

**PATOLOGIA EM LARVAS DE *Ascia monuste monuste* INFECTADAS POR *Bacillus thuringiensis* VAR. *kurstaki*. I. SINTOMATOLOGIA EXTERNA E INTERNA.**

Ronchi-Teles, B. (\*)

Habib, M. E. M. (\*\*)

**RESUMO**

No presente trabalho foram estudados os sintomas externos e internos prē-mortais em lagartas de *Ascia monuste monuste* infectadas com um produto (Dipel) à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Sorotipo H3a:3b). Tais sintomas são importantes nas avaliações das doenças de insetos no campo.

Para os estudos da histopatologia foram analisadas as alterações ocorridas no tecido e células do epitélio intestinal a nível de microscopia ótica e eletrônica. Tais alterações resultam na morte das lagartas infectadas.

**INTRODUÇÃO**

*Ascia monuste monuste* (Linnaeus, 1764) é uma das pragas mais freqüentes em planta ção de crucíferas, sendo de ampla distribuição inclusive na região de Manaus, AM. Conhecida como curuquerê da couve, esta lagarta continua sendo combatida através do uso de inseticidas químicos, provocando na maioria das vezes efeitos colaterais desvantajosos. A contaminação de alimentos, eliminação de inimigos naturais das pragas além de problemas ecológicos, são conseqüências freqüentes devido ao uso inadequado de tais defensivos. Com isso tornar-se necessária a busca de alternativa de controle que sejam mais seguras e eficientes.

Esse pierídeo mostrou-se susceptível ao *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Ronchi, 1985).

Aspecto de sintomatologia externa e interna da bacteriose causada por esse bacilo em algumas espécies de insetos, foram revelados por alguns autores como Heimpel & Angus (1959) em lagartas de *Bombyx mori* e *Anagasta kuhniella*, Steinhaus (1963) em alguns lepidopteros inclusive *B. mori*, Habib (1968) em *A. kuhniella*, Habib & Fávoro (1981) em *A. argillacea*, Amaral & Habib (1981) em *Anticarsia gemmatalis*, Habib (1982) em *Alabama argillacea*, *Brassolis sophorae*, *Spodoptera latifascia*, *Plodia interpunctella*, *Culex declator*, *Simulium goeldii* e *S. rorotaense*, Amaral (1982) em *A. gemmatalis* Berti Fº & Gallo

(\*) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus (AM).

(\*\*) Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Campinas (SP).

(1977) em *Brassolis astyra*.

No presente trabalho, pretende-se avaliar a sintomatologia externa, histopatologia e citopatologia em lagartas de *A. monuste monuste* infectadas por *B. thuringiensis*. Esta investigação será seguida por outra visando a determinação da susceptibilidade deste patógeno ao bacilo.

## MATERIAL E MÉTODOS

A descrição da sintomatologia externa foi baseada em critérios adaptados a partir de Steinhaus (1963), Habib (1968 e 1982) e Ronchi (1985).

Para a análise da ultraestrutura das células do epitélio intestinal de lagartas infectadas com *Bacillus thuringiensis*, o seguinte procedimento foi realizado: lagartas com 16 horas de infecção, foram dissecadas sob lupa estereoscópica, em solução fisiológica, removido o intestino médio e imediatamente foi pré-fixado numa solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (7,2) por 2 horas à 4°C. Após esse período, o intestino foi lavado em tampão gelado de cacodilato com 7,5% de sacarose e após fixado numa solução de tetróxido de ósmio 1%, em tampão cacodilato com 2% de sacarose por 2 horas. Após nova lavagem, foi desidratado em acetona à 30% e 50%, durante 15 min em cada, e depois colocado em acetona 70%, por um período de aproximadamente 12-16 horas. Após esse período, o material foi trabalhado à temperatura ambiente, sendo imerso em acetona 90% e 95% durante 15 min em cada banho e por último, foi em acetona 100% por 3 vezes, com duração de 20 min cada.

Logo após a desidratação, o intestino médio foi embebido na resina de inclusão. Finalmente, o intestino já incluído no molde foi para a estufa à 60°C para polimerização, durante 72 horas.

Os cortes ultra-finos foram feitos em um ultramicrotomo Reichert OM U3 com navalha de vidro. Os cortes foram distendidos com clorofórmio e colocados em telinhas de cobre e contrastadas por 30 min no escuro, em acetato de uranila e lavados em três frascos com água destilada. Em seguida foram contrastados em citrato de chumbo, durante 5 min e lavados novamente em 3 frascos com água destilada. Os cortes foram examinados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão ZEISS modelo EM 10A.

Apenas os cortes semi-finos foram montados em lâminas de vidro corados à quente com azul de toluidina, examinados e fotografados em um fotomicroscópio ZEISS, modelo Axiomat NDC.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Sintomatologia Externa

No presente trabalho, o primeiro sintoma observado em lagartas de *A. monuste* infectadas por *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, após as primeiras 2 horas da ingestão do pató

geno, foi a perda do apetite. As lagartas param de se alimentar, indicando alguma disfunção no aparelho digestivo ocasionada pela ação da  $\delta$  - endotoxina produzida pelo bacilo, que age direto nas células epiteliais do intestino.

