

Recebido em 30 de Dezembro de 1976

**Nota sobre o aparecimento de uma  
infecção provocada pela *Mattesia dispora*  
Naville numa cultura laboratorial de  
*Plodia interpunctella* (Hb.)  
(Lepidoptera, Phycitiidae) (\*)**

por

ISABEL MARIA DUARTE DE MELO RAPOSO  
Licenciada em Biologia

e

MARIA TERESA ESCADA CARDOSO CABRAL  
Engenheiro Silvicultor da Direcção dos Recursos Florestais

## 1. INTRODUÇÃO

Por ser muito pouco estudado entre nós o papel de Protozoários no controle natural de populações de insectos, bem como a possibilidade dos mesmos serem utilizados como meio microbiológico de luta, vamos referir, embora muito sucintamente, estes aspectos, para depois passarmos à descrição de uma infecção provocada pela *Mattesia dispora* Naville sobre uma cultura de *Plodia interpunctella* (Hb.) que constitui o motivo da presente nota.

---

(\*) — Trabalho realizado na Secção de Entomologia do Instituto Superior de Agronomia, no âmbito do Projecto de Investigação TLA/5 subsidiado pelo Instituto de Alta Cultura.

Dos primeiros trabalhos de que temos conhecimento referentes a infecções provocadas por Protozoários em insectos destaca-se o de Pasteur, que em 1870 identificou o *Nosema bombycis* Naegli como agente causador da «pebrina», doença que dizimava as culturas de bichos de seda na região de Lyon.

As observações feitas por aquele cientista e os métodos por ele preconizados para eliminar a doença permitiram que se prosseguisse a Sericultura, de outro modo comprometida naquela região. Mas as infecções produzidas por Protozoários em insectos são extensivas tanto aos insectos úteis, caso citado, como aos que constituem pragas, ocupando-se aliás destas últimas a maioria dos trabalhos referentes a tal assunto.

Segundo Ignoffo (1970), eram conhecidos até esta data 210 espécies de Protozoários que viviam parasitando ou associados a artrópodos. Destes, apenas duas dezenas foram propagadas em culturas massivas de insectos com vista a um possível uso como insecticidas, e apenas três foram até agora aplicados com sucesso como meio de luta: a *Thelohania hyphantriae*, a *Mattesia grandis* e a *Malameba locustiae*.

Esta tão grande discrepância entre o número de espécies identificadas e aquelas consideradas com possibilidade de serem usadas em luta biológica deve-se a vários factores que passamos a referir.

1) Poucas das espécies identificadas possuem elevado poder patogénico, sendo necessário uma grande concentração do parasita para se produzirem epizootias. Não obstante, foi reconhecida a importância do seu papel na limitação natural das populações de insectos, pois provocam geralmente uma lenta debilitação com a diminuição do potencial biótico do insecto.

2) A sua produção em massa é morosa e dispendiosa, pois apenas se consegue fazer a sua propagação «in vivo», visto dependerem dos seus hospedeiros para a obtenção de energia. É por isso necessário fazer a sua multiplicação sobre culturas de insectos em massa. Algumas das espécies podem existir no entanto, durante algum tempo, no exterior sob formas de resistência.

3) Desconhecem-se os ciclos de vida e o modo de infecção de muitas das espécies identificadas que poderão eventualmente ser interessantes do ponto de vista do controle biológico.

4) Não tem sido possível provar em todos os casos a inocuidade dos Protozoários para outras espécies, além da que se pretende com-

bater, tanto entomológicas como pertencentes até a outras classes. Inicialmente, considerou-se que a infecção causada pelos Protozoários era específica de um hospedeiro ou até de alguns dos seus tecidos, mas sabe-se hoje que isto não é generalizável e que algumas das espécies são pouco selectivas.

O problema da inocuidade dos microorganismos a empregar como meio microbiológico de luta é uma das principais preocupações dos adeptos desta forma de combate, sendo grande a actividade desenvolvida para estudar este assunto nos últimos anos. A homologação dos produtos comerciais à base de microorganismos assenta em provas de inocuidade dos mesmos para outras formas de vida, sobretudo animais superiores. Segundo Heimpel (1971), «infelizmente membros da ordem Microsporídea foram encontrados infectando Vertebrados e Crustáceos». O mesmo autor cita os seguintes casos de Protozoários associados com animais de outras classes para além dos insectos: *Nosema* spp., detectada em tumores do cérebro e outras infecções em Roedores, *Plistophora nyotrophica*, causando elevada mortalidade no *Bufo bufo*, e ainda a existência dos géneros *Nosema*, *Glugea* e *Plistophora* como parasitas de peixes, tanto marinhos como de água doce. O género *Plistophora* aparece ainda no caranguejo azul e em decápodos.

