

LÍDIA APARECIDA DOURADO

SUSCEPTIBILIDADE DA GLÂNDULA MANDIBULAR DE LAGARTAS HÍBRIDAS
DE *BOMBYX MORI* (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE) AO
NUCLEOPOLYHEDROVIRUS MÚLTIPLO

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
OUTUBRO - 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LÍDIA APARECIDA DOURADO

SUSCEPTIBILIDADE DA GLÂNDULA MANDIBULAR DE LAGARTAS HÍBRIDAS
DE *BOMBYX MORI* (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE) AO
NUCLEOPOLYHEDROVIRUS MÚLTIPLO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação na área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
OUTUBRO – 2009

Ficha catalográfica

Elaborada pela bibliotecária: Jeanine da Silva Barros CRB 9/1362

D771s Dourado, Lídia Aparecida
Susceptibilidade da glândula mandibular de lagartas híbridas de
Bombyx mori (Lepidóptera: Bombycidae) ao nucleopolyhedrovirus múltiplo.
/ Lídia Aparecida Dourado.— Maringá, PR: UEM, 2009.
50 f. ; 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Fernandez
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá.
Bibliografia.

1. *Bombyx mori* (lagartas híbridas). 2. Baculoviridade. 3. Glândula mandibular. 4. BmMNPV. I. Fernandez, Maria Aparecida. II. Universidade Estadual de Maringá. III. Título.

CDD 21ed. 595.7

Dedico aos meus pais, Cezar e Marly, por terem iluminado meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo. Agradeço pela compreensão e carinho em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por ter me proporcionado a saúde e a esperança de dias melhores no decorrer do caminho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

À minha orientadora, professora doutora Maria Aparecida Fernandez, pela orientação e compreensão silenciosa dos momentos difíceis, permitindo que meu tempo interno fluísse naturalmente, pelo incentivo e pela amizade.

À minha co-orientadora, professora doutora Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, pela orientação clara e agradável dedicada no decorrer deste trabalho, pela alegria de trabalharmos juntas mais uma vez, assim como pela amizade construída ao longo desses anos.

Ao professor Alex Rodrigues Borges, pela amizade, apoio e por fazer parte de mais uma etapa de minha vida, contribuindo com seus valiosos ensinamentos.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, pelos valiosos ensinamentos.

À professora doutora Rose Meire Costa Brancalhão, pela sua importante contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Às indústrias sericícolas da região Norte do Estado do Paraná, por fornecerem as lagartas para a execução dos experimentos.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em especial ao Laboratório de Biologia Celular e Microtécnica, pela disponibilidade e acolhida para realização dos.

À Celeste, do Laboratório de Biologia Celular e Microtécnica da UNIOESTE, pelo auxílio concedido durante os experimentos, colaborando com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Cezar Dourado e Marly Catarina da Cruz Dourado; minha irmã Nádia Maria Dourado e cunhado Rafael Cortina, pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos difíceis.

Ao meu namorado Claudinei Klais, pelo carinho, compreensão, incentivos e pelos bons momentos, fazendo com que o tempo passasse de forma agradável, amenizando, assim, os momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório, Simone Aparecida dos Santos, Fabrícia Gimenes, Celina Heidemann, Jerônimo Tavares, José Luis da Conceição Silva, Karen Takeda, Bruno Fulan, Vânia Mareze, Roxelle Munhoz, Fabiana Rando, Katya Passos, Silvia Togoro, Quirino Alves de Lima Neto, Leon e Marli, pela amizade e pelos ótimos momentos de convivência.

Às amigas do pensionato, Jakeline Romero, Ana Flávia, Ana Claudia Reusing, Betty Kuhn e Milena Arruda, pela amizade, pelos agradáveis momentos e troca de experiências.

Aos amigos Luis da Conceição Silva e Jerônimo Tavares, pelas constantes caronas e companhias nas viagens de idas e vindas entre Cascavel e Maringá.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Lídia Aparecida Dourado, filha de Cezar Dourado e Marly Catarina da Cruz Dourado, nasceu em 10 de Novembro de 1982, na cidade de Cascavel, Estado do Paraná.

No ano de 1989, ingressou no Ensino Fundamental, na Escola Anibal Lopes da Silva, concluindo- no ano de 1996. Em 1997, iniciou o Ensino Médio no Colégio Estadual Professor Francisco Lima da Silva, concluindo-o em 1999.

Diplomou-se, em agosto de 2004, em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia, habilitação em Licenciatura e Bacharelado, pela Universidade Paranaense (UNIPAR), Campus de Cascavel.

Em agosto de 2006, recebeu o certificado de conclusão do Curso de Especialização em Ciências Morfofisiológicas, com ênfase em Corpo Humano, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus de Cascavel.

Em março de 2008, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Mestrado, pela Universidade Estadual de Maringá (UEM).

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Sericicultura	3
2.2. Bombyx mori.....	7
2.3. Vírus	10
2.4. Glândula mandibular.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Insetos	20
3.2. Inoculação	20
3.3. Identificação da glândula mandibular	21
3.4. Preparação microscópica	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

RESUMO

DOURADO, Lídia Aparecida. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, outubro de 2009. **Susceptibilidade da glândula mandibular de lagartas híbridas de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) ao nucleopolyhedrovirus múltiplo.** Professora Orientadora: Maria Aparecida Fernandez. Professoras Conselheiras: Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro e Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

O *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus tipo múltiplo (BmMNPV) foi utilizado na inoculação de lagartas híbridas de *Bombyx mori* do 5º ínstar para analisar a susceptibilidade das células da glândula mandibular. Esta glândula é de fundamental importância para vida do inseto, uma vez que assume o papel da glândula sericígena na produção e secreção de saliva, indispensável no processo de alimentação. As glândulas foram coletadas e analisadas em diferentes tempos pós-inoculação (dpi), assim como o corpo gorduroso e traquéias, que foram utilizados como controle positivo da infecção pelo BmMNPV. Os resultados evidenciaram que as células da glândula mandibular não são susceptíveis ao BmMNPV em nenhum dos tempos analisados. No entanto, as células do corpo gorduroso e traquéias revelaram aspectos característicos de infecção viral a partir do 5º dpi, confirmando a virulência do inóculo. A análise histológica da glândula mandibular revelou traquéias somente na periferia da glândula mandibular, não no interior no tecido. A detecção de polissacarídeos neutros (PAS) evidenciou a presença da lâmina basal (LB) intacta e delimitada, na superfície da membrana em contato com a hemolinfa, envolvendo a glândula mandibular. A ausência de infecção das células da glândula mandibular pode ser decorrente de vários fatores como: (1) a presença da LB, atuando como uma barreira seletiva; (2) a não penetração do sistema traqueal, uma vez que este órgão é considerado um importante dispersor da infecção nos insetos; (3) expressão gênica diferencial do genoma viral, com o objetivo de prolongar a sobrevivência do hospedeiro (enzimas secretadas pela glândula mandibular auxiliam na alimentação da larva), permitindo desse modo, a disseminação do BmMNPV em vários tecidos larvais.

Palavras-chave: *Bombyx mori*; Baculoviridae; glândula mandibular; BmMNPV.

ABSTRACT

DOURADO, Lídia Aparecida. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, October, 2009. **Susceptibilidade of the mandibular gland of hybrid caterpillars of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) to nucleopolyhedrovirus multiple.** Adviser: Maria Aparecida Fernandez. Coommittee Members: Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro e Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

The *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, subtype multiple, BmMNPV, was used for inoculation of 5th instar *Bombyx mori* hybrid larva to analyze the mandibular gland cells baculovirus susceptibility. This gland has a fundamental importance in insect's life as it assumes the role of the silk gland in the production and secretion of saliva, which is essential in the feeding process. To perform that, the glands were collected and analyzed at different time's post-inoculation (dpi), as well as, the fat body and trachea, as positive control to BmMNPV infection. The results showed that the mandibular gland cells are not susceptible to BmMNPV in any of the times analyzed, however, the cells in the fat body and trachea revealed characteristic features of viral infection from 5 dpi, which confirms the virulence of the inoculum. Histological analysis revealed the presence of the tracheae only at the periphery of the gland, not into the tissue. The detection of neutral polysaccharides (PAS) revealed the presence of basal lamina (LB) intact and bounded the membrane surface in contact with the hemolymph. The absence of infection of cells in the mandibular gland may be due to several factors: (1) the presence of LB, acting as a selective barrier; (2) no penetration of the tracheal system, since this organ is considered an important to insect's infection spread; (3) differential gene expression of the viral genome in order to prolong the survival of the host (the mandibular gland secreted enzymes that assist the larva feeding), thereby allowing the BmMNPV infection in several larval tissues.

Key words: *Bombyx mori*; Baculoviridae; mandibular gland; BmMNPV.

1. INTRODUÇÃO

O bicho-da-seda da amoreira, *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae), é um Lepidoptera de grande importância para as indústrias têxteis, pois o fio de seda extraído de seus casulos tem sido utilizado extensivamente na confecção de tecidos de seda e associados com outros diferentes tipos de fios inovando a fiação nacional e internacional. Além disso, é considerado organismo modelo em estudos básicos na expressão e regulação gênica (Parthasarathy e Gopinathan, 2005). Os maiores problemas que ameaçam a sericicultura no Brasil e no mundo são as doenças causadas por diversos patógenos, dentre elas destacam-se as de etiologia viral, que podem infectar *B. mori* durante seus diferentes estágios do ciclo de vida (Fonseca e Fonseca, 1986; Brancalhão, 2002a).

Baculoviridae é uma extensa e importante família de vírus entomopatogênicos, muito estudada pela sua eficácia no controle biológico de insetos considerados pragas e também por infectar insetos úteis ao homem, principalmente os da ordem Lepidoptera. Essa família de vírus é composta por dois gêneros: nucleopolyhedrovirus (NPV), também conhecidos como vírus da poliedrose nuclear, caracterizado por apresentar muitas partículas virais ocluídas dentro de um corpo de oclusão de forma poliédrica chamado de poliedro; e o gênero granulovírus (GV), os quais apresentam uma única partícula viral ocluída em um corpo de oclusão que apresenta forma oval, denominado grânulo (Adams e McClintock, 1991; Murphy et al., 1995; Brancalhão, 2002a).

O NPV é constituído por uma molécula de DNA circular de fita dupla, associada com proteínas do capsídeo, formando o nucleocapsídeo. Estes são envoltos por um envelope de natureza lipoprotéica, podendo ser denominado como subgrupo viral “single” (SNPV), quando ocorre apenas um nucleocapsídeo por envelope, ou subgrupo múltiplo (MNPV), quando há mais de um nucleocapsídeo por envelope (Adams e McClintock, 1991; Murphy et al., 1995; Moscardi e Souza, 2002; Souza et al., 2002). O MNPV é considerado mais virulento (Washburn et al., 1999; Zhou et al., 2005) e no estado do Paraná – Brasil este subgrupo viral foi isolado a partir de lagartas de *B. mori* infectadas, sendo

denominado de *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus tipo múltiplo, BmMNPV (Brancahão, 2002a; Brancahão et al., 2002b).

Além das glândulas sericígenas, responsáveis pela produção do fio de seda, o *B. mori* possui adicionalmente um par de glândulas originadas de células comuns da ectoderme e derivadas do segmento mandibular, denominadas de glândulas mandibulares. São estruturas de vital importância, pois, juntamente com as glândulas sericígenas, constituem o sistema salivar, auxiliando na digestão do alimento consumido durante o estágio de desenvolvimento larval (Parthasarathy e Gopinathan, 2005), sendo funcionais somente no estágio larval e totalmente histolisadas durante a metamorfose (Borges, 2001; Dourado, 2004; Parthasarathy e Gopinathan, 2005). As glândulas mandibulares estão presentes em Apterygota, Isoptera, Orthoptera, Coleoptera, Trichoptera, Mantodea, Blattariae e Hymenoptera e em Lepidoptera (Borges, 2001; Cruz-Landim e Abdalla, 2002; Parthasarathy e Gopinathan, 2005; Inácio, 2005).

Nosso grupo de pesquisa vem estudando a susceptibilidade ao BmMNPV, assim como os tecidos alvo da infecção viral, corpo gorduroso, sistema nervoso, células testiculares, cárdia, regiões média e posterior da glândula sericígena (Brancahão et al., 2002; Torquato et al., 2006; Pereira et al., 2008; Ribeiro et al., 2009; Brancahão et al., 2009), entretanto ainda é desconhecido se a glândula mandibular de *B. mori* é susceptível à infecção pelo BmMNPV.

Este projeto teve como objetivo geral a verificação de infecção pelo BmMNPV da glândula mandibular de lagartas híbridas de *B. mori*. Para o desenvolvimento dessa proposta, os objetivos específicos foram: 1) verificar a presença de poliedros virais em cortes histológicos da glândula mandibular de lagartas híbridas de 5º ínstar de *B. mori* infectadas pelo BmMNPV; 2) verificar a presença e integridade da LB da glândula mandibular, por meio da detecção de polissacarídeos neutros (PAS) nessas amostras; 3) contribuir para o estabelecimento do ciclo infeccioso do nucleopolyhedrovirus em *B. mori*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sericicultura

A sericicultura é uma atividade agrícola de grande importância para o setor agroindustrial, pois envolve a produção dos ovos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) que irão originar as lagartas, a sua criação e o cultivo da amoreira (*Morus sp*), cujas folhas servirão de alimento para as lagartas até a obtenção dos casulos verdes, que serão transformados em fios e tecidos pelas indústrias têxteis (Fonseca e Fonseca, 1986; Watanabe et al., 2000; Inceoglu et al., 2001). As indústrias de fiação, por sua vez, distribuem mudas de amoreiras e lagartas em estágio de desenvolvimento inicial para os produtores cultivarem até a fase de casulos, os quais são vendidos ao setor empresarial (Santos, 2009).

