

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

ENTOMOPATÓGENOS ASSOCIADOS A LAGARTAS DE *BOMBYX MORI* L.
(LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE) NO ESTADO DO PARANÁM. Potrich¹, L.F.A. Alves¹, R.C. Brancalhão², G. Dalcin³¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Zoologia de Invertebrados, Rua Universitária, 2096, CEP 85814-110, Cascavel, PR, Brasil. E-mail: profmichele@gmail.com

RESUMO

O Estado do Paraná é o maior produtor sericícola brasileiro. A atividade é explorada em aproximadamente 200 municípios, envolvendo cerca de 7.000 produtores rurais. Durante o estágio de lagarta, o bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) é susceptível a doenças causadas por vírus, fungos e bactérias. Estas doenças podem gerar sérios danos na produção de casulos e, conseqüentemente, prejuízos para o produtor. Com o objetivo de se verificar os entomopatógenos associados a lagartas de *B. mori* no Estado do Paraná, foi desenvolvido o presente trabalho nas principais regiões produtoras, no período de novembro de 2002 a abril de 2003. Para tanto, lagartas suspeitas de infecção, vivas e/ou mortas foram coletadas diretamente dos barracões de criação das empresas sericícolas. O material coletado foi armazenado em frascos plásticos identificados e colocado em caixas térmico. No laboratório, as lagartas foram processadas utilizando-se metodologias específicas de acordo com o patógeno suspeito. Após o isolamento foram identificados os entomopatógenos Baculovírus (31,4%), *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (5,3%) e *Bacillus thuringiensis* Berliner (2,2%).

PALAVRAS-CHAVE: Bicho-da-seda, Baculovírus, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*.

ABSTRACT

ENTOMOPATHOGENS ASSOCIATED TO *BOMBYX MORI* CATERPILLARS L. (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE) IN THE STATE OF PARANÁ, BRAZIL. The state of Paraná exceeds all other Brazilian states in terms of silk production. Approximately 7,000 agricultural producers engage in this activity, in about 200 counties. During the caterpillar stage, silkworms (*Bombyx mori* L.) are susceptible to a number of diseases caused by viruses, fungi, and bacteria. These diseases seriously impact cocoon production, and consequently result in losses for producers. To study the entomopathogens associated to *B. mori* caterpillars in the state of Paraná, the present study was carried out at the main producing regions from November 2002 to April 2003. Live and/or dead caterpillars suspected of infection were collected directly from the rearing huts of silk-producing companies. The collected material was stored in plastic containers, properly identified and placed in cooler boxes. In the laboratory, the caterpillars were processed by specific methodologies according to the suspected pathogen. After isolation, the entomopathogens Baculovirus (31.4%), *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (5.3%) and *Bacillus thuringiensis* Berliner (2.2%) were identified.

KEY WORDS: Silkworm, Baculovirus, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*.

O Paraná é considerado um dos principais estados brasileiros na produção de casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.), sendo uma atividade explorada em aproximadamente 200 municípios, envolvendo cerca de 7.000 produtores rurais (EMATER, 2006). A produção está concentrada, sobretudo, nas pequenas propriedades rurais, onde predomina o trabalho familiar, representando uma alternativa importante de

renda para milhares de pessoas (CORRADELO, 1987, WATANABE *et al.*, 2000, BRANCALHÃO, 2002).

A qualidade dos fios de seda está diretamente relacionada à qualidade dos casulos, pois estes são a matéria-prima da produção, de forma que o desafio da sericicultura é a busca do aumento da produtividade e a melhoria da qualidade do casulo (CORRADELO, 1987). Dentre os problemas associados à sericicultura

²Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Microtécnica, Cascavel, PR, Brasil.³Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

e que afetam diretamente a qualidade dos fios, são os entomopatógenos, em especial os vírus, que têm posição de destaque (AMARAL; ALVES, 1979). Os Baculovírus estão entre os entomopatógenos mais importantes e mais estudados no Brasil quanto ao seu modo de ação, pois infectam os vários tecidos do bicho-da-seda e são facilmente disseminados pela hemolinfa, fezes e regurgito da lagarta quando esta se encontra infectada (BRANCALHÃO, 2002, BRANCALHÃO; RIBEIRO, 2003). Este vírus é facilmente difundido nos barracões de criação devido à sua própria natureza e à falta de cuidados e acompanhamento da criação por parte dos produtores (AMARAL; ALVES, 1979, FONSECA; FONSECA, 1986, HANADA; WATANABE, 1986).

Além das infecções virais, o bicho-da-seda também é suscetível a fungos e bactérias (FONSECA; FONSECA, 1986), sendo este um problema antigo, pois há cerca de 4.000 anos na China e no Egito, assim como na Grécia, as doenças que acometem as lagartas já eram conhecidas. Posteriormente, no século XIX, recebeu também a atenção de Louis Pasteur (ALVES, 1998, HABIB; ANDRADE, 1998).

