

ESPOROS UNINUCLEADOS E BINUCLEADOS DE *VAIRIMORPHA NECATRIX*: PATOGENICIDADE A *SPODOPTERA LATIFASCIA* E SENSIBILIDADE À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA¹

MARIA GORETTI ARAÚJO DE LIMA², JEFFREY C. LORD³ e DONALD W. ROBERTS⁴

RESUMO - O objetivo desta pesquisa foi determinar a patogenicidade relativa de esporos binucleados e uma mistura de binucleados mais uninucleados de *Vairimorpha necatrix* (Protozoa: Microspora) a lagartas de *Spodoptera latifascia* (Lepidoptera: Noctuidae) e comparar os efeitos da radiação ultravioleta sobre os referidos esporos. A patogenicidade de *V. necatrix* foi testada através da alimentação de lagartas com discos de folíolos de caupi pulverizados com doses de $3,0 \times 10^4$, $1,2 \times 10^4$, $7,4 \times 10^3$ e $4,3 \times 10^3$ esporos/lagarta. Os tempos medianos (TL₅₀) indicaram valores respectivos de 16,6, 20,1, 23,1 e 29,9 dias para esporos binucleados, e 23,5, 25,9, 28,0 e 38,4 dias para a mistura, sendo estes últimos significativamente mais altos ($P < 0,05$) que os primeiros, sugerindo que, possivelmente, os esporos uninucleados são menos patogênicos a *S. latifascia* que os esporos binucleados. O efeito da radiação ultravioleta na viabilidade dos esporos foi avaliado, expondo os esporos (sobre folíolos de caupi) a diferentes tempos (zero, três, cinco e sete horas) à radiação. A viabilidade dos esporos diminuiu com o aumento do tempo de exposição, em ambos os esporos estudados, sendo que, após sete horas, os esporos binucleados e a mistura destes com uninucleados ainda causaram 21% e 20% de infecção de lagartas de *S. latifascia*, respectivamente.

Termos para indexação: microspora, microsporídios, caupi, *Vigna unguiculata*.

UNINUCLEATE AND BINUCLEATE SPORES OF *VAIRIMORPHA NECATRIX*: PATHOGENICITY TO *SPODOPTERA LATIFASCIA* AND SENSITIVITY TO ULTRAVIOLET RADIATION

ABSTRACT - The objective of this study was to compare binucleate and a mixture of binucleate and uninucleate spores of *Vairimorpha necatrix* (Protozoa: Microspora) in terms of survival under ultraviolet light and pathogenicity to larvae of *Spodoptera latifascia* (Lepidoptera: Noctuidae). Larval feeding on cowpea leaflet disks at doses of 3.0×10^4 , 1.2×10^4 , 7.4×10^3 , and 4.3×10^3 spores/larvae resulted in LT₅₀s of 16.6, 20.1, 23.1, and 29.9 days for binucleate spores and 23.5, 25.9, 28.0, and 38.4 days for the mixture, respectively. The values for the mixture were significantly higher ($P < 0.05$) than for the binucleates, suggesting that uninucleate spores are less pathogenic to *S. latifascia* than binucleate spores. The spore viability decreased with the increase of exposure time, in both spores studied. After seven hours of exposure to short wave ultraviolet light, the binucleate spores and the mixed spores were associated with 21% and 20% infection, respectively.

Index terms: microspora, microsporidia, cowpea, *Vigna unguiculata*.

INTRODUÇÃO

Dentre os protozoários, os microsporídios mostram-se bastante promissores para o controle de la-

gartas. Entre estes, destaca-se *Vairimorpha necatrix* (Protozoa: Microspora) que é patogênico a diversos lepidópteros, e inócuo a insetos benéficos (Maddox et al. 1981, Fuxa & Brooks 1979). Uma alternativa viável seria a utilização deste patógeno como agente de controle microbiológico de lagartas de *Spodoptera latifascia* (Lepidoptera: Noctuidae), inseto polífago, causador de danos em várias culturas, inclusive em caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (Silva & Magalhães 1980).

Na literatura foram encontrados somente trabalhos realizados com esporos binucleados de *V. necatrix* em termos de patogenicidade (Chu & Jaques 1979, Maddox et al. 1981) e sensibilidade a fatores relacionados ao ambiente externo (Maddox et al. 1981). Este microsporídeo também tem espo-

¹ Aceito para publicação em 22 de dezembro de 1988.

Parte da Dissertação apresentada pelo primeiro autor, como um dos requisitos ao grau de Mestre em Agronomia, área de concentração Fitossanidade - ESAL, Lavras, MG.

² Enga. - Agra., M.Sc., Bolsista da EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP)/Boyce Thompson Institute, Caixa Postal 179, CEP 74000 Goiânia, GO.