O bicho-da-seda e a produção da fibra constituíram a revolucionária Rota da Seda (Figura 1), que praticamente fomentou o comércio junto à Ásia, Oriente Extremo Oriente e a Europa. Essa rota também contribuiu com a migração de outras formas de comércio e cultura entre os países que se interligavam por ela (Kurin, 2002).

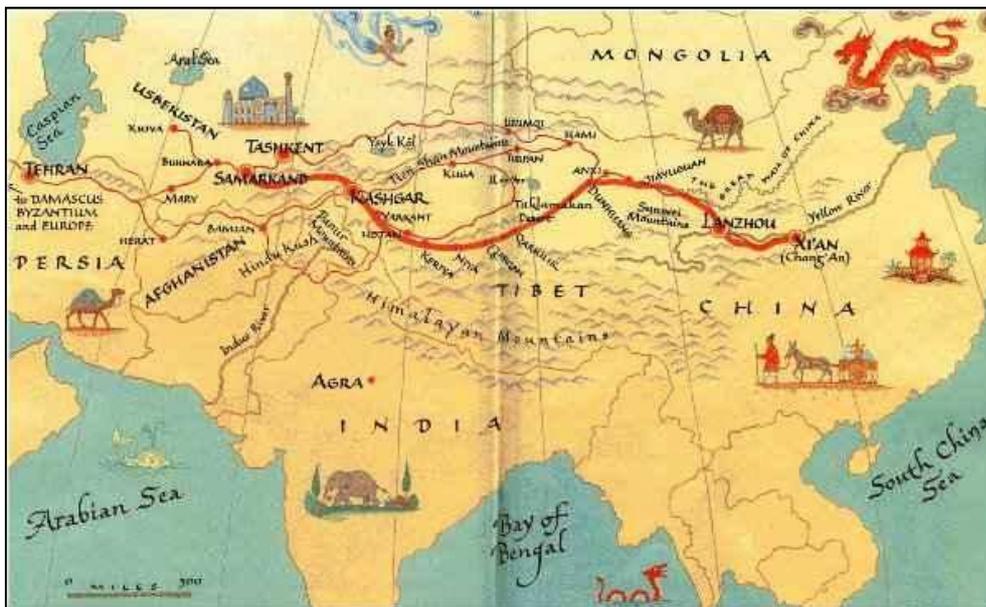


Figura 1 - Mapa indicando a antiga rota da seda pelo oriente.

Esta atividade milenar iniciou-se no Norte da China há mais de 5 mil

anos, expandindo-se para o Oriente e a Europa. No Brasil, a introdução da sericultura iniciou-se no Estado do Rio de Janeiro, no ano de 1848. Em 1992, na cidade de Campinas – SP, foi criada a primeira indústria de seda Nacional S.A. (Hanada e Watanabe, 1986).

Atualmente, há mais de 30 países envolvidos na produção comercial da seda, destacando-se a China como principal país produtor da seda líquida, responsável por aproximadamente 75% da produção mundial, gerando um valor de 1,6 bilhões de dólares. Em segundo lugar encontra-se a Índia (15%), seguida da Coreia e Turcomenistão (antiga URSS), que produzem menos de 5% cada. No Brasil, a produção de seda é expressiva e muito promissora sob o aspecto sócio-econômico. O país ocupa o 5º lugar no ranking mundial (Figura 2), contribuindo com aproximadamente 2,4% da produção. Este valor vem aumentando a cada safra, tornando a atividade ainda mais rentável para os produtores rurais brasileiros. Contudo, somente cerca de 3% da produção nacional de fios permanece no país, sendo o Japão um dos principais compradores (Fernandez et al., 2005; Zanatta, 2006).

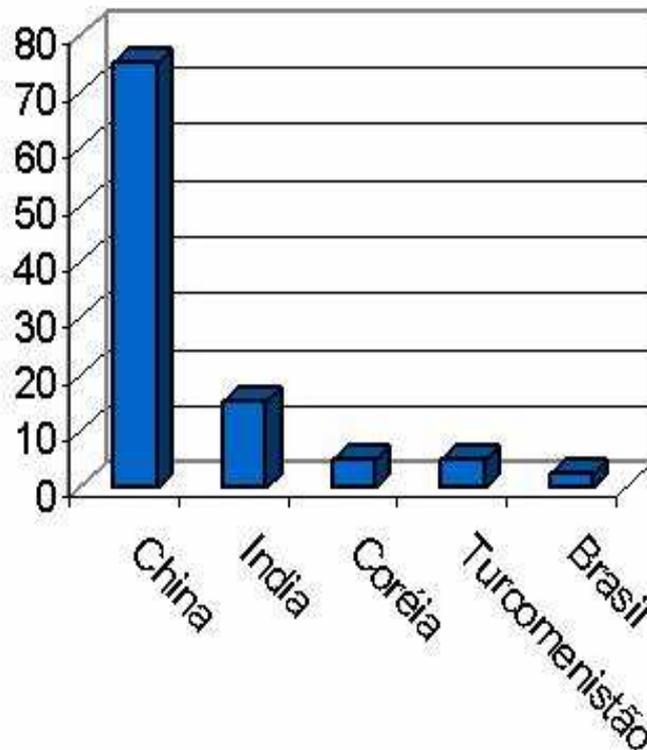


Figura 2 - Produção mundial de seda, onde o Brasil se encontra no 5º lugar. Fonte: Zanatta, 2006.

O Paraná é considerado o principal Estado produtor, responsável por aproximadamente 91% da produção nacional de fios de seda, envolvendo 229 municípios na atividade sericícola, compreendendo 5.889 criadores e 6.468 barracões. Vários fatores contribuem para o desenvolvimento da sericicultura no Estado, em destaque o clima da região Norte que possibilita uma boa produtividade (Figura 3). Na safra de 2007/2008, foram produzidas 5.708 toneladas de casulos, gerando cerca de R\$ 32.869.650,00 (Relatório Takii, safra 2007/2008, Câmara Técnica do complexo da Seda do Estado do Paraná, <http://www.pr.gov.br/seab>).

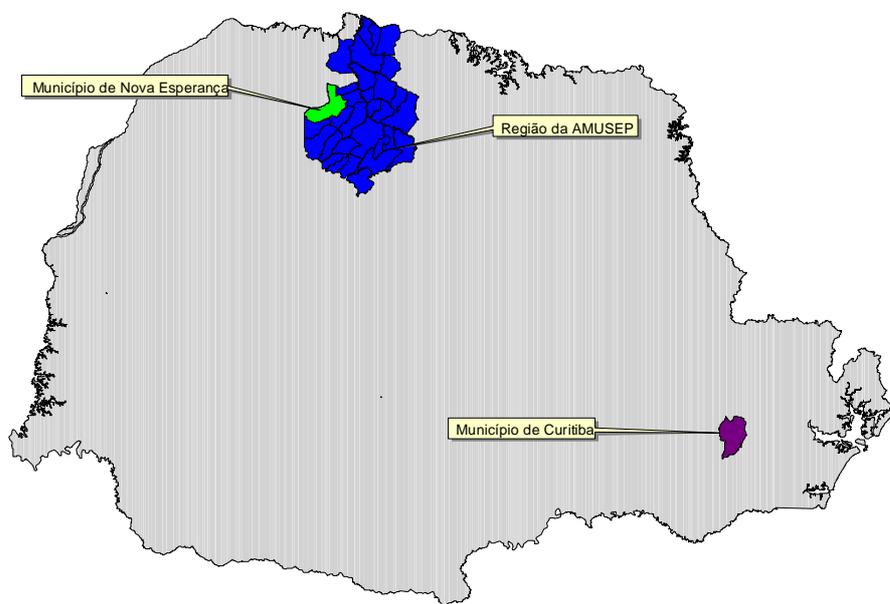


Figura 3 - Mapa do Estado do Paraná, evidenciando o município de Nova Esperança, considerado a Capital Nacional da Seda e a localização da Amusep (Associação dos Municípios do Setentrião Paranaense). Fonte: Fernandez M.A.

A criação do bicho-da-seda é voltada, principalmente, para a agricultura familiar, possibilitando rendimentos quase mensais consideráveis. A atividade sericícola destaca-se ainda pelo baixo impacto ambiental, uma vez que não se deve utilizar agrotóxicos nas plantações de amoreira, pois afeta diretamente o inseto, podendo causar sua morte. Além disso, a atividade ocupa pequena área de cultivo (Figura 4) comparado a outras atividades agrícolas (Watanabe et al., 2000).

Os maiores problemas que ameaçam a sericicultura no mundo e no

Brasil, são as doenças desencadeadas por diversos patógenos como protozoários, bactérias, fungos e vírus, que podem infectar o bicho-da-seda durante seus diferentes estágios do ciclo de vida (Zanetti, 2005a; 2005b). Dentre as doenças causadas no bicho-da-seda por protozoários, destacam-se a *Nosema bombycis* que transmite a pebrina (pimenta-preta) e a flâcherie (diarréia do bicho-da-seda) (Zanetti, 2005b). Das doenças desencadeadas por fungos e de maior incidência, estão *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, causadores das doenças calcinose branca e calcinose preta (Sengupta et al., 1990; Habib e Andrade, 1998). As doenças de etiologia viral são consideradas as mais importantes, como: doença causada por Baculovirus, denominada poliedrose nuclear; por Cypovirus, causador da poliedrose citoplasmática; o Vírus F, agente da flacidez infecciosa e o Parvovirus, causador da densovirose (Watanabe, 2002).



Figura 4 - A dinâmica da produção sericícola. A, plantação de amoreira; B, mariposa de *B. mori* depositando os ovos (seta); C, barracão de criação; D, lagarta de final do 5º ínstar confeccionando o casulo. Fotos gentilmente cedidas por Fernandez, M.A.

O baculovírus tornou-se uma das principais preocupações econômicas no setor sericícola, pois nenhum agente terapêutico está disponível para controlar a infecção do vírus. Desinfecção dos barracões e utensílios antes do início da

criação é geralmente recomendado, mas não é necessariamente adequado para prevenir a ocorrência de doenças (Zanatta, 2006). Uma vez descoberta a infecção pelo vírus, as lagartas devem ser descartadas para evitar a disseminação e propagação no ambiente (Santos, 2009).

Outros insetos podem prejudicar a atividade sericícola, como: mosca Kyojo (*Sturmia sericariae*); mosca tachina (*Tricholyga sorbillans*); mosca uzi (*Tricholyga bombycis*); ácaro da sarna da palha (*Pediculoides ventricosus*) e besouro do casulo (*Desmester ater*) (Zanetti, 2005a e b).

2.2. *Bombyx mori*

Bombyx mori, Linneau, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), popularmente conhecido como bicho-da-seda, é uma larva de relevante importância econômica para as indústrias têxteis, pois seu produto de secreção, os fios de seda, possuem alto valor comercial e possuem características únicas, como brilho, suavidade e textura, apresentando excelente qualidade de acabamento e uma resistência natural ao amarrotamento. Quando misturada a outros fios, é possível desenvolver tecidos tão resistentes que o homem ainda não conseguiu igualar com outras fibras sintéticas como o nylon e o poliéster (Fernandez et al., 2005).

Além disso, o *B. mori* representa um organismo modelo em estudos básicos devido as suas características de fácil manuseio e criação, sendo considerado o segundo inseto mais estudado no mundo, estando atrás somente de *Drosophila melanogaster* (Nagaraju, 2000; Parthasarathy e Gopinathan, 2005).

A domesticação do bicho-da-seda iniciou-se por volta de 2.7000 a.C, na China, provavelmente a partir da linhagem selvagem *Bombyx mandarina* (Dingle et al., 2005). Atualmente, é considerado o único inseto verdadeiramente domesticado, dependendo diretamente do homem para sobreviver e reproduzir (Fernandez et al., 2005), pois possuem asas e aparelho mastigatório degenerados, impossibilitando de se alimentarem ou voar em ambiente natural (Zanatta, 2006).

B. mori é um inseto holometábola, ou seja, apresenta metamorfose completa com quatro estágios de desenvolvimento distintos durante seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa ou crisálida, finalizando a metamorfose completa com o adulto ou mariposa (Figura 5).

Alimenta-se exclusivamente de folhas frescas de amoreira (*Morus sp*) ao longo de toda a sua fase de vida larval, passando por quatro mudas ou ecdises, que determinam os cinco ínstaros ou estádios larvais; quando trocam o tegumento após saírem do estado de repouso e pausarem a alimentação. Ao final do 5º ínstar, quando a larva atinge quase que setenta vezes seu tamanho inicial, o inseto cessa a alimentação e inicia a fiação do casulo, onde sofre a metamorfose, transformando-se em pupa ou crisálida, emergindo aproximadamente em 10 dias como inseto adulto ou mariposa da seda (Watanabe et al., 2000). O inseto adulto não se alimenta, pois o intestino é reabsorvido pelo processo de apoptose e passa a se dedicar somente a reprodução, finalizando a metamorfose em 30 a 40 dias, dependendo da temperatura (Santos, 2009).