Dentre as bactérias que causam doenças no bicho-da-seda, destaca-se *Bacillus thuringiensis* Berliner que, apesar da baixa incidência, deve ser controlado, pois seus esporos e cristais são disseminados amplamente nas chocadeiras das indústrias sericícolas, infectando os insetos oralmente (AMARAL; ALVES, 1979, HANADA; WATANABE, 1986, SENGUPTA *et al.*, 1990).

Com relação aos fungos entomopatogênicos, os mais freqüentes que infectam *B. mori* são *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., respectivos causadores das doenças calcinose e calcinose preta, assim denominadas, pois as lagartas doentes se mumificam, "calcificando-se" (AMARAL; ALVES, 1979, SENGUPTA *et al.*, 1990). Os fungos, por atuarem via contato, exigem certas condições ambientais para germinar sobre o inseto, como temperatura próxima de 25° C e umidade relativa próxima de 70% (ALVES, 1998). Tais condições são encontradas nas criações, o que aumenta a probabilidade de contágio e favorece a reprodução e disseminação dos patógenos.

Embora presentes nos barracões de criação, há poucos registros na literatura que tratem da incidência destes entomopatógenos no Brasil. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de se identificar os entomopatógenos que infectam as lagartas do bicho-da-seda nas principais regiões produtoras do Estado do Paraná, bem como acompanhar sua incidência ao longo do período de criação do bicho-da-seda no estado, compreendido entre novembro de 2002 a abril de 2003.

Para isto, lagartas com suspeita de infecção foram coletadas em 139 barracões de criação de bicho-da-seda, previamente selecionados por técnicos da Emater

(Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural) e localizados nas principais regiões produtoras do Estado do Paraná (Noroeste, Norte/Nordeste, Oeste/Sudoeste e Centro-Sul), no período de novembro de 2002 a abril de 2003. Os insetos foram individualizados em frascos plásticos identificados e armazenados em freezer (-10° C) e levados ao laboratório onde foram processados e analisados, segundo técnicas específicas para cada entomopatógeno, conforme ALVES *et al.* (1998a). O número de lagartas coletado em cada região foi variável, sendo que na região Norte/Nordeste coletaram-se 97, na região Noroeste 273 e apenas 7 na região Oeste/Sudoeste, sendo cada um considerada uma repetição.

As lagartas mortas com suspeita de infecção viral foram maceradas em água destilada e, posteriormente, filtradas em algodão. O filtrado foi observado a fresco, em microscópio óptico e, quando necessário, foi submetido à coloração pela técnica de Azan modificado (HAMM, 1966), específica para corpos de oclusão poliédricos (ALVES *et al.*, 1998b).

Quando a presença destes foi confirmada, o material foi centrifugado e armazenado a -10° C. Além disso, a patogenicidade do vírus foi confirmada com a inoculação em lagartas sadias, seguindo os Postulados de Koch (ALVES *et al.*, 1998a).

As lagartas com sintomas de infecção bacteriana foram dissecadas, e pequenas porções foram retiradas do seu corpo e submetidas aos procedimentos padrões para isolamento de bactérias do gênero *Bacillus* (TRAVERS *et al.*, 1987). As colônias obtidas no meio de cultura Ágar-Nutriente que apresentaram morfologia típica de *B. thuringiensis*, segundo descrição de SOSA-GÓMEZ *et al.* (1998), foram amostradas e preparadas lâminas para serem observadas a fresco em microscópio de luz, e também submetidas à coloração de SMIRNOFF (1962). O material identificado foi encaminhado para a coleção de entomopatógenos do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), onde se encontra armazenado.

As lagartas que apresentaram sintomas de infecção por fungo foram desinfetadas externamente com imersão em álcool 70% e em água destilada, e colocadas em câmara úmida e incubadas a 26 ± 1° C e fotofase de 14 horas, durante 3 a 5 dias de forma a permitir a conidiogênese e confirmar o agente causal de mortalidade. Em seguida, os fungos foram isolados utilizando-se meio de cultura para isolamento de fungos aveia-dodine (ALVES *et al.*, 1998a). Os fungos obtidos foram identificados em microscópio de luz, com a coloração de Azul de Lactofenol, para confirmar a espécie, utilizando chaves de identificação (ALVES *et al.*, 1998b). Após a identificação, aqueles reconhecidos como espécies entomopatogênicas foram encaminhados para o banco de entomopatógenos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná para armazenamento.

Verificou-se que o Baculovírus foi o entomopatógeno mais freqüente, estando presente em 31,4% das amostras analisadas e concentrado na região Noroeste (19%), seguida pela região Norte/Nordeste (8,8%). Da mesma forma, verificou-se na região Noroeste do estado a maior presença de fungos entomopatogênicos (4,6%), sendo identificado apenas *B. bassiana* (Tabela 1).