Ainda segundo aquele autor, «nos insectos dos produtos armazenados ocorrem com frequência infecções causadas por Protozoários, mas nenhum destes microorganismos causou doenças no homem ou nos animais domésticos. Isto pode ser uma indicação de que estes protozoários não são patogénicos para os vertebrados». Quanto a nós, esta afirmação carece de demonstração cabal, dado o perigo que as infecções dos protozoários que atacam pragas dos produtos armazenados pode eventualmente representar para a saúde pública.

A par deste modo de encarar o estudo dos Protozoários com vista à sua utilização como meio de luta há outro, quanto a nós tão ou até mais importante, que consiste na apreciação do seu papel no controle natural das populações dos insectos.

No estudo da dinâmica das populações de insectos é frequente avaliar as causas da mortalidade ao longo de cada ciclo (variação intracíclica), e os Protozoários são muitas vezes citados como contribuindo para o abaixamento das populações. A sua propagação pode fazer-se verticalmente (às gerações sucessivas) e horizontalmente (aos indivíduos da mesma geração), dando-se nalguns hospedeiros os

dois tipos de propagação, e neste caso grande parte da população é afectada.

Mas poucas espécies são altamente patogénicas, raramente destruindo as funções vitais e provocando antes uma debilitação que vai afectar, como dissemos, o potencial biótico.

Há, no entanto, notícia de epizootias causadas por Protozoários, caso citado por Franz e Huger (1971), que detectaram na Alemanha Central elevada mortalidade numa população de *Tortrix viridana* L. devido a uma infecção de *Nosema tortricis*. Estes autores preconizam a necessidade de se estudar o estado sanitário das populações a tratar para se evitar medidas de luta inúteis.

Em muitas outras pragas florestais, como *Choristoneura fumiferana*, *Lymantria dispar* e *Thaumetopoca pityocampa*, tem sido considerado de grande importância o controle natural produzido por microorganismos em determinadas fases gradológicas.

No nosso país, a existência de microsporídeos, pelo menos em *L. dispar* e *T. pityocampa*, é frequente, não se tendo no entanto avaliado o seu poder patogénico nem mesmo, nalguns casos, procedida à sua identificação completa. Foi notada a sua ocorrência em ensaios laboratoriais com *Bacillus thuringiensis*, encontrando-se muitas das larvas mortas por esta bactéria, também altamente infectada com Protozoários. Também na *Tortrix viridana* e *E. chrysorrhoea* já foram notadas infecções devidas a Protozoários em locais onde a população tinha atingido níveis elevados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material

Numa cultura, laboratorial de *Plodia interpunctella* (Hb.) existente no I. S. A., com vista à obtenção de material didáctico, foi notado pelo preparador encarregado da sua manutenção que alguns dos frascos produziam poucos adultos, morrendo a maior parte das larvas antes de passarem a pupa. Foi-nos dado este material para observação e verificámos a existências de numerosas larvas e pupas mortas, que foram sujeitas às observações normais em diagnóstico de doenças de insectos.

## 2.2. Métodos

Foram feitos esfregaços de numerosas larvas pelos dois processos que se descrevem a seguir.

A) Processo em que a *fixação* dos esfregaços, uma vez cobertos com algumas gotas de metanol durante, pelo menos, um minuto, foi seguida por secagem ao ar. A *coloração* foi efectuada com solução de Giemsa em tampão fosfato (pH 7), durante 12 horas, ou, mais frequentemente, até ao dia seguinte; lavagem no tampão.

Esta técnica permitiu observar ao microscópio todas as fases do ciclo de vida do Protozoário em estudo, tornando bastante evidentes os núcleos, corados de escuro, e o citoplasma, azul-arroxeadado. Muitas das lâminas assim tratadas foram fotografadas e nelas efectuámos as medições dos esporos para comparação dos tamanhos médios com os já descritos. Usou-se para tal um ocular micrométrica de 7x, com uma ampliação total de 350x.

B) No outro processo também por nós usado, os esfregaços, feitos em lamelas, foram imediatamente *fixados* em solução de Bouin aquoso, durante 6 horas, e, em seguida, lavados com etanol a 70°.