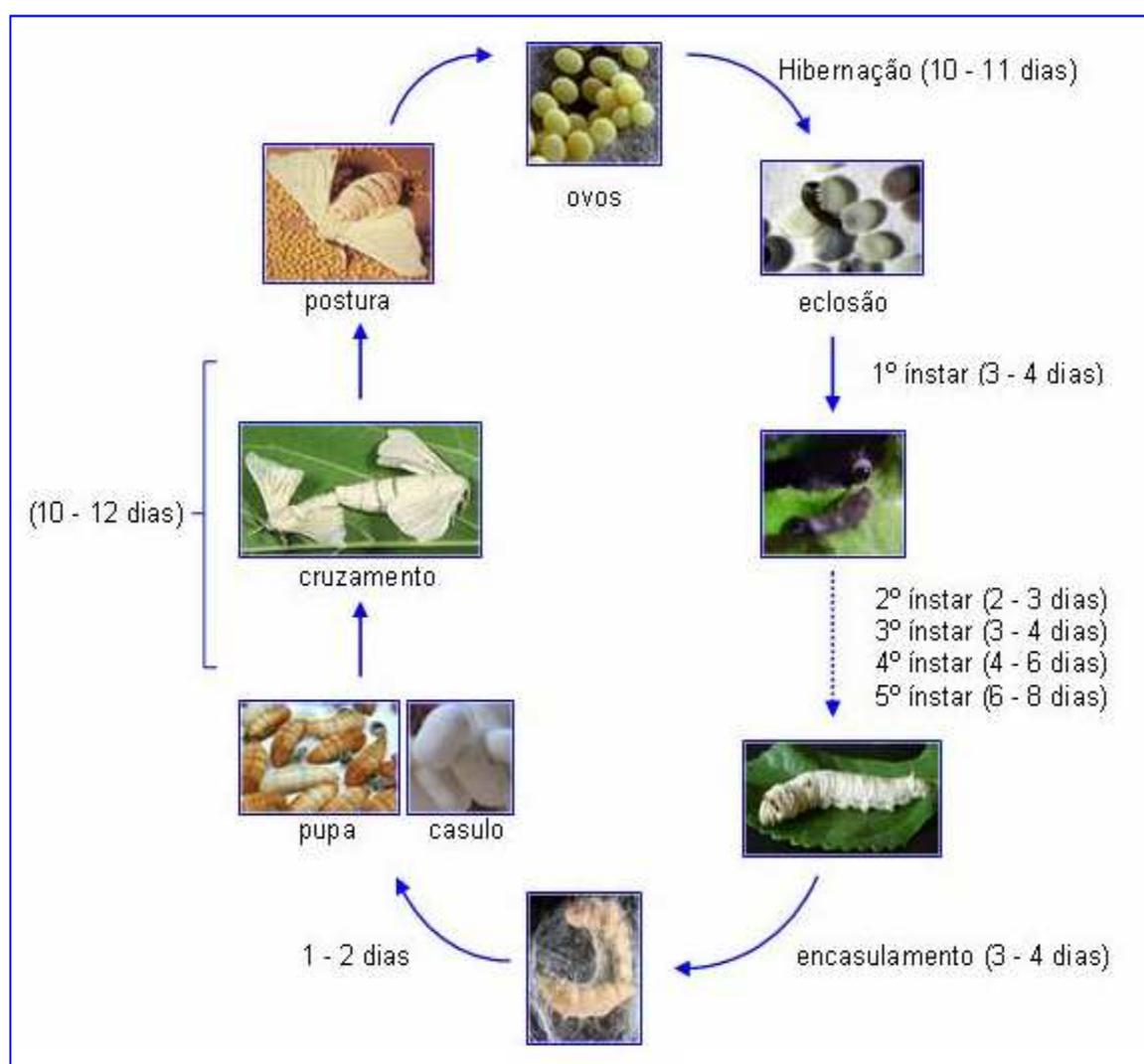


Figura 5 - Ciclo de vida do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae).

De acordo com a distribuição geográfica e o complexo de características morfológicas e fisiológicas, como tamanho do corpo, dias de alimentação, tolerância térmica e resistência a doenças, o bicho-da-seda pode ser classificado como de origem japonesa, chinesa, européia ou indiana (Nagaraju, 2000).

O inseto pode também ser classificado de acordo com o voltinismo, ou seja, número de cultivos realizados anualmente. Assim, existem as linhagens univoltinas (um ciclo anual) ou bivoltinas (dois ciclos anuais) e as linhagens multivoltinas (vários ciclos anuais). As univoltinas ou bivoltinas ocorrem em regiões geralmente temperadas, cujo comprimento do filamento da seda chega a atingir acima de 1000 - 1500 metros, sendo consideradas as melhores produtoras. As linhagens multivoltinas ocorrem nas regiões tropicais e, em geral, são caracterizadas como piores produtoras de seda, pois o comprimento do filamento de seda gera em torno de 600 metros. Dessa forma, o valor comercial dos casulos produzidos pelas univoltinas e bivoltinas é maior que o das multivoltinas, por isso os sericultores brasileiros utilizam híbridos de *B. mori* de origem japonesa ou chinesa, por apresentarem ciclo univoltino e bivoltino (Zanetti, 2005 b; Zanatta, 2006; Santos, 2009).

Os fios de seda são de grande importância, não só para a atividade sericícola, como também para o inseto. São produzidos pelas glândulas sericígenas, adaptadas para a função de secreção salivar. No 5º instar larval, as glândulas sericígenas ocupam um terço do corpo da lagarta e secretam fibroína, sericina e p25 na forma líquida. A fibroína, ao entrar em contato com o ar, se solidifica em finos fios de seda e a sericina funciona como um adesivo, consolidando os fios de seda para formar o casulo (Mondal et al., 2007).

Os estudos com este inseto iniciaram-se antes de 1900, sob o patrocínio da indústria da seda e, em 1930, muitas pesquisas na área da genética já haviam sido reportadas, possibilitando hoje reconhecer mais de 400 mutações que afetam diversos aspectos do organismo, como morfologia, desenvolvimento, comportamento e até mesmo as características consideradas de importância econômica (Nagaraju e Goldsmith, 2002).

No ano de 2000, após 12 anos de trabalho, duas equipes francesas, uma do Centro nacional de Pesquisas Científicas (NRS) e outra do Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas (INRA) de Lyon, em colaboração com grupos japoneses e americanos, apresentaram, após a transformação por um vetor

contendo o transposon piggyBac, o bicho-da-seda transgênico (Toshiki et al., 2000). O vetor é considerado eficiente por inserir, no patrimônio genético do inseto, genes exógenos úteis para a indústria farmacêutica, na síntese de substâncias protéicas, como colágeno, elastina e outros, e como fonte de biomateriais (Tamura et al., 2000).

Em 2002 foi desenvolvido um consórcio genômico internacional (http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/lep-genome/new_lepgenome.htm) a fim de promover a cooperação no sequenciamento de *B. mori* e de outros lepidópteros de interesse econômico. A partir do segundo semestre de 2004, foram publicados os primeiros rascunhos das sequências genômicas do bicho-da-seda, cobrindo mais de 90% dos genes conhecidos deste inseto (Mita et al., 2004; Xia et al., 2004).

Conhecer a estrutura genética de *B. mori* é essencial para o seu melhoramento, a fim de obter maior produção e qualidade da seda e, conseqüentemente, insetos mais resistentes a doenças e patógenos. Estudos recentes com *B. mori* estão sendo direcionados na busca de raças puras e híbridos resistentes ou tolerantes ao nucleopolyhedrovírus, uma vez que a infecção das lagartas provoca perdas consideráveis na economia sericícola (Daimon et al., 2007).

2.3. Vírus

Dentre os inúmeros vírus entomopatogênicos, a família Baculoviridae tem sido a mais estudada nos últimos vinte anos, devido ao seu potencial como agente de controle biológico de insetos considerados pragas. Além disso, é considerada excelente vetor para expressão de proteínas, aplicada em pesquisa básica e na medicina (Inceoglu et al., 2001; Brancalhão et al., 2002b).

A maioria dos baculovírus conhecidos foi isolada da ordem Lepidoptera, mas os baculovírus também podem ser encontrados em Hymenoptera, Díptera, Coleóptera, Orthoptera, Neuroptera, Trichoptera, bem como nas classes Crustácea e Arachnida (Federici, 1997; Ribeiro et al., 1998).

O genoma dos Baculovírus é composto por um DNA circular de fita dupla, variando de 80-200 kb (Arif, 1986) e é envolto por uma membrana ou envelope

viral em forma de bastão (30 – 60 nm x 250 – 300 nm), constituindo a partícula infecciosa do vírus, o nucleocapsídeo (Brancahã, 2002a).

A família Baculoviridae é dividida taxonomicamente em dois gêneros: nucleopolyhedrovírus, composto pelos NPVs (vírus da poliedrose nuclear), e Granulovirus (vírus da granulose), compreendendo os GV (Murphy et al., 1995).

Os GVs foram relatados, infectando somente insetos da ordem Lepidoptera, sendo sua principal característica a presença de um único nucleocapsídeo em uma cápsula ou granulo, constituída por uma matriz protéica, composta principalmente da proteína granulina. Os NPVs apresentam numerosos nucleocapsídeos no interior do corpo de oclusão ou poliedro viral, formado basicamente pela proteína poliedrina (Hajós, 2000; Inceoglu et al., 2001).

O vírus da poliedrose nuclear (NPV) é um patógeno altamente infeccioso que causa uma das mais sérias doenças virais, pois produz estruturas de resistência que são capazes de persistirem por um longo período de tempo no meio ambiente, antes de serem transportados para a superfície das folhas por meio de chuvas, ventos e ação de artrópodes (Murphy, 1995; Funk et al., 1997; Ribeiro et al., 1998).

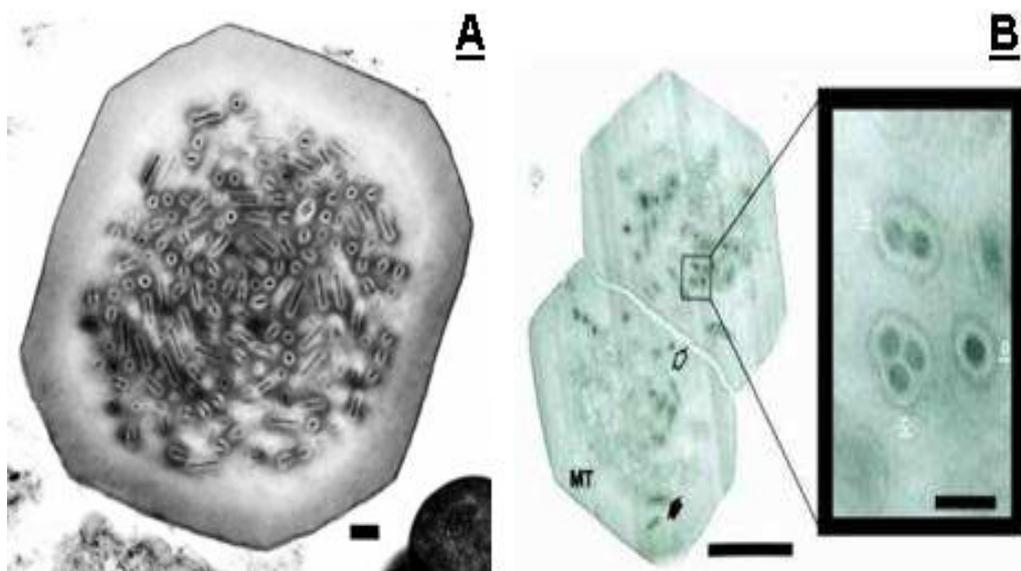


Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão do BmMNPV. (A) poliedro viral, constituído de poliedrina; (B) os subgrupos simples e múltiplos. As barras correspondem a 1µm. Fonte: Brancahã, 1998.

Os NPVs podem ser do tipo simples (SNPV – Single Nuclear Polyhedrosis Vírus), apresentando apenas um nucleocapsídeo por envelope viral (Federici e Stern, 1990; Begon et al., 1993; Richards et al., 1999; Brancalhão, 2002a); ou múltiplo (MNPV – Multiple Nuclear Polyhedrosis Vírus), exibindo vários nucleocapsídeos por envelope viral, podendo abrigar até 9 vírions, conforme a Figura 6 (Kirkpatrick et al., 1998; Boughton et al., 1999; Brancalhão, 2002a).

Os MNPVs que infectam *B. mori* foram denominados de *B. mori* nucleopolyhedrovirus (BmMNPV), cujo genoma de 130 kb totalmente seqüenciado (Gomi et al., 1999) possui a capacidade de codificar mais de 100 genes distintos. O BmMNPV foi inicialmente isolado por Bergold em 1947 (Gomi et al., 1999) e a primeira notificação observada no Brasil foi feita por Gatti et al. (1976), nas culturas híbridas do bicho-da-seda no estado de São Paulo. No estado do Paraná, a primeira descrição deste isolado foi realizada por Brancalhão (1998), quando verificou a presença do vírus nos barracões de criação. Este isolado é considerado um gênero altamente virulento, pois possui um poliedro característico, englobando múltiplos nucleocapsídeos (Washburn et al., 1999; Zhou et al., 2005).