Por outro lado, *B. thuringiensis* foi o entomopatógeno de menor ocorrência e se concentrou nas regiões Norte/Nordeste e Noroeste, sendo encontrado em somente 2,2% das amostras.

A ocorrência de Baculovírus foi considerada elevada, que pode estar relacionada à natureza epizootica dos vírus deste grupo, cuja principal característica é a facilidade de transmissão horizontal e dispersão no ambiente. Tal fenômeno tem, como fatores agravantes, a elevada suscetibilidade do inseto a este entomopatógeno, a falta de monitoramento da criação pelo produtor e manejo inadequado, com limpeza e desinfecção inadequadas, tanto nos barracões como utensílios (FONSECA; FONSECA, 1986, SENGUPTA *et al.*, 1990).

Embora sejam citadas diversas doenças infectando lagartas de *B. mori*, as doenças virais são consideradas as mais importantes, em especial as causadas por Baculovírus, e são um problema em todas as regiões sericícolas do mundo, representando a maior causa de perda de produção (FONSECA; FONSECA, 1986, HANADA; WATANABE, 1986, SENGUPTA *et al.*, 1990, WATANABE *et al.*, 2000, BRANCAHÃO, 2002).

A incidência de *B. thuringiensis* foi baixa em todas as regiões, corroborando informações de AMARAL; ALVES (1979), HANADA; WATANABE (1986) e SENGUPTA *et al.* (1990). Apesar deste entomopatógeno também contaminar os insetos exclusivamente por via oral, ao contrário das lagartas infectadas com Baculovírus, estas não liberam a hemolinfa contendo cristais e esporos da bactéria, não se caracterizando como um entomopatógeno epizootico, reduzindo a disseminação no ambiente (ALVES; LECUONA, 1998).

Quanto à incidência de entomopatógenos ao longo do ano, foi possível observar que os meses de novembro e dezembro de 2002 tiveram uma alta incidência de vírus (7,5% e 17,7%, respectivamente), sendo que em dezembro também ocorreu a maior

Tabela 1 - Entomopatógenos associados a lagartas de *B. mori* e respectivos percentuais, nas principais regiões produtoras de casulos-de-seda do Estado do Paraná, no período de criação de novembro de 2002 a abril de 2003.

Regiões sericícolas	n ¹	% de lagartas mortas				CND	Total geral (%)
		Vírus	Bactérias	Fungos	Total		
Norte/Nordeste	97	8,8	1,1	0,7	10,6	14,0	24,6
Noroeste	273	19,0	1,1	4,6	24,7	44,0	68,7
Oeste/Sudoeste	7	3,6	0,0	0,0	3,6	3,1	6,7
Total	397	31,4	2,2	5,3	38,9	61,1	100,0

¹número total de lagartas coletadas em cada região, no referido período de avaliação

CND = Causas não definidas

Tabela 2 - Porcentagem de lagartas de *B. mori* mortas por entomopatógenos ao longo do período de criação de 2002/2003.

Mês de coletas	n ¹	Vírus	Fungos	Bactérias	Causas não definidas	Total (%)
2002						
novembro	108	7,5	0,4	0,4	19,0	27,3
dezembro	160	17,7	0,4	1,1	21,0	40,2
2003						
janeiro	48	1,2	4,5	0,7	5,6	12,0
fevereiro	26	0,6	0,0	0,0	6,0	6,6
março	36	3,0	0,0	0,0	6,0	9,0
abril	19	1,4	0,0	0,0	3,5	4,9
Total	397	31,4	5,3	2,2	61,1	100,0

¹número total de lagartas coletadas em cada um dos meses de avaliação.

incidência de bactérias (1,1%). No mês de janeiro de 2003, foi registrada uma alta ocorrência de fungos (4,5%), enquanto a incidência de vírus foi baixa, quando comparada com os demais meses (Tabela 2). Segundo HANADA; WATANABE (1986), o verão é a época favorável para a disseminação do *Nucleopolyhedrovirus*, e pode-se observar que a maior incidência do vírus se deu entre novembro e dezembro de 2002, e, posteriormente, voltou a ter uma frequência maior no mês de março. Este segundo pico provavelmente esteve associado com mudanças bruscas na temperatura comuns nessa época do ano, o que provoca estresse nas lagartas, favorecendo a incidência do vírus (AMARAL; ALVES, 1979, FONSECA; FONSECA, 1986, HANADA; WATANABE, 1986).

Com relação aos fungos entomopatogênicos, ALVES (1998) afirma que são favorecidos por temperaturas na faixa de 25-30°C, sendo que, durante o verão, a temperatura encontra-se nesta faixa na região estudada, explicando a maior incidência deste entomopatógeno.

