



PATOLOGIA DO TEGUMENTO DE *BOMBYX MORI* FRENTE AO *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

Jeronimo Tavares¹, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro², Edinéia Brambilla
Torquato², Rose Meire Costa Brancalhão².

RESUMO: A sericicultura é uma fonte de renda para a agricultura familiar que gera recursos para muitos produtores, principalmente no estado do Paraná. Contudo ela vem sendo comprometida por diversos patógenos, entre estes, podemos destacar os fungos, como no caso de *Metarhizium anisopliae*, que é amplamente utilizado no controle biológico de insetos pragas, mas também pode infectar o *B. mori*. Assim, tendo em vista a importância de se realizarem estudos desta relação, o presente trabalho objetivou analisar a patologia do tegumento de larvas de *B. mori* de quinto ínstar submetidas à inoculação pelo *M. anisopliae*, uma vez que é a via de infecção deste fungo. Para isso, larvas foram inoculadas com o *M. anisopliae* procedendo-se a análise sintomatológica e o processamento histológico em diferentes tempos pós-inoculação (d.p.i). As larvas mostraram-se susceptíveis a partir do segundo d.p.i., apresentando sintomas característicos de infecção por fungos: redução na alimentação e no tamanho do corpo do inseto. No tegumento surgiram lesões de coloração escura, ocorrendo também a formação de micélios que saíam via tegumento após a morte da larva. A análise do laminário evidenciou claramente a formação de um micélio que desorganiza o tegumento do inseto hospedeiro.

PALAVRAS-CHAVE: Bicho-da-seda; *Metarhizium anisopliae*; patologia; tegumento.

1 INTRODUÇÃO

A atividade sericícola teve início na China há mais de cinco mil anos, onde as lagartas foram domesticadas provavelmente a partir da linhagem *Bombyx mandarina*; e somente em 1740 esta prática chegou ao Brasil. O bicho-da-seda da amoreira, *Bombyx mori*, Linnaeus, 1758 (Lepdoptera: Bombycidae), é criado pelos sericultores para produzir fios de seda ao final de seu ciclo larval que serão utilizados na indústria têxtil para a produção de fios e tecidos. No Brasil a sericicultura representa uma alternativa de renda para a agricultura familiar, e o estado do Paraná é o principal produtor brasileiro de casulos e fios, responsável por 90% da produção nacional, destinados quase que totalmente ao mercado externo (BRANCALHÃO, 2002; SEAB, 2007).

No decorrer do seu ciclo de vida, *B. mori* é susceptível a vários patógenos, como os vírus da família *Baculoviridae*, as bactérias e os fungos, que podem causar prejuízos significativos aos produtores e a indústria sericícola. Estes patógenos desenvolveram uma série de estratégias co-evolutivas para transporem as barreiras de defesa no corpo do inseto, dentre estas barreiras está o tegumento (ALVES, 1998; BRANCALHÃO & RIBEIRO 2003).

O tegumento reveste todo o corpo dos insetos, e além de atuar como barreira à penetração de patógenos, este órgão impede a desidratação e dá suporte estrutural ao

¹ Acadêmico do Curso Ciências biológicas UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel - PR. jeronimo@certo.com.br

² Docentes da UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel –PR lucinéia.r@pop.com.br, edineiabt@bol.com.br, rosecb@gmail.com.

inseto, o que propiciou o sucesso no ambiente terrestre. Morfologicamente ele é formado por uma epiderme constituída por um epitélio de revestimento simples subjacente a uma cutícula quitinosa. A cutícula é formada por várias camadas, composta de lipídeos, polifenóis e proteínas. Já o epitélio apresenta células especializadas unidas por junções celulares que secretam feromônios, ceras e outras substâncias (CHAPMAN, 1998).

Dentre os fungos que acometem o bicho-da-seda podemos destacar o *Metarhizium anisopliae*, que é utilizado amplamente no controle biológico de pragas agrícolas. Este fungo consegue penetrar química e fisicamente no tegumento dos insetos levando-os à morte rapidamente, e ao penetrar cresce nos diversos órgãos até o esgotamento dos nutrientes; no final do ciclo infeccioso, as hifas saem por extrusão e recobrem o corpo por completo. Se as condições de temperatura e umidade forem adequadas ocorre à produção de conídios que poderão disseminar a infecção verticalmente para os demais organismos da população e para o meio ambiente, onde as formas resistentes podem persistir por um longo período (LAVERLAM, 1999; CHARNLEY & St LEGER, 1991; ALVES, 1998).

Uma vez que este fungo é amplamente utilizado no controle de pragas agrícolas formas infectantes podem ser transportadas pelo vento ou chuva aos galpões de criação do bicho-da-seda e levar a uma diminuição da produção. Tendo em vista que o *M. anisopliae* pode eventualmente infectar o *B. mori*, o presente trabalho visou analisar a patologia causada por este fungo em sua via de entrada, o tegumento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para tanto, o fungo utilizado foi o *Metarhizium anisopliae*, isolado E9 cedido pela Emcapa - Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária de Vitória ES, que foi isolado de *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae), conhecida popularmente como cigarrinha-das-pastagens. Os conídios puros foram coletados por raspagem dos meios de incubação e suspensos em uma solução de água destilada com espalhante adesivo 0,1% Tween 80®. A suspensão de conídios foi quantificada com o auxílio de câmara de Neubauer, chegando a uma concentração final de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ conídios/mL.

