



Revista  
Técnico-Científica



## INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO E DA LUMINOSIDADE NA INFECÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

<sup>1</sup>Andressa Lima de Brida, <sup>2</sup>Silvia Renato Siciliano Wilcken, <sup>3</sup>Luis Garrigós Leite

<sup>1</sup>Doutora em Agronomia- Proteção de Plantas pela Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho; <sup>2</sup> Doutora em Entomologia pela Universidade de São Paulo (USP); <sup>3</sup> Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/USP

**RESUMO:** Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são alternativas eficientes para o controle de pragas. O emprego de novas técnicas da produção *in vivo*, permite o progresso da tecnologia de formulação de bioinseticidas. O objetivo do trabalho, foi avaliar a influência da luminosidade e do substrato na capacidade de infecção de juvenis infectantes (JIs) de *Steinernema brazilense* IBCBn 06, *Steinernema carpocapsae* IBCBn 02, *Steinernema feltiae* IBCBn 47 e *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 em lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito repetições. As parcelas foram constituídas por placas de Petri com substrato-areia e substrato-papel filtro, com e sem luminosidade, inoculados com suspensão de 1,5 mL contendo 400JIs e quatro lagartas de *G. mellonella*. O número de JIs foi quantificado após a mortalidade das lagartas. A taxa de infecção de JIs de *S. carpocapsae* IBCBn 02 e *S. feltiae* IBCBn 47 variaram de 2,14 a 3,28 e de 11,04 a 13,09 JIs/lagarta. O substrato-areia com e sem luminosidade permitiu a maior taxa de infecção dos JIs de *S. brazilense* IBCBn 06 de 7,86 e 9,44 JIs/lagarta, e 13,49 JIs/lagarta com luminosidade para *H. amazonensis* IBCBn 24. O substrato-areia, permite a maior taxa de infecção por JIs de NEPs.

**Palavras-chave:** Juvenis infectantes; *Heterorhabditis*; *Steinernema*.

## SUBSTRATE INFLUENCE AND LUMINOSITY IN THE INFECTION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE IN *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

**ABSTRACT:** Entomopathogenic nematodes (EPNs) are efficient alternatives for pest control. The use of new techniques of *in vivo* production, allows the progress of the formulation technology of bioinsecticides. The objective of this work was to evaluate the influence of light and substrate on the infectivity of juveniles of *Steinernema*

*brazilense* IBCBn 06, *Steinernema carpocapsae* IBCBn 02, *Steinernema feltiae* IBCBn 47 and *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 on *Galleria mellonella* caterpillars (Lepidoptera: Pyralidae). The experimental design was completely randomized with four treatments and eight replicates. The plots, consisting of Petri dish with substrate-sand and substrate-filter paper, with and without luminosity, inoculated with 1.5 mL suspension containing 400IJs and four *G. mellonella* caterpillars. The number of IJs was quantified after the mortality of the caterpillars. The infection rate of *S. carpocapsae* IBCBn 02 IJs and *S. feltiae* IBCBn 47 ranged from 2.14 to 3.28 and from 11.04 to 13.09 IJs/caterpillar. The substrate-sand with and without luminosity allowed the highest infection rate of *S. brazilense* IBCBn 06 of 7.86 and 9.44 IJs/caterpillar, and 13.49 IJs/ caterpillar with luminosity for *H. amazonensis* IBCBn 24. The substrate-sand, allows the highest rate of infection by IJs EPNs.

**Keywords:** Infecting juveniles; *Heterorhabditis*; *Steinernema*.

## INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são utilizados para o controle biológico de pragas (LEITE et al., 2005). Estes dois gêneros são capazes de ocasionar a morte rápida do hospedeiro devido à associação simbiótica com bactérias do gênero *Xenorhabdus* (Thomas e Poinar 1979) e *Photorhabdus* (Louise e Kuhl, 1983) respectivamente (POINAR; GREWAL, 2012).

O juvenil de terceiro estágio (infectante) não se alimenta e carrega suas bactérias mutualísticas específicas no intestino, e quando penetra no inseto, liberam as bactérias simbióticas dentro na hemocele, matando o inseto entre 24 a 48 horas (DOWDS; PETERS, 2002; POINAR, 1990).