³ Biólogo, Ph.D., Insects Affecting Man and Animals Lab., P.O. Box 14565, Gainesville, FL. 32604, USA.

⁴ Agronomist, Ph.D., Institute Boyce Thompson, Tower Rd., Universidade de Cornell, Ithaca, New York 14853, EUA.

ros uninucleados, que são produzidos à temperatura de 20°C (Pilley 1976). Sabe-se que a radiação ultravioleta pode resultar em curvas de inativação para entomopatógenos, muito semelhantes às obtidas sob luz solar (Ignoffo et al. (1977).

Esta pesquisa teve por objetivo comparar a patogenicidade dos esporos binucleados e mistura de binucleados e uninucleados de *V. necatrix* a lagartas de *S. latifascia*, e sensibilidade desses dois tipos de esporos à radiação ultravioleta.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada de agosto de 1985 a fevereiro de 1986, no Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), da EMBRAPA, em Goiânia, Goiás.

Produção do inóculo

O protozoário *V. necatrix*, utilizado nesta pesquisa, foi originalmente isolado de *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae), em Illinois, EUA. Uma suspensão de esporos deste foi pulverizada diretamente sobre folíolos de caupi, numa câmara para pulverização, com bico em cone cheio, com 0,3 ml da suspensão (79,0 esporos/mm²). Com auxílio de um vazador de 11 mm de diâmetro, três a quatro discos de cada folíolo pulverizado foram retirados e colocados, individualmente, em placas-de-Petri (3,4 cm x 1,0 cm) contendo papel de filtro umedecido. Em cada placa foi colocada uma lagarta de *S. latifascia*, no terceiro ínstar, submetida a um jejum de oito a doze horas. Após 24 horas, as lagartas que se alimentaram de pelo menos 75% do disco do folíolo foram transferidas para tubos de vidro, de fundo chato, com 2,5 cm de diâmetro e 8,5 cm de comprimento, contendo uma camada de dieta artificial (Poitout & Bues 1970), até o nível de 4 cm.

Das lagartas inoculadas, algumas permaneceram de dez a quinze dias em temperatura de 26 ± 2°C para a produção de esporos binucleados. Outras foram mantidas de 25 a 30 dias sob a temperatura de 20 a ± 2°C, para a produção de esporos uninucleados, quando houve produção simultânea dos dois tipos de esporos. A separação dos tipos de esporos não foi possível, porque suas densidades eram idênticas.

Para cálculo da percentagem de esporos uninucleados e binucleados, da mistura, foram preparadas lâminas coloridas com Giemsa para contagem em microscópio ótico com aumento de quatrocentas vezes. Os esporos uninucleados, envoltos pela membrana pansporoblástica, apresentam-se em grupos de oito. Quebrando-se essa membrana, podem-se distinguir os esporos uninucleados dos binucleados, pelo aspecto morfológico, já que são mais curtos e largos (Maddox & Sprengel 1978). A proporção de esporos uninucleados para binucleados foi de 87:13.

Bioensaio

Após a pulverização, os folíolos foram usados para alimentação das lagartas, de acordo com a metodologia descrita na produção do inóculo, mas o acondicionamento delas foi feito à temperatura de 26 a ± 2°C.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com nove tratamentos, que constaram das doses: 3,0 x 10⁴, 1,2 x 10⁴, 7,4 x 10³ e 4,3 x 10³ esporos/lagarta das duas suspensões e a testemunha. Cada tratamento constou de quatro repetições com oito a dez lagartas por repetição.

As avaliações foram feitas diariamente, registrando-se o número de lagartas mortas até 31 dias após a inoculação. Estas foram perfuradas na região pleural, de onde foi retirada uma gota da hemolinfa para observação ao microscópio ótico, com um aumento de quatrocentas vezes. Foram consideradas infectadas as lagartas com esporos na hemolinfa e/ou no tecido gorduroso.

Os tempos letais foram calculados através do método de próbito, de acordo com o SAS Institute (1982).

Influência da luz ultravioleta

Folíolos de caupi foram pulverizados com uma suspensão de esporos de *V. necatrix* de modo a se obter 6,0 x 10² esporos/mm² de superfície foliar, utilizando-se a mesma câmara de pulverização anteriormente descrita. Após a pulverização os folíolos foram transferidos para câmara asséptica contendo uma lâmpada germicida (GE 220 volts - 30 watts) e irradiados à distância de 80 cm em tempo crescente de exposição: 0, 3, 5 e 7 horas.

