andreev O, Golubeva E, Bhartia R, & ffrench-Constant RH. 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science* 280 (5372): 2129-32
- Cherqui, A., Pereira, A., Caldas C., Palha, A., F., Duvic, B., Simões, N.. Partial Characterization of the Proteases Released by the Complex *Steinernema/Xenorhabdus*. (submitted for publication on Proceedings of the Workshop on "Toxic Metabolites of nematode-bacteria complex". 21-27 Mars, 1999. Viena, Austria.
- Dutky, S.R, Thompson, J.V, & Cantwell, G.W. 1964. A technique for the propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Pathology* 6, 417-422.
- Ehlers, R.-U., Hokkanen, M.T. 1996. Insect biocontrol with non-endemic 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.
- Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development. (Gaugler, R & Kaya, H.K, Eds) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 153-172.
- Friedman, M.J., Langston, S.E. & Pollit, S. 1989. Mass production in liquid culture of insect killing nematodes. Patent International Publication Number WO 89/04602 1-24.
- Gaugler, R. & Campbell, J. F. 1991. Selection for enhanced host-finding of scarab larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) in an entomopathogenic nematode. *Environmental Entomology* 20, 700-706.
- Guo L, Fatig RO 3rd, Orr GL, Schafer BW, Strickland JA, Sukhapinda K, Woodworth AT, & Petell JK. 1999. *Photorhabdus luminescens* W-14 insecticidal activity consists of at least two similar but distinct proteins. Purification and characterization of toxin A and toxin B. *Journal Biological Chemistry* 274 (14): 9836-42
- House, H.L, Welch, H.E. & Cleugh, T.R. 1965. Food medium of prepared dog biscuit for the mass production of the nematode DD-136 (Nematoda: Steinernematidae). *Nature* 206, 847.
- Jarosz, J. & Boemare, N. 1998. Insect humoral immune response and interaction with symbiotic bacteria. In "Pathogenicity of Entomopathogenic Nematodes versus Insect Defense Mechanisms: Impact on Selection of Virulent Strains" (N. Simões, N. Boemare and R. Ehlers, Eds.), pp. 151-170. *European Commission*, Brussels.
- Neves, J.M, Mota, M., Simões, N., Teixeira, J.A. 1996. A rapid method for adults separation from a mixed population of *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). *Fundamental and Applied Nematology* 19: 103-106.
- Neves, J.M.; J. A. Teixeira; N. Simões & M. Mota (1998). Produção de nemátodos entomopatogénicos *Steinernema* spp. em fermentador airlift não convencional: Avaliação da Eficácia. *Biotec' 98*, 216., 216.
- Pace, G.W., Grote, W. and Pitt, J.M. 1986. Liquid cultures of nematodes. Patent International Publication Number WO 86/01094 1-16.
- Palha, A. F., Oliveira, P. & Simões, N. 1998. *In vitro* obtention of an entomotoxin (insecticidal protein) from the *Steinernema carpocapsae* - *Xenorhabdus nematophilus* complex. In "Pathogenicity of Entomopathogenic Nematodes versus Insect Defense Mechanisms: Impact on Selection of Virulent Strains" (N. Simões, N. Boemare and R. Ehlers, Eds.), pp. 85-91. *European Commission, Brussels*.
- Simões, N., C. Caldas, J. S. Rosa, E. Bonifassi and C. Laumond. 1999. Pathogenicity Caused by a High Virulent and a Low Virulent Strains of *Steinernema carpocapsae* on *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology* (accepted).
- Simões, N. 1998. Pathogenicity of the complex *Steinernema carpocapsae* - *Xenorhabdus nematophilus* molecular aspects related with virulence. In "Pathogenicity of Entomopathogenic Nematodes versus Insect Defense Mechanisms: Impact on Selection of Virulent Strains" (N. Simões, N. Boemare and R. Ehlers, Eds.), pp. 73-83. *European Commission, Brussels*.
- Tomalak, M. 1994. Selective breeding of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Nematoda, Steinernematidae) for improved efficacy in control of a mushroom fly *Lycoriella solani* Winnertz (Diptera, Sciaridae). *Biocontrol Science and Technology* 4, 187-198.