Os conídios foram inoculados em 40 larvas de quinto ínstar, logo após a muda, através da imersão rápida na suspensão de conídios. Um grupo controle de 40 larvas foi imerso em água destilada com espalhante adesivo.

Os grupos inoculados e controle foram acondicionados em caixas de criação em sala climatizada e alimentados duas vezes ao dia com folhas de amoreira. Para o controle da infecção, os grupos eram observados duas vezes ao dia e os dados sintomatológicos anotados em ficha própria.

Após a morte, as larvas foram submetidas à prova de câmara úmida, para confirmar a infecção pelo *M. anisopliae*, sendo estas acompanhadas por um período de sete dias pós morte (d.p.m.).

Para a análise patológica, larvas inoculadas e controle foram selecionados aleatoriamente com intervalos de 24 horas a partir do primeiro ao sétimo dia pós-inoculação (d.p.i.), dissecadas, fixadas em Bouin, processadas pela técnica histológica padrão e, coradas com hematoxilina-eosina (HE).

As análises e os registros de imagens foram feito diariamente em microscópio óptico Olympus CBA, com o auxílio da câmera digital Sony Cybershot DSC-W50 acoplada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise sintomatológica observamos a partir do terceiro d.p.i. alguns sinais característicos de infecção causada por fungos, como: diminuição na alimentação, escurecimento do tegumento, redução no tamanho do corpo e na atividade do inseto (PITTA, 1994; TAVARES et al., 2007).

As larvas inoculadas com *M. anisopliae*, já se encontravam mortas no sétimo dia após a infecção mostrando que este fungo é extremamente patogênico. Alves (1998) deixa claro que este fungo pode infectar diversos insetos praga, como *Mahanarva posticata*, *Deois flavopicta* (Homoptera : Cercopidae), *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) entre outros, ocorrendo a morte do hospedeiro entre oito a dez dias em média. Isto reforça nossa preocupação de possíveis infecções que venham a ocorrer no campo em detrimento da utilização de bioinseticidas em locais próximos aos galpões de criação de *B. mori*, inseto de importância econômica.

No tegumento surgiram lesões escuras em diversas locais, com predomínio na região dos espiráculos e membranas intersegmentares a partir do quinto d.p.i. Estas lesões ocorrem provavelmente devido à ação de enzimas produzidas pelos fungos (Figura 2).

A observação em câmara úmida mostrou que já no primeiro dia pós-morte (d.p.m.), a larva tornou-se mais rígida, ocorrendo também a formação de micélios que saíam via tegumento, confirmando a infecção pelo *M. anisopliae*. No quinto d.p.m., ocorreu a formação de um espesso micélio que recobria o corpo da larva (GARCIA, 2004).

A análise do laminário em todos os tempos revelou que as células do epitélio tegumentar não são alvos de infecção causada pelo *M. anisopliae*. Contudo, a partir do segundo d.p.i., observou-se uma grande quantidade de hemócitos na hemocele. No terceiro d.p.i., estes hemócitos circundavam estruturas hifais em desenvolvimento no interior do inseto. Estas hifas invadiam os espaços intercelulares em diversas regiões (Figura 1B). No prosseguimento do ciclo infeccioso, no quinto d.p.i., o epitélio tegumentar e a camada cuticular apresentavam-se desorganizados (Figura 1C). Provavelmente esta desorganização se deve pela ação física das hifas em processo de extrusão e não pela infecção do epitélio. No primeiro d.p.m., foi possível visualizar hifas no exterior do corpo e verificou-se regiões com grande crescimento hifal que separam a cutícula da porção celular do tegumento (Figura 1D).