Após cada período de exposição, os folíolos foram oferecidos às lagartas, conforme metodologia utilizada no bioensaio. As avaliações foram efetuadas diariamente, até o décimo segundo dia após as inoculações, sacrificando-se as lagartas que ainda estavam vivas, seguindo o mesmo método utilizado no bioensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Patogenicidade

As relações entre o tempo de inoculação e a mortalidade de *S. latifascia* para as doses de esporos binucleados e mistura de binucleados e uninucleados podem ser observadas nas Fig. 1 e 2, respectivamente. Notou-se que, para as doses utilizadas, os tempos letais medianos (TL₅₀) obtidos com os esporos binucleados foram menores que os da mistura. Tudo indica que os esporos binucleados são mais virulentos que os da mistura dos esporos uninucleados e binucleados, sendo este o primeiro relato envolvendo esporos uninucleados.

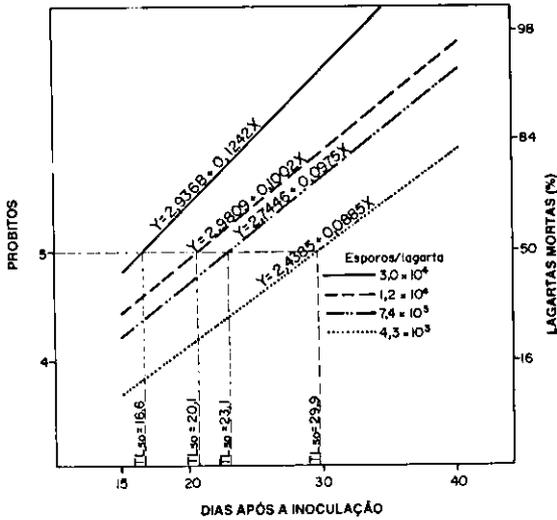


FIG. 1. Relação entre a mortalidade de lagartas de *S. latifascia* inoculadas com diferentes doses de esporos binucleados de *V. necatrix* e o tempo decorrido desde a inoculação. Temperatura $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

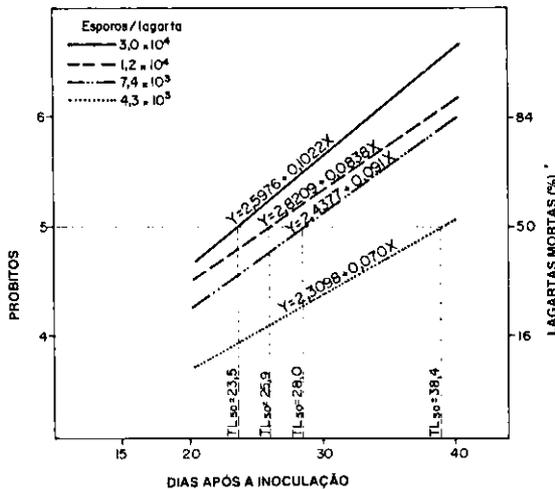


FIG. 2. Relação entre a mortalidade de lagartas de *S. latifascia* inoculadas com diferentes doses da mistura de esporos uninucleados e binucleados de *V. necatrix* e o tempo decorrido desde a inoculação. Temperatura $\pm 26^{\circ}\text{C}$.

Os TL_{50} 's foram maiores que os citados por Chu & Jaques (1979) com a espécie *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). Segundo estes autores, os tempos letais medianos (TL_{50}) para as doses 5×10^3 e 5×10^4 esporos/lagarta foram de treze e seis dias, respectivamente.

Influência da radiação ultravioleta

Com o aumento do tempo de exposição, constatou-se uma diminuição na viabilidade dos esporos nas duas suspensões testadas (Fig. 3). Após sete horas de exposição, os esporos binucleados e a mistura de esporos ainda causaram infecção em 21% e 20% das lagartas de *S. latifascia*, respectivamente.

Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as duas suspensões de esporos utilizadas, com relação ao número de lagartas mortas e vivas infectadas, em nenhum dos períodos de exposição à radiação ultravioleta testados.

Estes resultados não concordam com os obtidos por Wilson (1974), quando testou esporos de (*Nosema fumiferanae* sobre folhas de cereja, com uma concentração de $1,0 \times 10^7$ esporos/ml a lagartas de *Malacosoma pluviale* (Lepidoptera: Lasiocam-

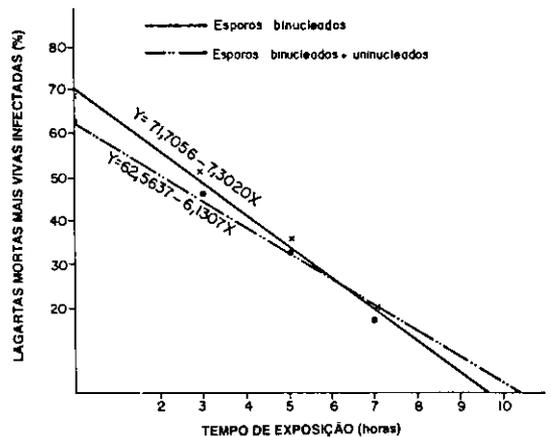


FIG. 3. Influência da radiação ultravioleta na patogenicidade de esporos binucleados e mistura de esporos uninucleados e binucleados de *V. necatrix*, para lagartas de *S. latifascia*. CNPAF, Temperatura $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

pidae), observando que, de três a quatro horas após a exposição à radiação ultravioleta, os esporos foram completamente inativados.