Algumas horas após o tratamento, as lagartas entram numa fase de regurgitação e diarreia. Com 12 horas de infecção o tegumento da lagarta começa a ficar opaco e a coloração adquire um aspecto escuro. Com 24 horas de tratamento as lagartas diminuíram bastante a movimentação, apenas reagem com movimentos lentos da cabeça em resposta a estímulos de toque. Como as lagartas dessa espécie não sofrem paralisia geral, elas podem ser colocadas no tipo II na classificação de Heimpel & Angus (1959), em que as lagartas além de não sofrerem paralisia geral, a morte é por septicemia ocasionada pela germinação e multiplicação da bactéria na cavidade do corpo. Neste tipo II, encontram-se também outras espécies como *Brassolis sophorae* (Habib et al., 1986), *Alabama argillacea* (Habib, 1982) e *Anticarsia gemmatalis* (Amaral & Habib, 1981; Amaral, 1982).

Com a paralização do funcionamento do intestino, ocasionado pela ação da  $\delta$  - endotoxina, a lagarta entra numa fase mortal, que ocorre entre 24 e 72 horas.

Após a morte, o corpo da lagarta, que estava semi-flácido, começa a secar, ficando com aparência de mumificado e o tegumento termina de escurecer, adquirindo a coloração preta.

O desenvolvimento dos diferentes sintomas variou no tempo, de acordo com a dosagem aplicada e a idade da lagarta.

A seqüência desses sintomas coincide com descrições de outros pesquisadores como, Steinhaus, 1951; Tanada, 1953 e Habib, 1982, para outros lepidópteros.

### Histopatologia

A análise histopatológica do intestino médio de lagartas de 5º estágio de *A. monuste* 16 horas após a infecção por *B. thuringiensis*, foi realizada com uma dosagem equivalente a 266 UI/g. As alterações observadas através de microscópias ótica e eletrônica, mostraram ter alguma relação com os sintomas patológicos externos, no que diz respeito aos distúrbios que ocasionam a parada alimentar, tal parada, por exemplo, foi comprovada pela presença do tecido vegetal mal digerido misturado com a bactéria na luz intestinal (Figura 1).

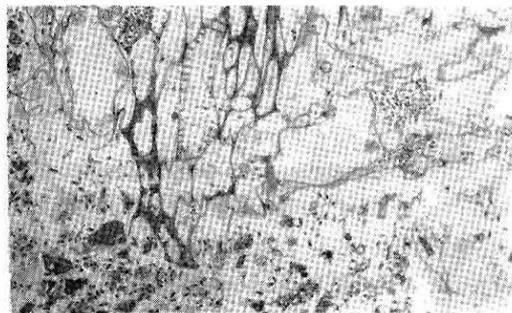


Fig. 1. Presença de tecido vegetal mal digerido, misturado com bactérias, na luz do intestino médio de lagarta de *A. monuste monuste*, infectada por *Bacillus thuringiensis*. (1120 x).



**Fig. 2.** Degeneração das microvilosidades do intestino médio de *A. monuste monuste* com 16 horas de infecção com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em cortes ultra-finos. (2940 x).

As alterações citológicas observadas no período em que ocorre a infecção incluíram a degeneração das microvilosidades nas células epiteliais (Figura 2). As membranas celulares se apresentam formando espaços vazios dando a impressão de estarem sofrendo desidratação. Em células saudias, isto é, em lagartas não infectadas pelo bacilo, as microvilosidades apresentam-se intactas.

Esses dados coincidem com as observações de Ebersold *et al.* (1977), quando citam a formação dos espaços intercelulares e as alterações ocorridas nas microvilosidades, em lagartas de *Pieris brassicae*.

As mitocôndrias na presença da toxina do bacilo, sofrem alterações no tamanho, incluindo hipertrofia, dissociação e desintegração das cristas, isto é, o conteúdo é dissolvido.

Traverls *et al.* (1976) mostraram que o efeito da endotoxina nas mitocôndrias, além de inibir a produção de ATP, também estimula a obtenção e consumo de oxigênio. A ação dessa toxina nas mitocôndrias resulta no aumento da taxa de respiração celular ocasionando maior absorção de glicose pelas células epiteliais do intestino médio.

Ebersold *et al.* (1977) citam o desenvolvimento de vacúolos no retículo endoplasmático, que resulta da ruptura dos sítios de conexão da membrana, este fato não foi observado. Entretanto, maior vacuolização foi observada no próprio citoplasma de epitélio. Enquanto isso, as mitocôndrias do epitélio intestinal não infectado apresentam as cristas intactas.