Um das principais características dos NPVs é a presença de dois fenótipos virais distintos durante o processo de infecção. Um é representado pela forma envelopada do vírus (BV – “budded viruses”), que consiste de um único nucleocapsídeo, envolvido por um envelope viral derivado do brotamento da membrana citoplasmática da célula hospedeira para o meio extracelular, de forma polarizada, sendo denominado de vírion broto ou vírus extracelular. É responsável pelo estabelecimento da infecção sistêmica que ocorre entre as células do corpo do inseto hospedeiro. O outro fenótipo é a forma encapsulada do vírus (OV – occluded viruses ou OB – occlusion bodies), que apresenta um ou vários nucleocapsídeos envelopados imersos em uma matrix protéica (poliedrina) de forma poliédrica, sendo denominados de corpo de oclusão ou poliedro viral. Esta forma é responsável pela transmissão horizontal da doença, ou seja, de inseto para inseto (Volkman e Keddie, 1990; Murphy et al., 1995; Blissard et al., 2000).

A transmissão dos NPVs ocorre freqüentemente na fase larval, por via oral, no momento em que são ingeridos com o alimento contaminado (Figura 7) (Brancalhão, 1998; Moscardi e Souza, 2002). O alimento é conduzido pelo canal

alimentar do inseto, até atingir o epitélio do intestino médio. Neste órgão, devido à ação do pH altamente alcalino e das proteases, a matriz protéica do vírus é dissolvida e os vírions são liberados da estrutura poliédrica (Bilimoria, 1991; Tanada e Kaya, 1993). Uma vez liberados, estes vírions atravessam a matriz peritrófica e se fundem às microvilosidades das células colunares do epitélio do intestino médio, perdendo seu envelope neste processo (Granados e Williams, 1986).

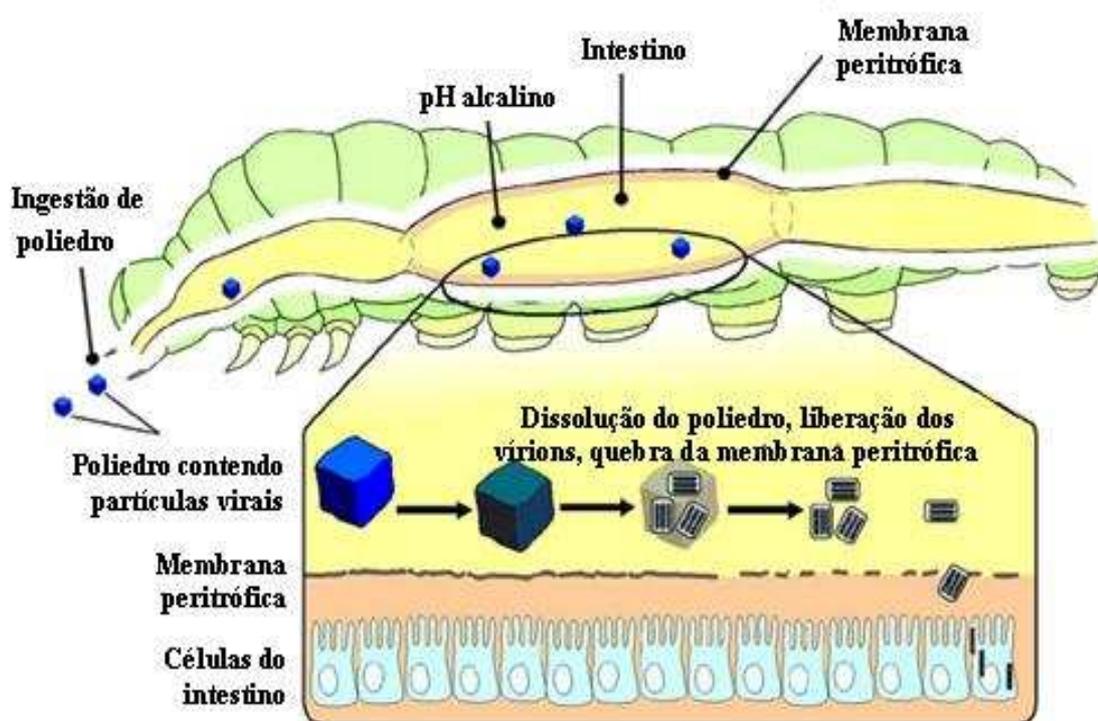


Figura 7 - Dinâmica da infecção de lagartas de *B. mori* pelo NPV.

Os primeiros sinais de disfunção observados são as mudanças na cor do tegumento e no comportamento das lagartas infectadas, como o geotropismo negativo. Quanto ao tegumento, este se torna mais fino, frágil, esbranquiçado e o inchaço das membranas intersegmentares é evidente (Figura 8), devido ao aumento no número de NPV nos núcleos das células e corpo gorduroso, representando o primeiro sinal externo definitivo da doença ocasionada pelo vírus. Devido à lise das células do corpo gorduroso e à presença de poliedros, a hemolinfa torna-se leitosa (Moscardi e Souza, 2002; Brancalhão e Ribeiro, 2003).

Os sintomas das infecções por baculovirus em lagartas de *B. mori* podem variar conforme o ínstar em que os insetos contraem a doença. Quando ocorre às vésperas da ecdise, o tegumento torna-se intumescido e brilhante, as lagartas diminuem a alimentação e atrasam o início da ecdise, podendo também não ocorrer. Quando contraem durante o período de alimentação ou após o repouso, as membranas intersegmentais ficam inchadas e muitas lagartas não conseguem confeccionar o casulo (Hanada e Watanabe, 1986; Brancalhão, 1998). Da mesma forma verifica-se que o período entre a infecção por baculovírus até a morte da lagarta doente, também pode variar de acordo com a fase de desenvolvimento do inseto, as condições ambientais, a quantidade de vírus ingerido, a virulência do patógeno, a densidade populacional das lagartas, a disponibilidade de alimento e a incidência de outros patógenos (Granados e Williams, 1986; Hanada e Watanabe, 1986).

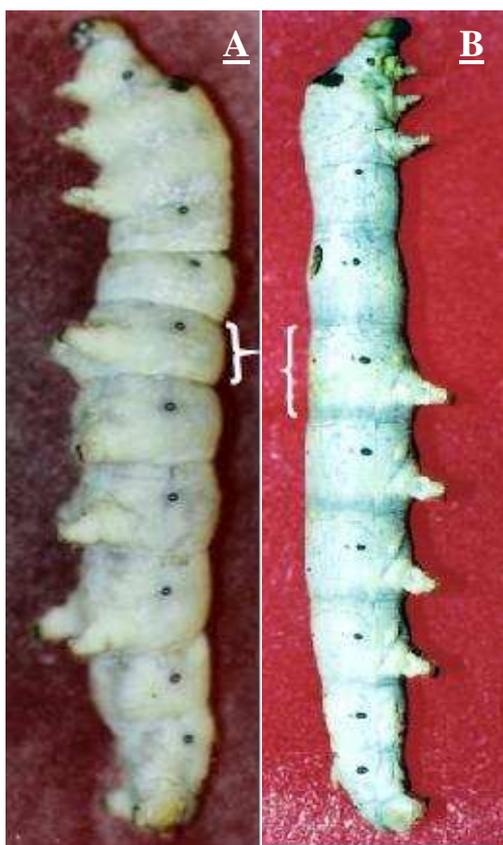


Figura 8 - Lagartas híbridas de *B. mori*. A, lagarta infectada pelo BmMNPV. Detalhe: mudança na coloração do tegumento e o inchaço das membranas intersegmentares; B, lagarta controle. Fotos cedidas por Brancalhão.

O gênero mais virulento do NPV pode causar a morte do hospedeiro entre 2 e 5 dias após a infecção, enquanto os menos virulentos demoram de 2 a 3 semanas (Granados e Williams, 1986). Segundo Sengupta (1990), as lagartas de *B.mori* infectadas com o vírus morrem em um período de 4 a 7 dias, sendo que a morte daquelas infectadas nos primeiros estágios de desenvolvimento larval leva de 4 a 5 dias e nas mais velhas entre 5 e 7 dias aproximadamente.

Com a infecção estabelecida os tecidos internos se tornam liquefeitos e são expelidos juntamente com a hemolinfa pela boca e anus (Figura 9). Com a morte das lagartas freqüentemente ocorre à ruptura do tegumento, liberando o conteúdo do corpo contaminado com milhões de poliedros virais para o meio, que podem contaminar outras lagartas sadias (Brancahã, 1998; Granados e Williams, 1986; Bilimoria, 1991; Brancahã e Ribeiro, 2003).



Figura 9 - Lagartas híbridas de *B. mori* mortas pela infecção com BmMNPV. Em detalhe a hemolinfa (setas). Fotos cedidas por Brancahã.

A virulência do isolado geográfico do Paraná, o BmMNPV, é caracterizada pelo curto tempo para a manifestação dos sintomas, que ocorre a partir do 5º dia pós inoculação e causa até 80% das mortes do inseto no estágio larval. As lagartas sobreviventes tecem um casulo de baixa qualidade e, em sua maioria, morrem no seu interior durante o estágio de pupa (Brancahã et al., 2002b).

Ao infectar insetos da ordem Lepidoptera, o NPV é poliorganotrófico e em *B. mori* foram evidenciados vários tecidos alvos, como o tecido gorduroso, o tegumento, o epitélio do intestino médio e da cárdia, traquéias, o tecido nervoso, testículo e a porção média e final da glândula sericígena (Brancahã, 2002a; Brancahã e Ribeiro, 2003; Torquato et al., 2006; Pereira et al., 2008; Ribeiro et al.; 2009; Brancahã et al., 2009).

Vários estudos estão sendo desenvolvidos para investigar as características do vírus NPV, rotas de infecção, métodos de controle de infecções, resistência do bicho-da-seda ao vírus, a herança da resistência, métodos direcionados para desenvolver raças altamente resistentes ou tolerantes a doenças (Yao et al., 2003; Rahman e Gopinathan, 2004). Dessa forma, um manejo adequado associada à obtenção de *B. mori* mais resistente a doenças deve ser um passo futuro na direção de uma melhor produtividade de seda na atividade sericícola (Zanatta, 2006).

2.4. Glândula mandibular

Os insetos possuem uma grande diversidade de glândulas distribuídas pelo corpo, mas, de um modo geral, estão situadas na região torácica, onde encontram espaço necessário para seu desenvolvimento. As secreções podem ser usadas como arma de defesa, devido à sua ação tóxica ou repelente; na reprodução como os ferormônios; na produção de produtos úteis, como a seda, cera e mel, e ainda podem ser utilizada pelos próprios insetos ou pelo homem como fonte de alimentação e de renda econômica (Borges, 2001; Marsaro Júnior et al., 2001; Inácio, 2005).

As glândulas são formadas de um ou mais tipos celulares e podem ser derivadas de células do ectoderma, endoderma ou mesoderma, sendo transformadas e adaptadas para a função secretora (Borges, 2001; Inácio, 2005). De modo geral, são classificadas como endócrinas ou exócrinas. As glândulas endócrinas não apresentam ductos. No entanto, a sua secreção hormonal é lançada na hemolinfa e distribuída para todas as partes do corpo do inseto. Já as glândulas exócrinas possuem um ducto que se abre próximo à base da mandíbula, onde são lançados os produtos da secreção (Borges, 2001; Parthasarathy e Gopinathan, 2005; Inácio, 2005).

As glândulas associadas às mandíbulas, denominadas de glândulas mandibulares, são encontradas em Apterygota, Isoptera, Orthoptera, Coleóptera, Trichoptera, Mantódea, Blattariae, Hymenoptera e larvas de Lepidoptera, alcançando nestas o seu maior desenvolvimento (Borges, 2001; Parthasarathy e Gopinathan, 2005; Inácio, 2005).

As glândulas mandibulares são originadas do ectoderme e são classificadas como exócrinas (Gracioli-Vitti e Abdalla, 2006). A função destas pode variar de acordo com o inseto e a fase do desenvolvimento, mas ainda não foi determinada na maior parte dos mesmos. Os estudos vêm demonstrando que na maioria dos insetos pesquisados como da ordem Hymenoptera, Isoptera e Dictyoptera, a glândula mandibular pode estar relacionada não só com a secreção salivar, mas também com a produção do ferormônio (Cruz-Landim, 1962; Chapman, 1998; Borges, 2001; Parthasarathy e Gopinathan, 2005).

Em *Apis mellifera* (abelhas), as glândulas mandibulares podem fazer parte do sistema salivar, atuando em conjunto com as glândulas salivares (Cruz-Landim e Abdalla, 2002). As glândulas labiais de insetos são as que recebem frequentemente esta denominação, muito embora desempenhem funções não relacionadas com a produção de saliva (Wigglesworth, 1972).

Wroniszewska (1966) sugere que a glândula mandibular de *Galleria Mellonella* secreta lipídeos que são utilizados como lubrificantes e esterases, responsáveis pelo início do processo de digestão, que se completa no intestino médio. A autora relata, ainda, que a glândula mandibular desempenha a função da glândula salivar, produzindo saliva durante a fase larval, enquanto a glândula salivar torna-se responsável pela produção de seda.