Mesmo usando uma dose de $2,5 \times 10^5$ esporos/lagartas, os resultados concordam com os de Kaya (1977), o qual notou que seis horas após a exposição à radiação ultravioleta de onda curta sobre folhas de feijão, os esporos binucleados desse microsporídio, com uma concentração de $5,0 \times 10^6$ esporos/ml, infectaram 50% das lagartas de *Estigmene acrea* (Lepidoptera: Arctiidae) no quarto instar. Por outro lado, os resultados obtidos nesta pesquisa não estão de acordo com os citados por Ignoffo et al. (1977), os quais encontraram uma meia-vida de 2,1 horas de *V. necatrix* aplicado sobre ovos de *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) por imersão numa suspensão contendo $3,7 \times 10^9$ esporos/ml. Estas diferenças podem estar relacionadas com as doses ou os métodos de aplicação dos esporos e os substratos. Na presente pesquisa, como na de Kaya (1977), foram utilizadas suspensões de esporos pulverizados sobre folíolos novos de feijão e caupi, enquanto na de Ignoffo et al. (1977) os ovos foram submersos em suspensões de esporos. Segundo Kaya (1977), a pubescência dos folíolos de feijão pode ter oferecido certo grau de proteção aos esporos de *V. necatrix* contra a radiação solar.

Os resultados obtidos mostraram uma influência negativa da radiação ultravioleta na sobrevivência dos esporos binucleados e na mistura de binucleados e uninucleados, apesar de estes últimos possuírem um envoltório de membrana pansporoblástica, a qual provavelmente não ofereceu proteção a esta radiação. Assim, é importante o estudo de métodos de aplicação ou formulação incluindo componentes com propriedades protetoras, de modo a aumentar a eficiência de *V. necatrix* como agente de controle microbiológico.

Pode-se concluir que os esporos binucleados são mais vantajosos que a mistura, em termos de patogenicidade e facilidade na produção.

AGRACECIMENTOS

Os autores agradecem ao convênio EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão

e Instituto Boyce Thompson, através do Programa Cooperativo de Apoio à Pesquisa (CRSP - Title XII/USAID), que dispensou todo o apoio necessário à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- CHU, W.H. & JAQUES, S.P. Pathologie d'une microsporidiose de l'arpenouse du chou, *Trichoplusia ni* (Lep.: Noctuidae) par *Vairimorpha necatrix*. *Entomophaga*, 24(3):229-35, 1979.
- FUXA, J.R. & BROOKS, W.M. Effects of *Vairimorpha necatrix* in sprays and corn meal on *Heliothis* species in tobacco, soybean and sorghum. *J. Econ. Entomol.*, 72(2):169-72, 1979.
- IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; SIKOROWSKI, P. P.; SUTTER, G.; BROOKS, W.M. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. *Environ. Entomol.*, 6(3):411-5, 1977.
- KAYA, H.K. Survival of spores of *Vairimorpha necatrix* (= *Nosema*) (Microsporida: Nosematidae) exposed to sunlight, ultraviolet radiation, and high temperature. *J. Invertebr. Pathol.*, 30(2):192-8, 1977.
- MADDOX, J.V.; BROOKS, W.M.; FUXA, J.R. *Vairimorpha necatrix*, a pathogen of agricultural pests: potential for pest control. In: BURGESS, H.D. *Microbial control of pests and plant diseases*. London, Academic, 1981. p.587-94.
- MADDOX, J.V. & SPRENKEL, R.K. Some enigmatic microsporidia of the genus *Nosema*. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.*, 11:65-84, 1978.
- PILLEY, B.M. A new genus, *Vairimorpha* (Protozoa: Microsporida) for *Nosema necatrix* 1965: Pathogenicity and life cycle in *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 28:177-83, 1976.
- POITOUT, S. & BUES, R. Élevage de plusieurs espèces de lépidoptères Noctuidae sur milieu artificiel riche et sur milieu artificiel simplifié. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 2:79-91, 1970.
- SAS INSTITUTE, Cary, USA. SAS user's guide; statistics. Cary, 1982. 584p.
- WILSON, G.G. The effects of temperature and ultraviolet radiation on the infection of *Choristoneura fumiferana* and *Malacosoma pluviale* by a microsporidan parasite, *Nosema (Perezia) fumiferanae* (Thom). *Can. J. Zool.*, 52:59-63, 1974.