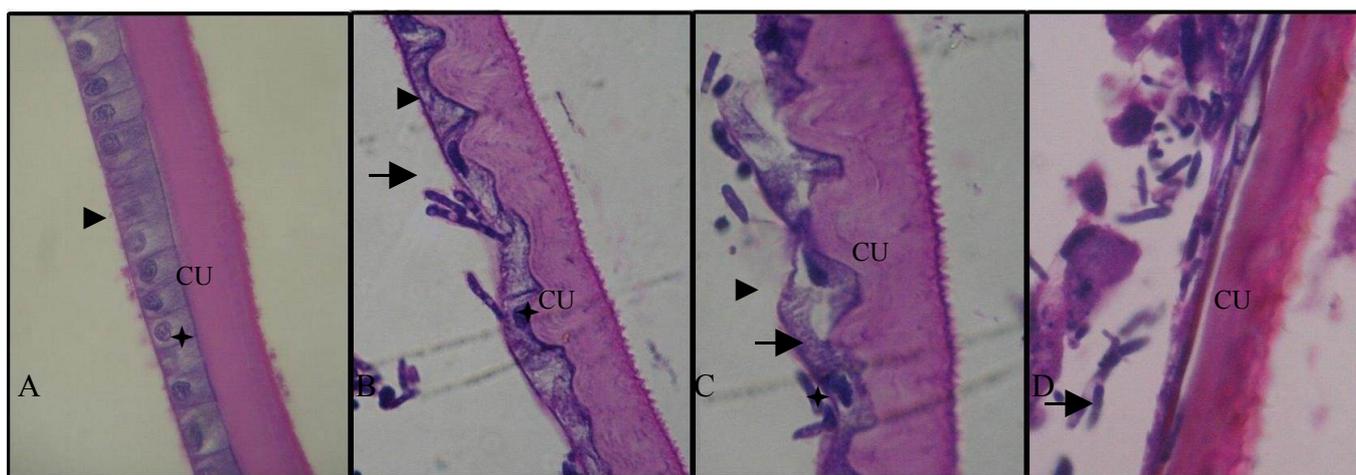


Figura 1. Cortes histológicas do tegumento de *B. mori* em diferentes dias pós-inoculação com *M. anisopliae*, corados com hematoxilina-eosina. (A), corte longitudinal do tegumento do material controle, evidenciando lâmina basal (▶), células do tegumento (✦) e camada cuticular (CU).400x . (B), (C) e (D), mostrando as diferentes fases de infecção e, alterações no tegumento com 3 dpi, 5dpi e 1 dpm, respectivamente, seta mostrando hifas invadindo o tegumento. 1000x.

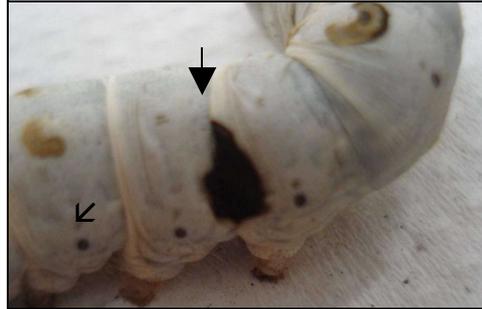


Figura 2. A seta mostra lesão escura no tegumento proveniente da infecção pelo *M. anisopliae*, no 5º d.p.i., espiráculos (↙) e membrana intersegmentar (↓).

4 CONCLUSÃO

O fungo *M. anisopliae*, é altamente patogênico ao *B. mori*, ocorrendo a mortalidade de 100% das larvas inoculadas em um curto período de tempo.

Larvas de *B. mori* inoculadas com o fungo *M. anisopliae* têm seu tegumento completamente destruído pela ação fúngica. Contudo, esta destruição não provém da infecção do epitélio tegumentar, mas sim da ação física das hifas em desenvolvimento no interior do corpo das larvas.

REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de insetos**. Ed. Manole LTDA. 2 ed. São Paulo. p. 73-126. 1986.

BRANCALHÃO, R.M.C.; RIBEIRO, L.F.C. **Citopatologia da Infecção causada por BmNPV no tegumento de *Bombyx mori* L. (Lepdoptera: Bombycidae)**. Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR, 6 (1): p. 15-20, 2003.

BRANCALHÃO, R.M.C. **Vírus Entomopatogênicos no Bicho-da-seda**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento nº24-janeiro/fevereiro 2002.

CHAPMAN, R.F. **The insect structure and function**.: American Elsevier Publishing Company 4 ed. New York, p. 415-566. 1998.

CHARNLEY, A. K. & St. LEGER, R. J.; **The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects**. In: COLE, G. T., HOCH, H. C.; **The Fungal Spore And Diseases Initiation Implant And Animals**, p. 267-287. Plenum, New York, 1991.

GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABO, M. P. J. **Colonization and lesions on engorged female *Rhipicephalus sanguineus*, caused by *Metarhizium anisopliae***. Cienc. Rural., Santa Maria, v. 34, n. 5, 2004.

LAVERLAM S.A. **Dextruxin**. Disponível em: <http://www.laverlam.com.co/e_destru.html> Cali - Colombia. 1999. Acesso em: 13 abril 2007, 16:30:30.

PITTA, G. P. B.; TINOCO, S. T. J.; CALIL, E. M. B. **Doença do bicho-da-seda** . Campinas: CATI, (SAA – Instituto Biológico – SP) 1994.

SEAB - **Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. Histórico da Sericicultura no Estado do Paraná.** Disponível em:
http://www.pr.gov.br/seab/camaras_setoriais/seda/safra_2005_2006.xls Acesso em 12 abr 2007, 16:30:30.

TAVARES, J.; RIBEIRO, L.F.C.; TORQUATO, E. B.; ALVES, L.F.A.; BRANCALHÃO, R.M.C. **Susceptibilidade e sintomatologia de *Bombyx mori* frente ao *Metarhizium anisopliae*.** Anais I SICAS, Maringá 2007.