Para que os NEPs sejam utilizados como agentes de controle biológico e aplicados a campo, precisam ser multiplicados em larga escala (DIAS et al., 2008).

A produção de NEPs pode ser em *in vitro*, que é realizada em meio de cultura (sólido ou líquido) e em fermentadores, sendo que este último tem sido o principal alvo na produção em escala comercial para os gêneros de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (NEVES et al., 1998). A produção também pode ser *in vivo*, em que se utiliza insetos na produção e multiplicação de NEPs, a exemplo, a traça-dos-favos, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), correspondendo à espécie

mais utilizada, devido à sua relativa facilidade de criação em laboratório e sua suscetibilidade à maioria das espécies de NEPs (GAUGLER; HAN, 2002).

O processo de multiplicação e isolamento inicial de NEPs precisa ser padronizado, de forma a minimizar a variabilidade entre os métodos, mesmo quando se trabalha apenas com um isolado e/ou espécie de NEP (LINDEGREN et al., 1993). Além disso, o uso de diferentes substratos, arenas, concentrações e períodos de exposição pode acarretar diferenças na suscetibilidade do inseto hospedeiro (HOPPER et al., 1993) e na redução dos caracteres biológicos como virulência, tolerância ambiental ou capacidade reprodutiva pelo inseto hospedeiro (STUART; GAUGLER, 1996) fato observado por Shapiro et al. (1996); Wang; Grewal (2002); que observaram perda da tolerância ao calor, infectividade e fecundidade de *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976) depois de algumas multiplicações em lagartas de *G. mellonella*, através da coleta dos juvenis infectantes em laboratório.

A produção *in vivo* de NEPs em pequena escala visando bioensaios propicia gastos muito menores com mão-de-obra, materiais, custo e tempo de produção, propiciando um armazenamento prolongado, abastecimento de bancos de germoplasma registrados e produção de trabalhos científicos (NEGRISOLI et al., 2015). O conhecimento adequado dos parâmetros de inoculação e multiplicação de nematoides entomopatogênicos é fundamental para diminuir perdas indesejáveis, com isto favorecer o aumento da taxa de infecção e multiplicação de JIs. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do substrato e da luminosidade na capacidade de infecção de juvenis infectantes de *S. brazilense* IBCBn 06, *S. carpocapsae* IBCBn 02, *S. feltiae* IBCBn 47 e *H. amazonensis* IBCBn 24 em lagartas de *G. mellonella*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nematologia Agrícola da Faculdade de Ciências Agronômicas (UNESP) em Botucatu, São Paulo.

Os isolados *S. brazilense* IBCBn 06, *S. carpocapsae* IBCBn 02, *S. feltiae* IBCBn 47 e *H. amazonensis* IBCBn 24 foram obtidos da Coleção do Banco de

Nematoides Entomopatógenos “Oldemar Cardim Abreu” do Instituto Biológico de Campinas, SP.

Os NEPs foram multiplicados em lagartas de *G. mellonella* (quinto instar). Foram utilizadas cinco lagartas de *G. mellonella* por placa de Petri (9 cm de diâmetro) com duas folhas de papel filtro umedecidas com 1,5mL de suspensão com 500 JIs/placa, para cada espécie de NEP separadamente. Após a inoculação dos JIs as placas foram tampadas e lacradas com papel filme PVC e armazenadas em câmara climatizada, B.O.D a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR > 80% (WOODRING; KAYA, 1988). Após três dias da inoculação as lagartas mortas foram transferidas para armadilha de White (WHITE, 1927) e mantidas em câmara climatizada B.O.D a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por um período entre oito e 15 dias. Os JIs que abandonaram os cadáveres foram recolhidos em água destilada, em dias alternados, e acondicionados em frascos Erlenmeyer (40 mL de capacidade), e mantidos em câmara climatizada B.O.D a  $18^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  e UR > 80%, durante uma semana antes da montagem dos experimentos.