Os núcleos das células epiteliais foram os únicos que aparentemente não se alteraram de uma forma drástica sob a ação da endotoxina; somente uma exposição prolongada em contato com a toxina induziria alguma contração no material nuclear (Ebersold *et al.*, 1977). Entretanto, Habib (1968 e 1982) observou condensação de cromatina em núcleos de células epiteliais de *Anagasta kuhniella* e *Alabama argillacea* infectadas por esta bactéria.

Dissociação das fibras musculares do intestino médio, tanto circulares como longitudinais, foi freqüentemente observada. A membrana peritrófica foi totalmente degenerada,

resultando em contato direto entre o alimento e as células epiteliais (Figura 3).

Essas observações coincidem com as de Habib (1982), em larvas de *A. argillacea* infectadas pelo mesmo sorotipo.

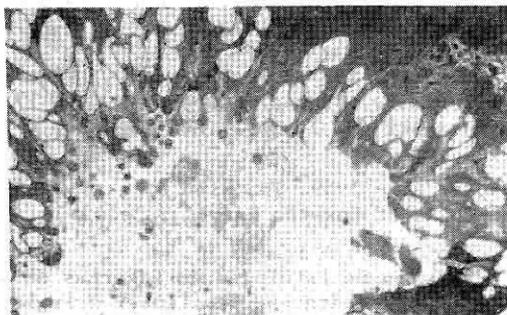


Fig. 3. Degeneração da membrana peritífica e vacuolização das células epiteliais do intestino médio de lagartas de *A. monuste monuste* com 16 horas de infecção por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Em microscópio ótico. (800 x)

#### SUMMARY

External and internal symptoms were detected in the present study, among larvae of *Ascia monuste monuste* infected by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H: 3a-3b).

It is important to be familiar with the external symptoms of this bacterial disease in order to evaluate the efficiency of products based on this pathogen.

Alterations detected among the mid-gut epithelial cells were also described.

#### Referências bibliográficas

- Amaral, M. E. C. - 1982. Controle biológico natural e aplicado de *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae) em campos de soja. Tese de Mestrado, UNICAMP. 198 p.
- Amaral, M. E. C. & Habib, M. E. M. - 1981. Controle microbiano de *Anticarsia gemmatalis* lagarta da soja, por aplicação aéreas de *Bacillus thuringiensis*. In: VII Congr. Bras. Entomol., Fortaleza, CE.
- Berti Filho, E. & Gallo, D. - 1977. O uso de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle da lagarta das palmeiras *Brassolis astyra* Godart. 1965 (Lep., Brassolidae). In: Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 6(1):85-91.
- Ebersold, H. R.; Lufthy, P.; Müeler, M. - 1977. Changes in the structure of the gut epithelium of *Pieris brassicae* induced by the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Bu. Soc. Entomol. Suis., 50:269-276.
- Habib, M. E. M. - 1968. Histopathological studies on the effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner, on the Mediterranean flour moth, *Anagasta kuhniella* Zeller. Tese de Mestrado. Fac. de Agric. Univ. Alexandria, Egipto. 169 p.

- Habib, M. E. M. - 1982. **Patogenicidade de duas variedades de *Bacillus thuringiensis* Berliner para larvas de Lepidoptera e Diptera.** Tese de Livre Docência, UNICAMP, Campinas, SP. 163.
- Habib, M. E. M. & Fávoro Jr., A. - 1981. Estudos de susceptibilidade de *Alabama argillacea*, o curuquerê de algodão, ao *Bacillus thuringiensis*. In: **VII Congr. Bras.Ent.**, Fortaleza, CE, Resumo. p. 142.
- Habib, M. E. M.; Andrade, C. F. S.; Fávoro Jr., A. - 1986. Classificação patológica e susceptibilidade de larvas de *Brassolis sophorae* (L., 1758) infectadas por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H: 3a-3b). **Rev. Agric.**, 61(2):105-113.
- Heimpet, A. M. & Angus, T. A. - 1959. The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. **J. of Invert. Pathol.**, 1:152-70.
- Ronchi, B. I. - 1985. **Estudos de Patologia em lagartas de *Ascia monuste monuste* (L., 1764) (Lep. Pieridae), infectados por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H3a-3b).** Tese de Mestrado, INPA, Manaus - AM. 112 p.
- Steinhaus, E. A. - 1951. Possible use of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an aid in the biological control of the alfalfa caterpillar. **Hilgardia**, 20:359-381.
- - 1963. **Insect. Pathology - An advance treatise.** New York, Academic Press, v. 1, 2.
- Tanada, Y. - 1953. Susceptibility of the imported cabbageworm to *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Proceedings, Hawaiian Entomological Society**, 15(1):1-166.
- Travers, R. S.; Faust, R. M.; Reichelderfer, C. F. - 1976. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*  $\delta$ -endotoxin on isolated lepidopteran mitochondria. **J. Invertebr. Pathol.**, 28:351-354.

(Aceito para publicação em 16.01.1989)