No entanto, a secreção da glândula mandibular das larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) parece ser de origem lipídica, provavelmente usada na produção de ferormônio, contrariando a idéia geral de que as glândulas mandibulares de lepidópteras, assim como de Apterygota, Isoptera, Orthoptera, Coleóptera, Trichoptera e Hymenoptera, sejam responsáveis apenas pela produção de saliva (Borges, 2001).

Segundo Marsaro Junior et al. (2001), a glândula mandibular de determinadas espécies de formigas (*Atta sexdens rubropilosa*) é conhecida pela produção de ferormônio, desencadeando o comportamento de alarme e defesa.

No entanto, em *A. rubropilosa*, as secreções dessa glândula têm sido mencionadas pelo seu efeito fungicida.

Nas abelhas rainhas, as glândulas mandibulares são responsáveis pela produção da geléia real, promovendo a união da colméia quando distribuídas às outras abelhas e auxiliando também a remover e compor a cera e o própolis, assim como a dissolver o revestimento oleoso do pólen (Vieira, 1983).

Em *Lastrimelitta limão* (Hymenoptera: Meloconidae), a secreção da glândula mandibular é utilizada para atacar outras colônias com a finalidade de obtenção de alimento (Cruz-Landim e Camargo, 1970).

Em alguns insetos, como Díptera e na maioria dos Lepidoptera, as glândulas mandibulares são funcionais somente no estágio larval, sendo totalmente histolisadas durante a metamorfose (Wroniszewska, 1966; Chapman, 1998; Parthasarathy e Gopinathan, 2004).

A forma das glândulas mandibulares é variável nos diferentes grupos de insetos, no entanto, poucas são as informações relacionadas à morfologia da glândula mandibular. Além das diferenças entre as espécies, apresentam também diferenças dentro da mesma espécie, seja por meio dos produtos secretados pelas diferentes castas ou sexos, ou no decorrer do desenvolvimento do inseto (Gracioli-Vitti et al., 2004). A morfologia da glândula mandibular foi descrita pela primeira vez em *Apis mellifera*, como estruturas pares, localizadas na cabeça, possuindo um ducto excretor que se abre na superfície interna da mandíbula, de origem ectodérmica, desenvolvendo-se durante a pupação (Cruz-Landim e Abdalla, 2002; Pavon e Mathias, 2005).

Estudos realizados com a glândula mandibular de larvas de lepidóptera de importância econômica, como a lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta do milho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae), evidenciaram que esta é uma estrutura par e tubular, de aspecto lobular, localizada latero-ventralmente ao canal alimentar (Borges, 2001; Dourado, 2004; Lopes, 2004). É importante salientar que a glândula salivar, nestes insetos, é modificada para a produção dos fios de seda, utilizados na confecção dos casulos, e a glândula mandibular assume o papel de secreção da saliva, fundamental no processo de alimentação do inseto (Borges, 2001).

A estrutura e a função da glândula mandibular em *B. mori* foram descritas por Parthasarathy e Gopinathnan (2005). Os autores verificaram que ela é formada por um epitélio secretor, onde as células apresentam um núcleo com ramificações e ductos que se abrem nas peças bucais. A função principal está relacionada com o processo de digestão, devido à secreção de enzimas digestivas como a amilase. Entretanto, a susceptibilidade ao nucleopolyhedrovírus não foi analisada até o momento

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Insetos

Lagartas híbridas de *Bombyx mori* em 4^o ínstar larval foram obtidas nas indústrias sericícolas da região noroeste do estado do Paraná, Brasil. As lagartas foram acondicionadas em caixas de papelão e mantidas em sala climatizada à temperatura de $25 \pm 1^{\circ}$ C; fotoperíodo de 14:10 (L:E) e umidade relativa do ar de aproximadamente 70 ± 10 %, sendo alimentadas três vezes ao dia, com folhas frescas de amoreira (*Morus sp.*).

3.2. Inoculação

O nucleopolyhedrovirus, subgrupo múltiplo (BmMNPV), foi obtido de lagartas híbridas de *B. mori* infectadas previamente e armazenado -20° C (Brancahão et al., 2002b). A suspensão viral foi quantificada por contagem do número de poliedros virais em câmara de Neubauer, a uma concentração de 8×10^8 COPs/ ml (COPs = Corpos de Oclusão Poliédricos).

Após a ecdise para o 5^o ínstar, as lagartas permaneceram em jejum por 24 horas e, em seguida, foram alimentadas com discos foliares de amoreira (2 cm de diâmetro), previamente pulverizados com 20 μ L de suspensão viral. Foram utilizadas 50 lagartas por experimento, 25 foram alimentadas com discos foliares com o BmMNPV e 25 com discos foliares contendo somente água, constituindo o grupo controle.

Durante a alimentação, as lagartas permaneceram confinadas individualmente em copos plásticos descartáveis, até alimentarem-se de todo o disco foliar, assegurando a ingestão de toda a suspensão viral. Ao término da alimentação, as lagartas foram acondicionadas em caixas de papelão identificadas e transferidas para sala climatizada, recebendo diariamente folhas de amoreira isentas do BmMNPV. O mesmo procedimento foi realizado com as lagartas controles.

Após a inoculação, diariamente, os sintomas manifestados pelas lagartas foram observados e anotados em fichas próprias, sendo a sintomatologia utilizada

como parâmetro adicional para confirmação da infecção pelo BmMNPV. O experimento foi realizado em duplicata.

3.3. Identificação da glândula mandibular

Após a inoculação com intervalos de 24 horas do 2º ao 9º dia, as lagartas foram anestesiadas com éter etílico, posicionadas dorsalmente sobre placa de Petri preenchida parcialmente com parafina solidificada. Cada lagarta foi fixada com alfinetes entomológicos na cabeça e falsas pernas caudais e dissecada no sentido longitudinal, desde a região anal até a altura da cabeça, com auxílio de tesoura oftalmológica, sob microscópio estereoscópico. Após a identificação, o par de glândula mandibular foi removido da lagarta e transferido para lâmina de vidro, sendo corado posteriormente com azul de toluidina a 3% para análise geral de sua morfologia.

3.4. Preparação microscópica

Em intervalos de 24 horas do 2º ao 9º dia pós-inoculação (dpi), as glândulas mandibulares foram coletadas e acondicionadas em frascos individualizados contendo fixador DuBosq Brasil (Beçak e Paulete, 1976) por 24 horas à 4º C. O corpo gorduroso e a traquéia foram coletados para servirem como controle positivo da infecção, uma vez que a sua citopatologia já é descrita. Ao término deste tempo, os tecidos foram lavados em álcool 70%, prosseguindo as etapas histológicas de rotina: desidratação, diafanização, emblocamento em parafina e microtomia, conforme protocolo estabelecido por Brancalhão (1998). Os cortes seqüenciais foram efetuados em um micrótomo Olympus CUT4055, na espessura variando entre 5 e 7 µm.

As lâminas obtidas foram desparafinizadas, hidratadas e submetidas às técnicas de coloração de Hematoxilina e Eosina - HE (Junqueira e Junqueira, 1983) para análise geral do epitélio glandular; técnica de Azan modificado para corpos de oclusão viral (Hamm, 1966; Brancalhão et al., 2000) para análise da susceptibilidade e da infecção causada pelo BmMNPV; e técnica citoquímica do PAS (Ácido periódico de Schiff) para polissacarídeos neutros (Junqueira e Junqueira, 1983).

As lâminas foram analisadas em um microscópio de luz Olympus BX60 e fotomicrografadas no Olympus DP71. Lâminas de material controle foram submetidas às mesmas preparações utilizadas para o material inoculado com o BmMNPV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sintomas manifestados pelas lagartas híbridas de *B. mori* nos tempos analisados após a inoculação com o BmMNPV confirmaram uma infecção clássica pela poliedrose nuclear e a virulência do isolado geográfico. Os primeiros sinais de disfunção metabólica surgiram a partir do 3º dpi, com a diminuição progressiva na alimentação, gradual mudança na coloração do tegumento, passando de branco para branco amarelado e geotropismo negativo, entre o 5º e 6º dpi. Com a evolução da doença, no final da infecção, entre o 7º e 8º dpi, a fragilidade do tegumento acentuou-se, ocasionando sua ruptura, liberando a hemolinfa com inúmeros poliedros virais no meio, caracterizando, assim, um importante mecanismo de dispersão do patógeno (Brancahã et al., 2002b; Brancahã e Ribeiro, 2003; Torquato et al., 2006; Ribeiro et al., 2009).

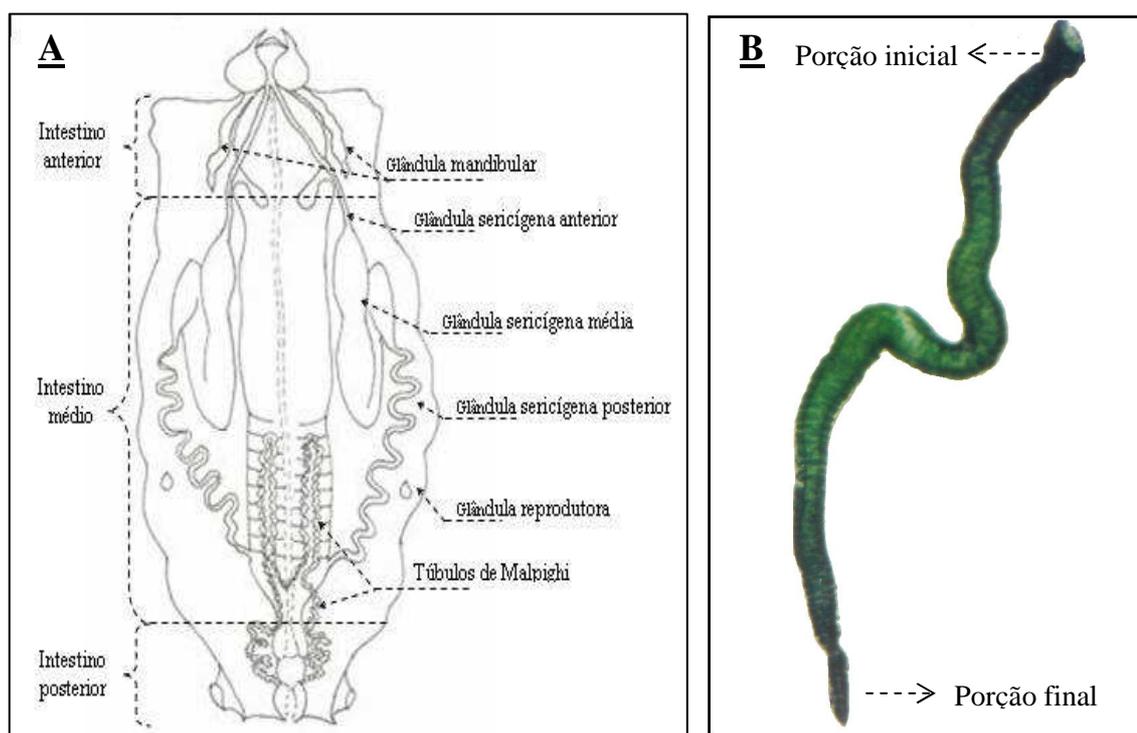


Figura 10 - (A) Representação esquemática da anatomia interna da lagarta híbrida de *B. mori* em 5º instar larval, dissecada ventralmente. (B) Morfologia da glândula mandibular de lagarta híbrida de *B. mori* em 5º instar vista dorsalmente ao microscópio estereoscópico, com aumento de 20 X. Coloração: azul de toluidina a 3%.

Durante as dissecações das lagartas híbridas de *B. mori*, inoculadas com o BmMNPV, observou-se que as glândulas mandibulares apresentaram aspecto

macroscópico semelhante ao das lagartas controle, sendo estruturas pares e independentes, suavemente amareladas, localizadas paralelamente ao tubo digestório e à glândula sericígena, estando em íntima relação com as mandíbulas das lagartas, estendendo-se até os primeiros segmentos torácicos, onde termina o intestino anterior (Figura 10A). Ao contrário da glândula sericígena, que apresenta uma divisão morfológica e funcionalmente distinta em região anterior, média e posterior (Parthasarathy e Gopinathan, 2005), a glândula mandibular apresenta-se como um tubo cilíndrico de tamanho aparentemente uniforme, afinando-se na extremidade final. (Fig. 10B).

A histologia do tecido glandular revelou que as células da glândula mandibular são formadas por um epitélio simples, constituído por células secretoras grandes com citoplasma homogêneo, núcleos volumosos e septados (Figura 11 A e B). Segundo Parthasarathy e Gopinathan, (2005), a glândula inteira é composta por aproximadamente 330 células e esse número permanece constante durante todo o desenvolvimento larval, atingindo seu tamanho máximo no 3º dia do 5º ínstar, sem nenhum aumento no número de células, ou seja, sem divisões celulares ou nucleares, sendo que o DNA nuclear passa por ciclos de endomitoses.



Figura 11, cont.