Os tratamentos foram constituídos pelos substratos areia e papel filtro, ambos com e sem luminosidade. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e oito repetições. As parcelas com o tratamento substrato-areia foram constituídas por uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) com 100g de areia fina esterilizada e umedecida com 10% de água destilada. O tratamento com o substrato-papel filtro teve cada parcela constituída por uma placa de Petri (9 cm de diâmetro), revestida com duas folhas de papel filtro.

Os JIs dos isolados de NEPs foram inoculados separadamente. Cada placa de Petri contendo os substratos foi inoculada com uma suspensão de 1,5 mL contendo 400 JIs/isolado/placa. Foram inseridas quatro lagartas de *G. mellonella* (quinto instar) por placa de Petri. Após a liberação das lagartas, todas as placas de Petri foram tampadas e vedadas com papel filme tipo PVC. Para o tratamento sem luminosidade (escuro), as placas de Petri foram embrulhadas em papel alumínio e o tratamento com luminosidade (luz) manteve-se vedada com papel filme tipo PVC, todas armazenadas em câmara climatizada B.O.D a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR > 80%. As avaliações foram conduzidas três dias após a mortalidade das lagartas de *G.*

*mellonella*. Os cadáveres foram transferidos para placas de Petri (5 cm de diâmetro) e dissecados. Os juvenis infectantes no interior dos cadáveres foram quantificados em microscópio estereoscópio com 40x de aumento. As médias da infecção dos JIs foram comparadas pela Anova e analisadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade pela transformação de  $\sqrt{x+1.0}$ , utilizando o programa computacional de estatística BioEstat. versão 5.0 (AYRES et al., 2007).

## RESULTADOS

Todos os isolados de NEPs avaliados promoveram a mortalidade de lagartas de *G. mellonella*, independente do substrato utilizado e da luminosidade (Tabela 1).

As taxas de infecções dos JIs de *S. carpocapsae* IBCBn 02 e de *S. feltiae* IBCBn 47 variaram de 2,14 a 3,20 JIs/lagarta e de 11,04 a 13,09 JIs/lagarta não havendo diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 1).

Os JIs de *S. brazilense* IBCBn 06 obtiveram as maiores taxas de infecção nos tratamentos substrato-areia sem e com luminosidade, com 7,86 e 9,44 JIs/lagarta, respectivamente, ambas sem diferenças significativas, diferindo dos demais tratamentos para este mesmo isolado.

Para *H. amazonensis* IBCBn 24, as maiores taxas de infecções foram no tratamento substrato-areia com luminosidade 13,49 JIs/lagarta, diferindo do tratamento substrato-areia sem luminosidade 9,20 JIs/lagarta, ambas taxas de infecção superiores aos tratamentos com substrato-papel filtro com e sem luminosidade, representadas por 5,17 e 6,13 JIs/lagarta, respectivamente.

As taxas de infecção dos JIs de *S. feltiae* IBCBn 47 foram superiores em ambos substratos com e sem luminosidade com as taxas variando de 11,04 a 13,09 respectivamente e superiores a taxa de infecção dos demais isolados avaliados.

Tabela 1. Taxa de infecção (%) de juvenis (J3) dos isolados *Steinernema carpocapsae* IBCBn 02, *Steinernema brazilense* IBCBn 06, *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 e *Steinernema feltiae* IBCBn 47 em lagartas de *Galleria mellonella* em substrato-papel filtro e substrato-areia com e sem luminosidade.

| Tratamento  | Isolados |        |        |        |
|-------------|----------|--------|--------|--------|
|             | IBCB02   | IBCB06 | IBCB24 | IBCB47 |
| Sub.Pf/Esc  | 2,82a    | 5,17a  | 6,64a  | 11,04a |
| Sub.Pf/Luz  | 3,28a    | 6,13a  | 5,31a  | 11,23a |
| Sub. Ar/Esc | 2,14a    | 7,86b  | 9,20b  | 12,48a |
| Sub. Ar/Luz | 2,80a    | 9,44b  | 13,49c | 13,09a |
| CV          | 31, 41   | 35,26  | 24,02  | 18,02  |
| <i>p</i>    | 0,969    | 0,010  | >0,001 | 0,194  |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ). Sub. Pf/Esc: substrato-Papel filtro escuro; Sub. Pf/Luz: substrato-Papel filtro Luz; Sub. Ar/Esc: substrato-Areia Escuro; Sub. Ar/Luz: substrato-Areia Luz.