Comparando-se a incidência de entomopatógenos observada nas diferentes regiões, verificou-se que a região Noroeste se destacou, apresentando 24,7% das lagartas da mortalidade confirmada por algum dos entomopatógenos avaliados, seguida da região Norte/Nordeste que apresentou 10,6% de infecção nas lagartas coletadas. Tais valores podem estar associados ao fato de serem as principais regiões produtoras de casulos verdes do Paraná, concentrando grande número de galpões, além de apresentarem condições adequadas para a ocorrência de entomopatógenos (temperatura média acima de 25°C e U.R. média próxima de 70%, no período de produção do bicho-da-seda), com destaque para a região Noroeste, onde foram encontradas mais lagartas com sintomas de infecção (273 indivíduos)

Para evitar e controlar a maioria destas doenças e medidas preventivas são preconizadas incluem a desinfestação e desinfecção dos barracões a cada nova criação. Em locais muito úmidos, que favorecem a ocorrência de fungos, recomenda-se o tratamento de cal formalizada sobre os sirgos, deixando os leitões mais secos. E, para prevenir contra possíveis viroses, recomenda-se que a temperatura seja mantida o mais constante possível e que a alimentação seja adequada e em horários fixos, para que a lagarta não sofra com o estresse (AMARAL; ALVES, 1979).

Além disso, a reutilização da matéria orgânica proveniente dos barracões de criação para adubação das amoreiras é de grande importância e, para que não seja um fator disseminante de entomopatógenos, recomenda-se a sua compostagem. Com isso, a maioria dos microrganismos existentes são inativados com alta temperatura e mudança de pH, diminuindo riscos de doenças nas produções (FONSECA; FONSECA, 1986, HANADA; WATANABE, 1986, WATANABE et al., 2000).

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/Plano Sul de Pesquisa e Pós-Graduação pela concessão da bolsa de iniciação científica à primeira autora e à Fundação Araucária pelo auxílio para o desenvolvimento desta pesquisa.

REFERÊNCIA

- ALVES, S.B. Patologia e controle microbiano. In: _____ (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 21-37.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____ (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.
- ALVES, S.B. & LECUONA, R.E. Epizootologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.), *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 97-169.
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JUNIOR, A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998a. p. 637-711.
- ALVES, S.B.; FERRAZ, L.C.C.B.; CASTELLO BRANCO JUNIOR, A. Chaves para a identificação de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.), *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, FEALQ: 1998b. p. 1039-1074.
- AMARAL, E. & ALVES, S.B. *Insetos úteis*. Piracicaba: Livroceres, 1979. 188p.
- BRANCALHÃO, R.M.C. Vírus Entomopatogênicos no bicho-da-seda. *Biociência: Ciência e Desenvolvimento*, v.24, p.54-58, 2002.
- BRANCALHÃO, R.M.C.; RIBEIRO, L.F.C. Citopatologia da infecção causada por BmNPV no tegumento de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia*, v.6, p.15-20, 2003.
- CORRADELO, E.F.A. *Bicho-da-seda e Amoreira da folha ao fio a trama de um segredo milenar*. São Paulo: Ícone, 1987. 101p.
- EMATER. Dados da produção de casulos verdes. 2006. Disponível em: <http://www.pr.gov.br/seab/camaras_setoriais/seda/seda_pdf/dados.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2006.
- FONSECA, A.S. FONSECA, T.C. *Cultura da amoreira e criação do bicho-da-seda*. São Paulo: Nobel, 1986. 120p.
- HABB, M.E.M. & ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.
- HAMM, J.J. A modified Azan staining technique for inclusion body viruses. *Journal of Invertebrate pathology*, v.8, p.125-126, 1966.
- HANADA, Y.; WATANABE, J.K. *Manual de criação do bicho-da-seda*. Maringá: Cocamar, 1986. 224p.
- SENGUPTA, K.; KUMAR, P.; BAIG, M.; GOVINDAIA, H. *Handbook on Pest and Disease Control of Mulberry and Silkworm*. Bangkok: UNESCAP, 1990. 88p.
- SMIRNOFF, W.A. A staining method for differentiating spores, crystals, and cells of *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *Journal of Insect Pathology*, v.4, p.384-386, 1962.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; TIGANO, M.S.; ARANTES, O.M.N. Caracterização de entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.731-763.

TRAVERS, R.S.; MARTIN, P.A.W.; REICHELTER, C.F. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied Environmental Microbiology*, v.53, p.1263-1266, 1987.

WATANABE, J.K.; YAMAOKA, R.S.; BARONI, S.A. *Cadeia produtiva da seda: diagnósticos e demandas atuais*. Londrina: IAPAR, 2000. 129p.

Recebido em 24/8/06

Aceito em 6/11/07