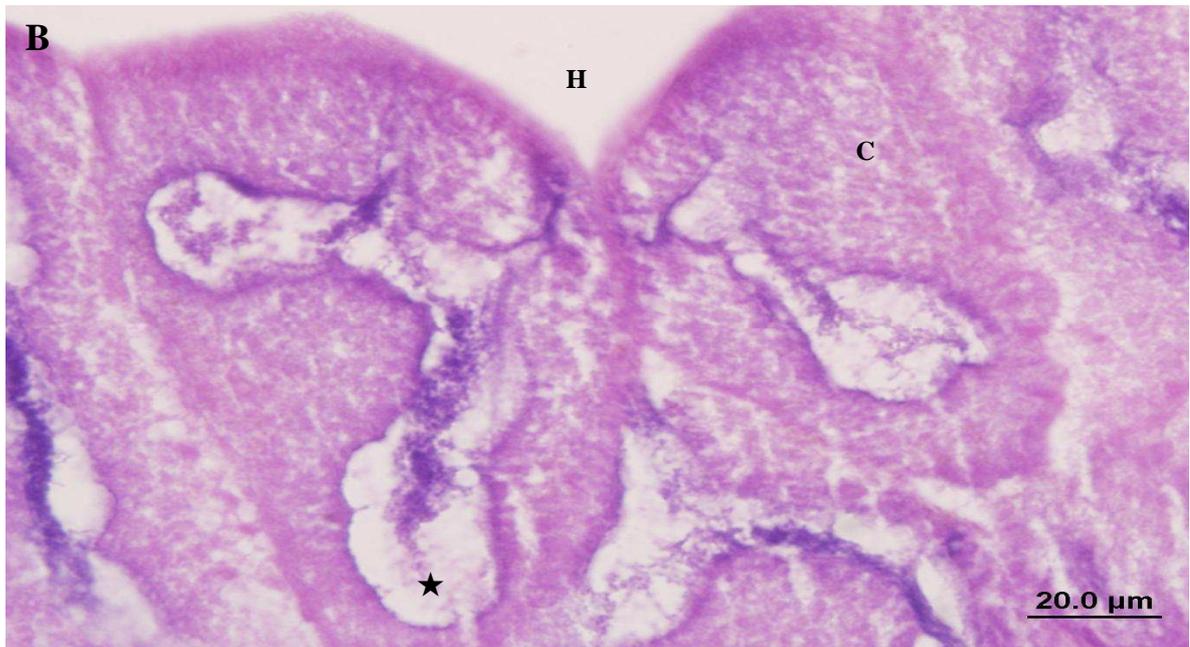


Figura 11 - Corte histológico longitudinal da glândula mandibular de lagartas híbridas de *B. mori* em 5º instar larval, sadias. (A) Visão panorâmica (B) detalhe do núcleo septado. Núcleo (★), Citoplasma (C), Lúmen (L), Hemocele (H), Porção final da glândula mandibular (seta). Coloração: Hematoxilina e Eosina - HE.

As análises citopatológicas do epitélio da glândula mandibular das lagartas híbridas de *B. mori* em 5º instar, não evidenciaram nenhum indício de infecção pelo BmMNPV nos tempos analisados, do 2º ao 9º dpi, revelando que suas células não são susceptíveis ao vírus (Figura 12).

No entanto, as células do corpo gorduroso e das traquéias que serviram como controle positivo para confirmação da virulência do inóculo, revelaram a partir do 5º dpi, características citopatológicas semelhantes com aquelas descritas na literatura para os tecidos alvos do BmMNPV (Figura 12), confirmando a susceptibilidade das lagartas híbridas de *B. mori* e a virulência do isolado geográfico do Paraná, o BmMNPV (Brancahão et al., 2002b; Brancahão e Ribeiro, 2003; Torquato et al., 2006; Pereira et al., 2008; Ribeiro et al., 2009; Brancahão et al., 2009).

No núcleo das células do corpo gorduroso infectado, observou-se inicialmente a formação do viroplasma, local onde os nucleocapsídeos são produzidos. Estes adquirem um envelope membranoso, envolvendo mais de um nucleocapsídeo no caso do subgrupo múltiplo (Castro et al., 1999; Brancahão,

2002a; Torquato et al., 2006). Os nucleocapsídeos envelopados ou vírions são agrupados em torno de uma matriz protéica, constituída pela poliedrina, formando assim os poliedros virais, que se acumulam no núcleo celular com o avanço do ciclo reprodutivo viral, gerando uma acentuada hipertrofia nuclear.



Figura 12 - Corte histológico transversal da glândula mandibular de lagartas híbridas de *B. mori* em 5º instar larval, no 6º dpi com BmMNPV. Glândula mandibular (**GM**), Núcleo (★), Citoplasma (C), Lúmen (L), Corpo gorduroso (**CG**), Núcleos hipertróficos com poliedros virais em vermelho, Hemocele (H). Coloração: Azan modificado para Corpos de Oclusão Virais.

O tecido gorduroso é considerado um dos principais alvos do BmMNPV e, segundo Brancalhão (1998), sua infecção pode estar relacionada à alteração na coloração do tegumento das lagartas, pois a infecção destas células desencadeia um aumento no conteúdo de fosfolipídios, de colesterol, e de ácidos graxos livres na hemolinfa que, somados à presença dos poliedros, se torna leitosa conferindo o aspecto branco-amarelado ao tegumento (Adams e McClintock, 1991; Brancalhão, 1998).

Segundo Engelhard et al. (1994); Kirkpatrick et al. (1994); Rahman e Gopinathan (2004) e Torquato et al. (2006), a traquéia é considerada o órgão responsável pela dispersão da infecção viral nos insetos. No entanto, outros autores, como Stoltz et al. (1973); Granados e Lawler (1981); Washbur et al.

(1995); Barrett et al. (1998) e Silveira et al. (2004), atribuem esta função à hemolinfa. Por outro lado, Soares e Ribeiro (2005) admitem a hipótese de que ambas as células, traqueal e hemócitos disseminam a infecção de NPV nas lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja). De fato, durante o processo infeccioso, vários vírions, gerados de outros tecidos que são alvo do BmMNPV, são liberados para a hemolinfa.

A partir do 8º dpi, foi verificada a presença de poliedros no meio extracelular, circundando as células da glândula mandibular, mas nenhum sinal de infecção no seu epitélio (Figura 13). A presença destes poliedros livres evidencia a citólise dos tecidos alvos do BmMNPV, finalizando o ciclo infeccioso do vírus nas células hospedeiras, liberando grande quantidade de poliedros, vírions e restos celulares no meio extracelular, que são liberados para o meio externo com a ruptura do tegumento (Torquato et al., 2006; Pereira et al., 2008). Este tempo coincide com os dados da sintomatologia, representando um importante mecanismo de dispersão viral, uma vez que as lagartas continuam se deslocando de forma aleatória (Brancahã e Ribeiro, 2003).



Figura 13 - Corte histológico transversal da glândula mandibular de lagartas híbridas de *B. mori* em 5º instar larval, no 8º dpi com BmMNPV. Núcleo da glândula mandibular (★), Citoplasma (C), Lúmen (L), Membrana plasmática (▼), Restos celulares (seta) com a presença de poliedros virais maduros em vermelho dispersos no meio extracelular, Hemocele (H). Coloração: Azan modificado para Corpos de Oclusão Virais.

Na análise do comportamento metabólico das células da glândula mandibular de *B. mori* inoculadas com o BmMNPV, assim como no material controle, foi verificada reação positiva à técnica citoquímica do PAS, evidenciando uma matriz extracelular fibrosa, lâmina basal (LB) intacta e bem delimitada, voltada para a hemolinfa e envolvendo a glândula mandibular (Figura 14). A LB é constituída por proteínas e glicoproteínas, que se aderem à superfície externa de muitos tipos de células (Ryerse e Reisner, 1985). Em Lepidoptera, a LB possui uma organização características nos diversos tecidos onde é encontrada, diferindo de acordo com o ínstar do inseto, assim como o estágio de desenvolvimento de cada tecido (Sedlak e Gilbert, 1979; Locke, 1986), podendo atuar como uma barreira seletiva na dispersão de vírus entomopatogênicos (Etzel, 1973).

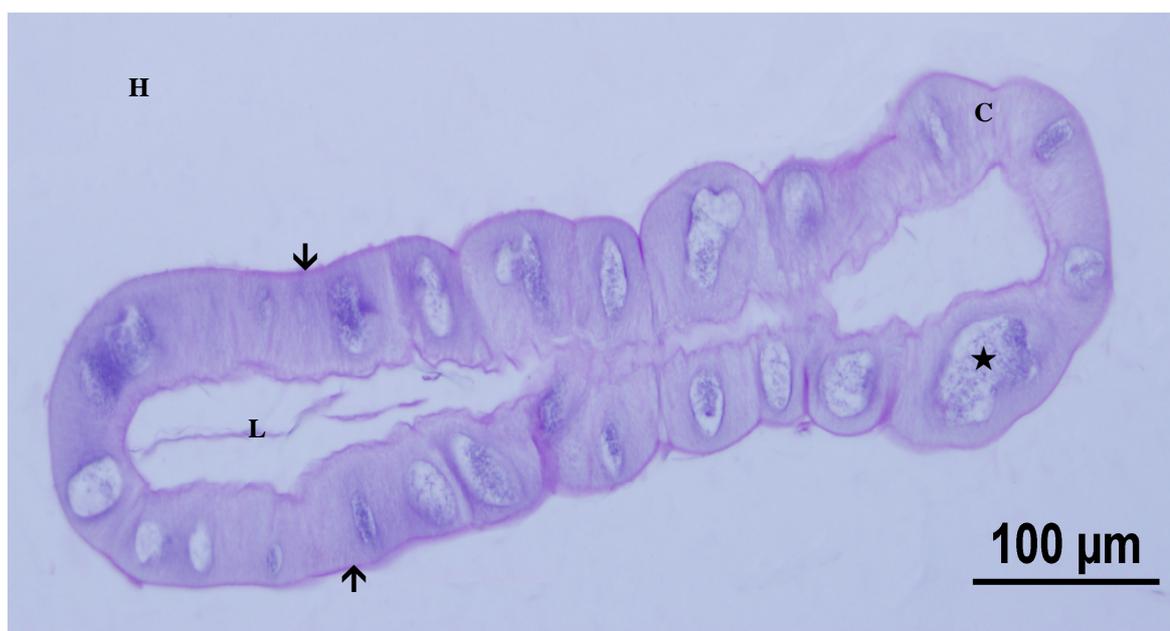


Figura 14 - Corte histológico transversal da glândula mandibular de lagartas híbridas de *B. mori* em 5º ínstar larval, no 8º dpi com BmMNPV. Lâmina basal (setas), Núcleo (★), Citoplasma (C), Lúmen (L), Hemocele (H). Coloração: Detecção pela técnica de PAS de polissacarídeos neutros.

Os estudos têm demonstrado que a organização e a espessura da LB parecem influenciar na passagem de partículas inteiras em certos tecidos (Torquato et al., 2006). Reddy e Locke (1990) descreveram o comportamento de partículas de ouro sobre a LB de alguns tecidos de lagartas de *Calpodés ethlius* L. (Lepidoptera: Hesperiiidae) no 5º ínstar. Esses autores verificaram que partículas

menores de 15 nm atravessavam a LB de certos tecidos como gorduroso, tegumentar e pericardial, enquanto partículas maiores que 6 nm foram retidas na LB da glândula sericígena, nos túbulos de Malpighi e nos músculos.

Segundo Bradley (1985), a LB pode atuar como um filtro seletivo, uma vez que esta estrutura é constituída por poros, partículas maiores que esses, não atravessam a LB. De acordo com Brancalhão et al. (2009), os vírions do isolado geográfico do BmMNPV apresentam um tamanho médio de 95 nm de diâmetro e 315 nm de comprimento. Provavelmente, estes sejam maiores que os poros presentes na lâmina basal da glândula mandibular, pois, como verificado por Reddy e Locke (1990), os poros presentes na lâmina basal da glândula sericígena é de aproximadamente 6 nm, tendo a glândula mandibular a mesma origem embrionária, impossibilitando a passagem dos vírions presentes na hemolinfa do inseto e oriundos de outros tecidos infectados para as células da glândula mandibular. Desta forma, a presença da LB pode atuar como uma barreira seletiva à passagem dos vírions, impedindo ou retardando a infecção da glândula mandibular pelo BmMNPV.