## DISCUSSÃO

A busca por técnicas padronizadas de produção *in vivo*, ainda são pertinentes (FLANDERS et al., 1996) e o tipo de substrato na inoculação pode influenciar nas taxas de infecções por JIs, uma vez que, a eficiência da aplicação de NEPs em areia ou solo em condições de laboratório é considerado o melhor método, devido à similaridade das condições em que habitam as diferentes espécies de nematoides (BARRETO, 2013).

No presente estudo, as taxas de infecção foram superiores em substrato-areia comparado com o substrato papel filtro, exceto para o JIs de *S. carpocapsae* IBCBn 02, que manteve a taxa de infecção inferior aos demais isolados de NEPs, porém sem diferenças entre os tratamentos. Embora o substrato-papel filtro seja uma metodologia largamente utilizada entre vários pesquisadores, o processo de deslocamento dos JIs pode ter sido afetado por fatores como, umidade e a textura do papel, dificultando a sua locomoção até a lagarta de *G. mellonella*. A umidade tem sido reconhecida como um dos mais importantes fatores do solo, que afeta a sobrevivência, virulência e persistência dos JIs (KLEIN, 1990; CURRAN; BUTLER, 1993). No solo, o comportamento e a eficiência dos NEPs são afetados por fatores

como raios ultravioleta, umidade, temperatura, densidade e textura (LEWIS, 2002), sendo que as interações destes fatores podem comprometer desde a sobrevivência até a capacidade de infecção do nematoide (KAYA, 1990; FITTERS; GRIFFIN, 2006). Foi possível observar que *S. carpocapsae* IBCBn 47, *S. brasilense* IBCBn 06 e *H. amazonensis* IBCBn 24, obtiveram as maiores taxas de infecção no substrato-areia com luminosidade.

O sucesso na mortalidade de diferentes espécies de insetos quando inoculados em areia ou em solo foi verificado por Barreto (2013), em que *S. brasilense*, quando inoculado em areia fina, promoveu mortalidade de 100% de lagartas de *G. mellonella* até 60 dias. *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* foram altamente infectivos para larvas da mariposa da coroa do morangueiro *Synanthedon bibionipennis* (Boisduval) (Lepidoptera: Sesiidae) com taxa de mortalidade de 51 e 33% em condições de campo, respectivamente (BRUCK, 2008). *S. carpocapsae* quando inoculado em solo infestado pela broca-da-erva-mate, *Hedypathes betulinus* (Klug 1825) (Coleoptera: Cerambycidae), causou mortalidade de 78,1% (ALVES et al., 2009). Ao inocular JIs de *Heterorhabditis* sp. isolados 12 e 15 em pré-pupas da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), em solo, obtiveram taxa de mortalidade igual a 100% (SALVADORI, 2011). *Heterorhabditis marelatus* (Liu e Berry, 1996) e *S. carpocapsae*, quando inoculados no solo, causaram 100% de mortalidade na traça *Cydia latiferranea* (Walsingham, 1879) (Lepidoptera: Tortricidae) (BRUCK; WALTON, 2007). *Heterorhabditis* sp. e *S. carpocapsae* foram eficientes no controle de larvas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) quando aplicados na superfície do solo, com mortalidades variando entre 26 e 74% (ROHDE et al., 2012).

Dentro dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, há uma variação considerável nas estratégias de busca do hospedeiro. Os JIs são móveis e o comportamento de busca pode ser dividido em categorias como; rastreamento (móveis) e emboscada (se mantém imóveis na maior parte do tempo, até infectarem o inseto) (LEWIS et al., 2006). Entretanto, as estratégias usadas pelos NEPs para sobreviverem em condições adversas, tais como dessecação, anidrobiose, congelamento, radiação ultravioleta, doenças e predação são pouco conhecidas,

podendo estar relacionadas com a permanência do nematoide no solo em estado quiescente, migração, evitando as condições adversas e ou a permanência no cadáver dos insetos por períodos extensos (GLAZER, 2002).