Para a *coloração* seguiu-se a técnica da Hematoxilina de Heidenham: depois de levados até à água, os esfregaços colocaram-se em mordente (solução de álumen de ferro a 4%) durante 30 a 60 minutos; então, lavaram-se em água e coraram-se durante o mesmo tempo com o reagente de Heidenham (solução aquosa a 0,5% de hematoxilina ferrosa). Esta solução foi preparada a partir de uma solução «stock» constituída por 10 g de hematoxilina básica em 100 cm<sup>3</sup> de álcool a 95° e 100 cm<sup>3</sup> de água destilada.

Após nova lavagem em água, efectuou-se a *diferenciação* numa solução de álumen de ferro a 2%. A diferenciação é rápida e deve ser feita ao microscópio, terminando quando se considera adequada a coloração.

Lava-se em seguida, em água corrente, durante 15 a 20 minutos, e monta-se numa lâmina de microscópio usando o meio de montagem comum.

Depois de observar as lâminas e de se ter verificado que se tratava de uma infecção de Protozoários, fizemos a extracção dos mesmos pelo processo habitual: emersão das larvas em água esterilizada, durante uns dias, a baixa temperatura, e depois maceração; centrifugação para separar os esporos dos restantes tecidos dos insectos.

Com estes esporos infectaram-se larvas jovens de *Plodia interpunctella*, por adição à dieta (constituída por 30 g de farelo esterilizado e 10 g de glicerina) de uma quantidade não determinada de suspensão aquosa dos esporos que nos assegurou que a infecção se efectuasse. Em frascos de vidro com 10 g de dieta infectada foram colocadas 20 larvas, de preferência no 2.º ou no 3.º instares. Destes frascos foram tiradas periodicamente algumas larvas para fazer esfregaços destinados a estudar a evolução da doença, observando-se simultaneamente as correspondentes alterações morfológicas externas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Etiologia

Três ou quatro dias após a ingestão de papas infectadas com o Protozoário começam a notar-se os primeiros sintomas evidentes da doença causada pelo parasita. As larvas tornam-se esbranquiçadas, entumescidas e com muito menor mobilidade. Ao fim de dez dias, todas as larvas estavam mortas, começando a apresentar um aspecto mumificado, muito mais pequenas do que as larvas sãs da mesma idade, e adquirindo posteriormente uma cor negra. As pupas mortas apresentam-se também mumificadas e com coloração idêntica às larvas, por vezes incompletamente formadas.

#### 3.2. Identificação

Seguindo as chaves indicadas por Weiser e Griggs (1971) e Kudo (1954), foi possível indentificar através da observação dos esfregaços o Protozoário responsável pela infecção como sendo *Mattesia dispora* Naville. Para saber, no entanto, se a nossa identificação estava correcta foram eviadas algumas das larvas mortas para o Dr. Brooks (\*), especialista em Protozoários de insectos, da North Carolina State University, que confirmou o nosso diagnóstico.

---

(\*) — Agradecemos ao Dr. Brooks a confirmação da nossa identificação, bem como as sugestões que nos facultou quanto aos meios de controlar a infecção das culturas.

O género *Mattesia* pertence à família *Schizocystidae*, incluída na ordem Gregarinida, sub-ordem Schizogregarinina, segundo KUDO (1954), embora WEISER e BRIGGS (1971) considerem que esta sub-ordem constitui uma ordem independente a que chamam Neogregarinida.

3.3. *Ciclo de vida*

O ciclo de vida dos indivíduos pertencentes a esta família possui um número de formas e uma sequência comum a todos os seus géneros que pode esquematizar-se do modo apresentado na figura 1.