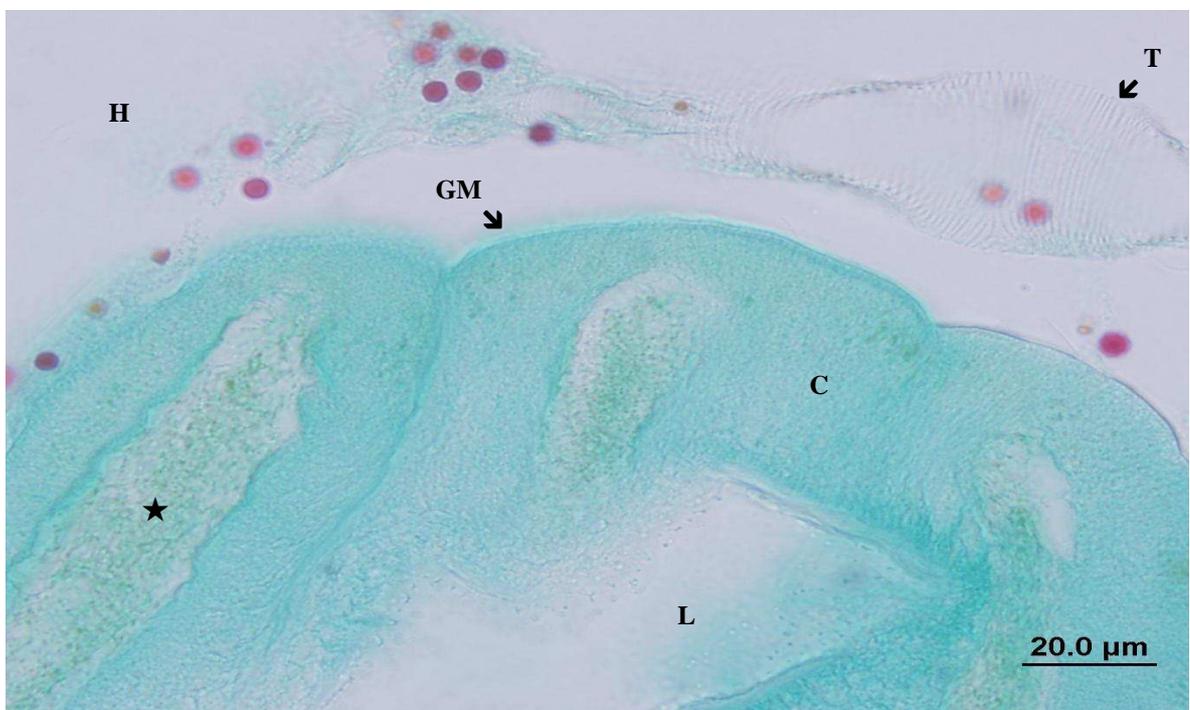


Figura 15 - Corte histológico transversal da glândula mandibular de lagarta híbrida de *B. mori* em 5º instar larval, no 8º dpi com BmMNPV. Traquéia (T), Glândula mandibular (GM), Núcleo (★), Citoplasma (C), Lúmen (L), Hemocele (★), poliedros virais (vermelho). Coloração: Azan modificado para Corpos de Oclusão Virais.

Durante a análise citopatológica dos cortes seriados, não foi observada a penetração do sistema traqueal na glândula mandibular de *B. mori*, assim como foi observado no tecido gorduroso (Figura 15).

O sistema traqueal é alvo do NPV e considerado um importante órgão dispersor da infecção viral no corpo do inseto (Engelhard et al., 1994; Rahman e Gopinathn, 2004), pois apresenta algumas características que facilitam o processo infeccioso, como a sua distribuição nos tecidos, intimamente associados às células; a sua adaptação de acordo com o crescimento tecidual através dos traqueoblastos, que, por sua vez, ao atravessarem a LB, permitem que os vírions rompam esta barreira seletiva de proteção, enquanto o epitélio traqueal forma um sincício, que auxilia na dispersão viral, permitindo ao vírus atingir os tecidos e provocar a infecção sistêmica (Elazar et al., 2001).

Desta forma, a ausência de infecção das células da glândula mandibular de *B. mori* pode estar relacionada com a não penetração do sistema traqueal e pela presença da LB, que proporciona uma barreira seletiva para o vírus presente na hemolinfa, não permitindo o seu acesso ao órgão.

As glândulas mandibulares de *B. mori* não apresentaram sinais de infecção pelo BmMNPV, assim como observado por Brancalhão et al. (2009), quando analisaram a região anterior da glândula sericígena, a qual não apresentou infecção pelo BmMNPV. Estes dados podem estar relacionados com a mesma origem embrionária desses tecidos, pois ambos são derivados de células comuns da ectoderme ou devido às suas características morfológicas semelhantes (Gracioli-Vitti e Abdalla, 2006).

Contudo, não se pode descartar o fato de que os tempos pós-inoculação analisados podem não terem sido suficientes para a replicação viral, uma vez que a LB pode retardar grandemente a infecção em determinados tecidos (Pereira et al., 2008). No entanto, não foi possível prosseguir com os experimentos em períodos pós inoculação mais avançados devido à morte de aproximadamente 80% das lagartas e ao restante, 20%, construíram casulos de baixa qualidade e, em sua maioria, morreram no seu interior na fase de pupa.

A ausência de infecção na glândula mandibular de *B. mori*, assim como de outros tecidos que não são alvos do BmMNPV, pode estar relacionada ainda aos mecanismos de co-evolução viral, pois uma infecção severa das células resulta em lise celular e degeneração tecidual, sendo que a morte precoce do

inseto tornar-se-ia inevitável. Assim, tal infecção estaria contrariando a estratégia comum do vírus, que é a de prolongar o estágio larval, a fim de aumentar o número da progênie viral (Tanada e Kaya, 1993). E também ao mecanismo da expressão diferencial dos genes virais, inseridos no genoma das células hospedeiras, uma vez que os NPVs apresentam caracteristicamente uma replicação assíncrona (Adams e McClintock, 1991; Brancalhão, 2002a; Torquato et al., 2006; Brancalhão et al., 2009). Hess e Falcon (1987) registraram também que certas células são programadas para desviar dos mecanismos de invasão e/ou replicação, mostrando resistência a determinados vírus.

5. CONCLUSÃO

Os sintomas manifestados pelas lagartas híbridas de *B. mori* em 5º instar, inoculadas experimentalmente com o BmMNPV, confirmaram uma infecção clássica pela poliedrose nuclear e a virulência do isolado geográfico do BmMNPV, pois as lagartas manifestaram todos os sintomas da doença.

Este estudo evidenciou que as células da glândula mandibular das lagartas híbridas de *B. mori* não são susceptíveis à infecção viral por este isolado. A ausência de infecção das células da glândula mandibular pode ser decorrente de vários fatores, como a presença da LB, atuando como uma barreira seletiva; a não penetração direta do sistema traqueal no tecido, uma vez que este órgão é considerado um importante dispersor da infecção nos insetos, ou ainda a expressão gênica diferencial do genoma viral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.R.; MCCLINTOCK, J.T. Baculoviridae. Nuclear polyhedrosis viruses. Part 1. Nuclear polyhedrosis viruses of insects. In: Adams, J.R.; Bonami, J.R. (eds.) **Atlas of invertebrate viruses**. Florida: CRC Press, 1991. p. 89-180.

ARIF, B.M. The structure of the viral genome. **Current Topics Microbiology and Immunology**, 131:21-29, 1986.

BARRETT, J.W.; BROWNRIGHT, A.J.; PRIMAVERA, M.J.; RETNAKARAN, A.; PALLI, S.R. Concomitant primary infection of the midgut epithelial cells and the hemocytes of *Trichoplusia ni* by *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **Tissue and Cell.**, 30:602-616, 1998.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Editora Livros Técnicos e Científicos, 1976. 306 p.

BEGON, M.K.B.; HAJI DAUD, P.; YOUNG, R.E. HOWELLS. The invasion and replication of a granulosis virus in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* an electron microscope study. **Journal of Invertebrate Pathology**, 61:281-295, 1993.

BILIMORIA, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, 1991. 72p.

BORGES, A. R. **Morfologia ultra-estrutural da glândula mandibular de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) em larvas normais e parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. Botucatu: UNESP, 2001. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Zoologia).

BOUGHTON, A.J.; HARRISON, R.L.; LEWIS L.C.; BONNING, B.C. Characterization of a nucleopolyhedrovirus from the black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. 74:289-294, 1999.

BLISSARD, G.W.; BLACK, B. ; CROOK, N.; KEDDIE, B.A.; POSSEE, R.D.; RHORMANN, G.F.; THEILMANN, D.; VOLKMAN, L. **Baculoviridade**. In: VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; McGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R; WICKNER, R.B. *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press, 2000. p. 195-202.

BRADLEY, TIMOTHY J. Excretory system: structure and physiology. In: Kerkut, G.A.; Gilbert, L.J. **Comprehensive Insect physiology and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press. 421-462, 1985.

BRANCALHÃO, Rose Meire Costa. **Nucleopolyhedrovirus em *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), no Estado do Paraná**. Curitiba: UFPR, 1998. 99p. Tese (Doutorado pelo Departamento de Zoologia - UFPR).

BRANCALHÃO, R.M.C.; SOUZA, V.B.V.; FORTES, J.C. Método simplificado para detecção de Nucleopolyhedrovirus em *Bombyx mori* L. 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 67: 89-92, 2000.

BRANCALHÃO, R.M.C. Virus Entomopatogênico no bicho-da-seda: taxonomia e citopatologia causada por *Nucleopolyhedrovirus* em células de *Bombyx mori*. **Biotecnologia** 24:54-58, 2002a.

BRANCALHÃO, R.M.C.; SOUZA, V.B.V.; SOARES, M.A.M. Infecção causada por Nucleopolyhedrovirus nas células gordurosas de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 69:57-63, 2002b.

BRANCALHÃO, R.M.C.; RIBEIRO, L.F.C. Citopatologia da infecção causada por BmMNPV no tegumento de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, 6:15-20, 2003.

BRANCALHÃO, R.M.C.; TORQUATO, E.F.B.; FERNANDEZ, M.A. Cytopathology of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) silk gland caused by multiple nucleopolyhedrovirus. **Genetics and Molecular Research**, 8:162-172, 2009.

CASTRO, M.E.B.; SOUZA, M.L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J.C.M.; RIBEIRO, B. Biologia molecular de Baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34:1733-1761, 1999.

CHAPMAN, R.F. **Section A: The head, ingestion and utilisation of the food. Chapter III - The Alimentary Canal and Chapter IV - Digestion and Absorption.** p. 46-75. In: CHAPMAN, R.F. The insect structure and function. New York: American Elsevier Publishing Company, 4ª ed., 788 p. 1998.

CRUZ-LANDIM, Carminda C. Anatomia e histologia comparadas das glândulas mandibulares dos meliponídeos. **Arquivos do Museu Nacional**, 52:79-84, 1962.

CRUZ-LANDIM, C.; CAMARGO, I.J.B. Light and electron microscope studies of the mandibular gland of *Lestrimelitta limão* (Hymenoptera, Meliponidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 30: 5-12, 1970.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. **Glândulas exócrinas das abelhas.** Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2002. 181p.

DAIMON, T.; KATSUMA, S.; SHIMADA, T. Mutational analysis of active site residues of chitinase from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Virus Research**, 1:168-175, 2007.

DINGLE, J.G.; HASSAN, E.; GUPTA, M.; GEORGE, D.; ANOTA, L.; BEGUM, H. Silk production in Australia. **Rural industries research and Development Corporation**, ISBN 1741512085 Publication 05/145, 2005. 113p.

DOURADO, L.A. Aspectos morfológicos da glândula mandibular de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em 5º instar larval. (Monografia de conclusão Curso de Graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia). Cascavel. UNIPAR, 2004. 32p.

ELAZAR, M.; RAFI, L.; ZLOTKIN E. Targeting of na expressed neurotoxin by its recombinant baculovirus. **Journal of Experimental Biology**, 204:2637-2645, 2001.

Engelhard, E.K.; Kam-Morgan, I.N.W.; Washburn, J.O.; Volkman, L.E. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M. nuclear polyhedrosis virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences** . USA, 91:3324-3327, 1994.

ETZEL, L. **Purification and partial characterization of the Granulosis virus of codling moth wit emphasis on trans-ovum and transstadial transmission.** 1973. 57p. Ph. D. thesis, University of California, Berkeley, 1973. 57p.

FEDERICI, B.A.; STERN, V.M. Replication and occlusion of a granulosis virus in larval and adulto midgut epithelium of the western grape leaf skeletonizer, *Harrisina brillians*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 56:401-414, 1990.

FEDERICI, B.A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L.K. (ed). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 33-59.

FERNANDEZ, M.A.; CIFERRI, R.R.; PATUSSI, E.V.; PEREIRA, M.F.; FELIPES, J.; BRAVO, J.P.; ZANATTA, D.B.; GOUVEIA, F.S.; BALANI, V.A.; Utilização da biotecnologia na sericicultura brasileira. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 35:56-61, 2005.

FONSECA, A.S.; FONSECA, T.C. **Cultura da amoreira e criação do bicho-da-seda.** São Paulo: Nobel, 1986. p.182-191.

FUNK, C.J.; BRAUNAGEL, S.C.; ROHRMANN, G.F. Baculovirus structure. In: MILLER, L.K. (ed). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 7-32.

GATTI, I.M.; SILVA, D.M.; MATYS, J.C.; NOGUEIRA, N.L.; OLIVEIRA, A.R. Constatação ao microscópico eletrônico de poliedroses em bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). In: **V COLÓQUIO BRASILEIRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA**. Piracicaba - São Paulo, 5: 88-89, 1976.

GOMI, S.; MAJIMA, K.; MAEDA, S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, 80:1323-1337, 1999.

GRACIOLI-VITTI, L.F.; ABDALLA, F.C.; CRUZ-LANDIM. Caracterização das glândulas mandibulares nas diferentes classes de adultos de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Neotropical Entomology**, 6:703-708, 2004.

GRACIOLI-VITTI, L.F.; ABDALLA, F.C. Comparative ultrastructure of the mandibular gland in *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) workers and males. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**. 23:415-424, 2006.

GRANADOS, R.R., LAWLER, K.A. In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. **Virology**, 108:297-308, 1981.

GRANADOS, R.R.; WILLIAMS, K.A. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. p. 89-108.