Pode ser observado no presente estudo, em que a taxa de infecção dos JIs, foi influenciada pela luminosidade, e os isolados *S. brazilense* IBCBn 06, *H. amazonensis* IBCBn 24 e *S. feltiae* IBCBn 47 obtiveram as maiores taxas de infecção, de 9,44, 13,49 e 13,09 JIs/lagarta respectivamente, quando inoculados em substrato-areia com luminosidade. A presença de luz foi o fator contribuinte para que os juvenis tendessem a aprofundar-se na areia mais rápido em busca do hospedeiro, proporcionando uma maior taxa de infecção influenciada pelo rápido encontro do nematoide e a lagarta de *G. mellonella*, evidenciando condições favoráveis para o processo de infecção dos JIs no inseto hospedeiro, permitindo que o nematoide penetre no inseto por aberturas naturais ou via tegumento sem que ocorram fatores que venham interferir para a menor taxa de localização, aproximação e infecção dos JIs, assim permitindo a multiplicação no cadáver hospedeiro.

## CONCLUSÕES

Os JIs dos isolados *S. brazilense* IBCBn 06, *H. amazonensis* IBCBn 24 e *S. carpocapsae* IBCBn 47 apresentaram as maiores taxas de infecção em lagartas de *G. mellonella* quando inoculados em areia, 7,86 e 9,44; 9,20 e 13,49; e 12,48 e 13,09 JIs/lagarta respectivamente, sendo este, o substrato mais adequado para inoculação e multiplicação de juvenis infectantes. O substrato e a luminosidade não influenciaram na taxa de infecção de *S. carpocapsae* IBCBn 02.

## REFERÊNCIAS

ALVES, V. S.; ALVES, L. F. A.; QUADROS, J. C.; LEITE, L. G. **Suscetibilidade da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) ao nematoide *Steinernema carpocapsae* (Nematoda, Steinernematidae).** Arquivos Instituto Biológico. v. 76, n.3, p.479-482, 2009.



AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **Bioestat: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biomédicas Versão 5.0**. Belém, Pará: Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, 2007. 324 p.

BARRETO, A. F. **Preservação de *Steinernema brazilense* e *Heterorhabditis indica* (Nemata: Rhabditida) em diferentes condições de temperatura e teores de umidade em solo**. 2013. 47f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico, Campinas, 2013.

BRUCK, D. J.; EDWARDS, D. L.; DONAHUE, K. M. **Susceptibility of the strawberry crown moth (Lepidoptera: Sesiidae) to entomopathogenic nematodes**. *Journal of Economic Entomology*. v. 101, n. 2, p. 251-255, 2008. DOI:[https://doi.org/10.1603/00220493\(2008\)101\[251:SOTSCM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/00220493(2008)101[251:SOTSCM]2.0.CO;2)

BRUCK, D. J.; WALTON, V. M. **Susceptibility of the filbertworm (*Cydia latiferreana*, Lepidoptera: Tortricidae) and filbert weevil (*Curculio occidentalis*, Coleoptera: Curculionidae) to entomopathogenic nematodes**. *Journal Invertebrate Pathology*. v. 96, p. 93-96, 2007. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.012>.

CURRAN, J. C. G.; BUTLER, K. **Routine cryopreservation of isolates of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp**. *Journal of Nematology*. v. 24, n. 2, p. 269-270, 1992.

DIAS, P.V.C.; DOLINSKI, C.; MOLINA, J.P.A. **Influência da dose de juvenis infectantes e da massa de larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) na produção *in vivo* de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae)**. *Nematologia Brasileira*. v. 32, n.4, p.1-6, 2008.

DOWDS, B. C. A.; PETERS, A. **Virulence mechanisms**. In: GAUGLER, R. (Ed.), **Entomopathogenic Nematology**. CABI, New York: 2002, p. 79–98.

FITTERS, P.F.L.; GRIFFIN, C.T. **Survival, starvation, and activity in *Heterorhabditis megidis* (Nematoda: Heterorhabditidae)**. *Biological Control*. v.37, n.1, p. 82-88, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.08.005>.

FLANDERS, K. L.; MILLER, J. M.; SHIELDS, E. J. ***In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* Oswego (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions**. *Journal of Economic Entomology*. v. 89, p. 373-380, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/89.2.373>.

GLAZER I. **Survival Biology.** In: GAUGLER R. (ed.) **Entomopathogenic Nematology.** CABI, New York: 2002, p. 169-187.

GAUGLER, R.; HAN, R. **Production technology.** In: GAUGLER, R. (Ed.) **Entomopathogenic nematology.** CABI, New York: 2002, p. 289-312.

HOPPER, K. R.; ROUSH, R. T.; POWELL, W. **Management of genetics of biological control introductions.** Annual Review of Entomology. v. 38, n. 1, p. 27-51, 1993.

KAYA, H. K. **Soil ecology.** In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Ed) **Entomopathogenic nematodes in biological control.** Boca Raton: CRC Press: 1990, p. 93-116.

KLEIN, M.G. **Efficacy against soil-inhabiting insect pests.** In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed). **Entomopathogenic nematodes in biological control.** Boca Raton: CRC Press: 1990, p.195-211.

LEITE, L.G.; TAVARES, F.M.; GINARTE, C.M.A.; CARREGARI, L.C.; BATISTA FILHO, A. **Nematoides entomopatogênicos no controle de pragas.** In: PINTO, A.S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M. M.; MALERBO-SOUZA, D. T. (Org.) **Controle Biológico de Pragas: na prática.** Piracicaba: 2005, p.45-53.

LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J. GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. **Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes.** Biological Control. v.38, n.1, p. 66–79, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.007>.

LINDEGREN, J. E.; VALERO, K. A.; MACKAY, B. E. **Simple “in vivo” production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles.** Journal of Nematology. v. 25, n. 2, p. 193-197,1993.

NEGRISOLI JUNIOR, A. S.; NEGRISOLI, C. R. C. B.; SILVA, A. P. P. O. **Produção e armazenamento de nematoides entomopatogênicos.** Embrapa Tabuleiro, Aracajú, 2015. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>. Acesso em 22 abril. 2018.

NEVES, J.M.; TEIXEIRA, J. A.; SIMÕES, N.; MOTA, M. **Produção de nematoides entomopatogênicos *Steinernema* spp. em fermentador airlift não convencional: Avaliação da Eficácia.** Biotec' 98. p. 1-216, 1998.

POINAR JUNIOR, G. O. **Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae.** In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control.** Boca Raton: CRC Press: 1990, p. 23-61.

POINAR, G. O.; GREWAL, P. S. **History of entomopathogenic nematology.** Journal of Nematology. v. 44, n. 2, p.153-161, 2012.

ROHDE, C.; MOINO JUNIOR, A.; CARVALHO, F.D.; SILVA, M. A. T. **Selection of entomopathogenic nematodes for the controlo f the fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae).** Revista Brasileira de Ciência Agraria. v. 7, p. 797-802, 2012.

SALVADORI, J. M. **Caracterização da patogenicidade de nematoides entomopatogênicos e de bactérias associadas para o controle biológico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** 2011. 140f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SHAPIRO-ILAN, D.; GLAZER, I.; SEGAL, D. **Trait stability and fitness of the heat tolerant entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* IS5 strain.** Biological Control. v. 6, n. 2, p.238-244, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1006/bcon.1996.0030>.

STUART, R. J.; GAUGLER, R. **Genetic adaptation and founder effect in laboratory populations of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*.** Canadian Journal of Zoology. v.74, n. 1, p. 164-170, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1139/z96-021>

WANG, X.; GREWAL, P. S. **Rapid genetic deterioration of environmental tolerance and reproductive potential of an entomopathogenic nematode during laboratory maintenance.** Biological Control. v. 23, n. 1, p. 71-78, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0986>.

WHITE, G. F. **A method for obtaining infective nematode from cultures.** Science. v. 66, p.302-303, 1927. DOI: <https://doi.org//10.1126/science.66.1709.302>.

WOODRING, L.; KAYA, H. K. ***Steinernematid and Heterorhabditis* nematodes: a handbook of techniques.** Southern Cooperative Series Bull. v.331, 30p. Arkansas agricultural Experiment Station.1988.