HAJÓS, J.P. **Frequency of baculovirus recombination and baculovirus-mediated gene silencing in insects**. 2000. Doctoral Dissertation-Structural biochemistry doctoral program, Eotvös Loránd University, Budapest, Hungary.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (eds.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.

HAMM, J.J. A modified azan staining technique for inclusion body viruses **Journal of Invertebrate Pathology**, 8:125-126, 1966.

HANADA, Y.; WATANABE, J.K. 1986. **Manual de criação do bicho-da-seda**. Maringá: COCAMAR, 1986. 224p.

HESS, R.T.; FALCON, L.A. Temporal events in the invasion of the codling moth, *Cydia pomonella*, by a granulosis virus: an electron microscope study. **Journal of Invertebrate Pathology**. 50:85-105, 1987.

INCEOGLU, A.B.; KAMITA, S.G.; HINTON, A.C.; HUANG, QIHONG.; SEVERSON, T.F.; KANG, K.D.; HAMMOCK, B.D. Recombinant baculoviruses for insects control. **Pest Management Science**, 57:981-987, 2001.

INÁCIO, C.V. **Anatomia do tubo digestório, da glândula salivar e da glândula mandibular de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em 6º instar larval**. Cascavel: UNIPAR, 2005. 51p. (Monografia de conclusão Curso de Graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia).

JUNQUEIRA, L.C.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983. 123 p.

KIRKPATRICK, B.A.; WASHBURN, E.K.; ENGELHARD, E.K.; VOLKMAN, L.E. Primary infection of insect tracheae by *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, 203:184-186, 1994.

KIRKPATRICK, B.A.; WASHBURN, J.O.; VOLKMANN, L.E. AcMNPV pathogenesis and developmental resistance in fifth instar *Heliothis virescens*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 72:63-72, 1998.

KURIN, R. "The Silk Road:Connecting Cultures, Creating Trust". *Talk Story*, Fall. **Smithsonian Center for Folklife and Cultural Heritage**, 21:1–11, 2002.

LOCKE, M. The development of the plasma membrane reticular system in the fat body of an insect. **Tissue and Cell**, 18:853-867, 1986.

LOPES, E.A. **Morfologia da glândula mandibular de *Anticarsia gemmatilis* em 4º estágio do desenvolvimento larval (Lepidoptera: Noctuidae)**. Trabalho monográfico. Cascavel. UNIPAR, 2004. 29p. (Monografia de conclusão Curso de Graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia).

MARSARO JÚNIOR, A.L.; DELLA LUCIA, T.M.C.; BARBOSA, L.C.A.; MAFFIA, A.; MORANDI, A.B. Systematics, Morphology and Physiology. **Neotropical Entomology**, 30:403-406, 2001.

MITA, K.; KASAHARA, M.; SASAKI, S.; NAGAYASU, Y.; YAMADA, T.; KANAMORI, H.; NAMIKI, N.; KITAGAWA, M.; YAMASHITA, H.; YASUKOCHI, Y.; KADONO-OKUDA, K.; YAMAMOTO, K.; AJIMURA, M.; RAVIKUMAR, G.; SHIMOMURA, M.; NAGAMURA, Y.; SHIN-I, T.; ABE, H.; SHIMADA, T.; MORISHITA, S.; SASAKI, T. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. **DNA Research**, 11:27-35, 2004.

MONDAL, M; TRIVEDI, K; NIRMAL KUMAR, S. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, 5: 63-76, 2007.

MOSCARDI, F.A.; SOUZA, M.L. Baculovirus para o controle de pragas. **Biotecnologia**, 24: 22-29, 2002.

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. **Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses**. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Springer-Verlag, Wien, 586 p.
NAGARAJU, J. Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*. **Current Science**, 78:151-161, 2000.

NAGARAJU, J.; GOLDSMITH, M.R. Silkworm genomics-progress and prospects. **Current Science**, 83:415-425, 2002.

PARTHASATHY, R.; GOPINATHAN, K.P. Comparative analysis of the development of the mandibular salivary glands and the labial silk glands in the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. **Gene Expression Patterns**, 5:323-339, 2005.

PAVON, L.F.; MATHIAS, M.I.C. Ultrastructural studies of the mandibular glands of the mínima, media and soldier ants of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel 1908) (Hymenoptera: Formicidae). **Micron**, 36:449-460, 2005.

PEREIRA, E.P.; CONTE, H.; RIBEIRO, L.F.C.; ZANATTA, D.B.; BRAVO, J.P.; FERNANDEZ, M.A.; BRANCALHÃO, R.C. Cytopathological process by multiple nucleopolyhedrovirus in the testis of *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 99:1-7, 2008.

RAHMAN, M.M.; GOPINATHAN, K.P. Systemic and in vitro infection process of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Virus Research**. 101:109-118, 2004.

REDDY, J.T.; LOCKE, M. The size limited penetration of gold particles through insect basal laminae. **J. Insect Physiol.**, 36:397-407, 1990.

RIBEIRO, B.M.; SOUZA, M.L.; KITAJIMA, E.W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S.B.; (ed). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 481- 507.

RIBEIRO, L.F.C.; BRANCALHÃO, R.M.C.; TORQUATO, E.B.; FERNANDEZ, M.A. Susceptibility of the *Bombyx mori* cárdia cells to nucleopolyhedrovirus, multiple subgroup, BmMNPV. **Journal of Invertebrate Pathology**, 100:195-198, 2009.

RICHARDS, A.R.; SPEIGHT, M.; CORY, J. Characterization of a nucleopolyhedrovirus from the vapourer moth, *Orgyia antiqua* (Lepidoptera Lymantriidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 74,137-142,1999.

RYERSE, J.S.; REISNER, M. A new technique for the isolation and purification of the basal lamina from insects tissues. **Tissues and Cell.**, 17: 287-292, 1985.

SANTOS, S.A. **Análise da orf 10 e 14 do *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus subgrupo múltiplo, BmMNPV**. 2009. 43p. Universidade Estadual de Maringá: Maringá - UEM, Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

SEDLAK, B.J.; GILBERT, E L.I. Correlation between epidermal cell structure and endogenous hormone titers during the fifth larval instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Tissue and Cell.**, 11: 642-653, 1979.

SENGUPTA, K.; KUMAR, P.; BAIG, M.; GOVINDAIA, H. **Handbook on pest and disease control of mulberry and silkworm**. Bangkok, Thailand: UNESCAP - United Nations Economic and Social Commission for Asia and the Pacific-1990. 88 p.

SILVEIRA, E.B.; CORDEIRO, B.A.; RIBEIRO, B.M.; BÃO, S.N. Morphological characterization of *Anticarsia gemmatalis* M nucleopolyhedrovirus infection in haemocytes from its natural larval host, the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Tissue and Cell.**, 36:171-180, 2004.

SOARES, J.S.; RIBEIRO, B.M. Pathology of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected by two recombinant *A. gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedroviruses. **Revista de Microbiologia**, 156:263-269, 2005.

SOUZA, M.L.; CASTRO, M.E.; SILBER, W.; RIBEIRO, Z.M.A. MOSCARDI, F. Caracterização de Baculovírus utilizados no controle de pragas. **Biotecnologia**, 24:18-20, 2002.

STOLTZ, D.B.; PAVAN, C.; CUNHA, A.B., Nuclear polyhedrosis virus: a possible example of de novo intracellular membrane morphogenesis. **Journal of General Virology**, 19:145-150, 1973.

TAMURA, M.; NATORI, K.; KOBAYASHI, M.; MIYAMUTA, T.; TAKEDA, N. Interaction of recombinant Norwalk virus particles with the 105-kilodalton cellular binding protein, a candidate receptor molecule for virus attachment. **Journal of General Virology**, 74:11589-11597, 2000.

TANADA, Y.; H.K. KAYA. DNA-viral infections: Baculoviridae, Chapter 6, p. 171-244. In: TANADA, Y.; H.K. KAYA (eds.). **Insect Pathology**. San Diego, Academic Press, 666p, 1993.

TOSHIKI, T.; CHANTAL, T.; CORINNE, R.; TOSHIO, K.; EAPPEN, A.; MARI, K.; NATUO, K.; JEAN-LUC, T.; BERNARD, M.; GERARD, C. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon derived vector. **Nature Biotechnology**, 18:81-84, 2000.

TORQUATO, E.F.B.; Miranda Neto, M.H.; Brancalhão, R.M.C. Nucleopolyhedrovirus Infected Central Nervous System Cells of *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae). **Neotropical Entomology**, 35:070-074, 2006.

VIEIRA, M.I. **Criar abelhas é lucro certo**: manual prático. São Paulo: Nobel, 1983. 176 p.

VOLKMANN, L.E.; KEDDIE, B.A. Nuclear polyedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology**, 1:249-256, 1990.

WASHBURN, J.O.; KIRKPATRICK, B.A., VOLKMAN, L.E. Comparative pathogenesis of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus in larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. **Virology**, 209:561-568, 1995.

WASHBURN, J.O.; LYONS, E.H.; HASS-STAPLETON, E.J.; VOLKMAN, L.E., Multiple nucleocapsid packaging of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus accelerates the onset of systemic infection in *Trichoplusia ni*. **Virology**, 73: 411-416, 1999.

WATANABE, J.K.; YAMAOKA, R.S.; BARONI, S.A. **Cadeia produtiva da seda**: diagnósticos e demandas atuais. Londrina/PR: IAPAR. p.30-33, 2000.

WATANABE, H. Genetic resistance of the silkworm, *Bombyx mori* to viral diseases. **Current Science**, 83:493-446, 2002.

WIGGLESWORTH, V.B. **The principles of insect physiology**. London: Chapman and Hall, 1972. 887p.

WRONISZEWSKA, A. Mandibular glands of the wax moth larva, *Galleria mellonella* (L.). **Journal of Insect Physiology**, 12:509-22, 1966.

XIA, Q.; ZHOU, Z.; LU, C.; CHENG, D.; DAI, F.; LI, B.; ZHAO, P.; ZHA, X.; CHENG, T.; CHAI, C.; PAN, G.; XU, J.; LIU, C.; LIN, Y.; QIAN, J.; HOU, Y.; WU, Z.; LI, G.; PAN, M.; LI, C.; SHEN, Y.; LAN, X.; YUAN, L.; LI, T.; XU, H.; YANG, G.; WAN, Y.; ZHU, Y.; YU, M.; SHEN, W.; WU, D.; XIANG, Z.; YU, J.; WANG, J.; LI, R.; SHI, J.; LI, H.; LI, G.; SU, J.; WANG, X.; LI, G.; ZHANG, Z.; WU, Q.; LI, J.; ZHANG, Q.; WEI, N.; XU, J.; SUN, H.; DONG, L.; LIU, D.; ZHAO, S.; ZHAO, X.; MENG, Q.; LAN, F.; HUANG, X.; LI, Y.; FANG, L.; LI, C.; LI, D.; SUN, Y.; ZHANG, Z.; YANG, Z.; HUANG, Y.; XI, Y.; QI, Q.; HE, D.; HUANG, H.; ZHANG, X.; WANG,

Z.; LI, W.; CAO, Y.; YU, Y.; YU, H.; LI, J.; YE, J.; CHEN, H.; ZHOU, Y.; LIU, B.; WANG, J.; YE, J.; JI, H.; LI, S.; NI, P.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; ZHENG, H.; MAO, B.; WANG, W.; YE, C.; LI, S.; WANG, J.; WONG, G.K.; YANG, H. Biology Analysis Group. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). **Science**, 306:1937-1940, 2004.

YAO, Q.; LIM, W.; WANG, Y.; WANG, W.B.; LU, J.; DONG, Y.; CHEN, K.P. Screening of molecular markers for NPV resistance in *Bombyx mori* L. (Lep., Bombycidae). **Journal of Applied Entomology**, 127:134-136, 2003.

ZANATTA, D.B. **Identificação de marcadores RAPD em linhagens de *Bombyx mori***. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006. 59p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

ZANETTI, R. **Bicho-da-seda, notas de aula de ENT 110 – Sericicultura**. Disponível em: [http://www.den.ufla.br/Professores/Ronald_Zanetti_Bonetti_Filho/ Disciplinas/Graduação/ ENT 110 - Apicultura e Siricicultura/Programa de aulas: Bicho-da-Seda \(Biologia, Anatomia e Morfologia\).pdf](http://www.den.ufla.br/Professores/Ronald_Zanetti_Bonetti_Filho/ Disciplinas/Graduação/ ENT 110 - Apicultura e Siricicultura/Programa de aulas: Bicho-da-Seda (Biologia, Anatomia e Morfologia).pdf). DEN/UFLA, Lavras-MG, 2005a. p. 1-9. Acesso dia: 18/05/2009.

ZANETTI, R. **Doenças e pragas do bicho-da-seda, notas de aula de ENT 110 – Sericicultura**. Disponível em: http://www.den.ufla.br/Professores/Ronald_Zanetti_Bonetti_Filho/ Disciplinas/Graduação/ENT 110 - Apicultura e Siricicultura/Programa de aulas: Pragas e Doenças do Bicho-da-Seda.pdf. DEN/UFLA, Lavras-MG, 2005b. p. 1-5. Acesso dia: 18/05/2009.

ZHOU, M.; SUN, X.; SUN, X.; VLAK, J.M.; HU, Z.; WERF, W.V. Horizontal and vertical transmission of wild-type and recombinant *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, 89:165-175, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)