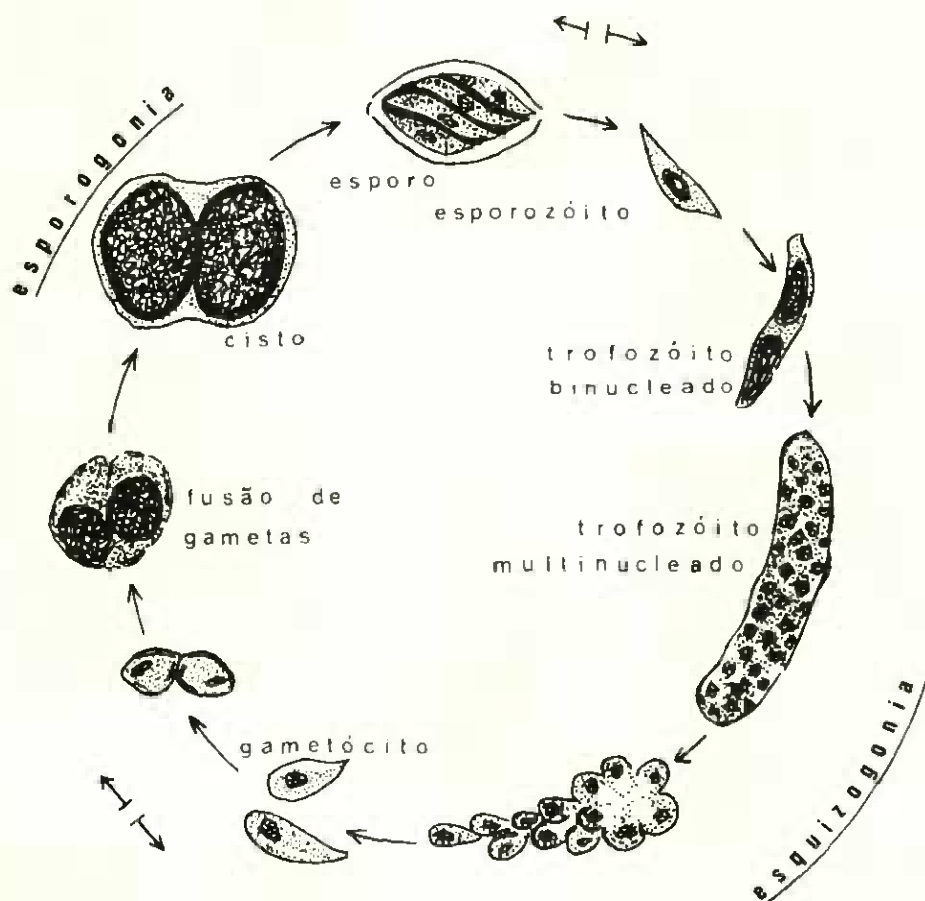


Fig. 1 — *Ciclo de vida da Mattesia disporsa* Naville

Quando o esporo é ingerido por um hospedeiro específico, ao atingir o seu tubo digestivo esporula libertando os esporozóitos. Estes foram observados em grande número, pouco tempo após o início da infecção, tendo uma forma alongada ou mesmo fusiforme, com um só núcleo, situado geralmente na zona média (Fot. 1). O seu desenvolvimento vai dar origem, primeiramente, a formas vegetativas binucleadas e, em seguida, a formas multinucleadas ou trofozóitos, após sofrerem esquizogonia por fissão binária ou múltipla, ou ainda por gemulação. Nestas últimas, relativamente grandes mas pouco abundantes, notavam-se facilmente os núcleos, que se observam com o aspecto de pequenas manchas mais escuras que o citoplasma.

O conjunto destas transformações que se efectua no lúmen do intestino, ou dentro das células do tecido adiposo do hospedeiro, irá finalmente produzir trofozóitos maduros, que emparelham e enquistam. Esta fase, difícil de observar, precede a reprodução sexuada. Cada indivíduo, que se transformou então num gametócito, produz um gâmeta, e a fusão dos dois gâmetas emparelhados (Fot. 2) irá dar origem, no final da esporogonia, à formação de esporos.

Estes esporos são em número de dois por cada par de gametócitos e a fase final da sua formação foi observada em vários esfregaços, cerca de 4 dias após a infecção. Os esporos foram encontrados em grande número, em todas as preparações que continham formas deste Protozoário, a partir de 3 e 4 dias após o início da infecção, o que nos leva a crer que o seu ciclo de vida completo se processa rapidamente (Fots. 3 e 4).

Cada esporo contém 8 esporozóitos, o que constitui uma característica específica.

No nosso estudo encontrámos também, além dos pares de esporos, grupos de 3 esporos com uma disposição particular, semelhante a um triângulo, em que cada lado era preenchido por um indivíduo, colocado longitudinalmente, e os vértices formados pela união dos pólos de 2 indivíduos adjacentes. Estes grupos foram encontrados em todas as preparações onde foi observada esta espécie de Protozoário.

Os esporos foram medidos pelo método já indicado e numa amostra de 50 indivíduos, sendo as suas dimensões médias de  $10,19 (\pm 1,04) \mu\text{m} \times 5,52 (\pm 0,35) \mu\text{m}$ , o que está de acordo com as apresentadas por KUDO (1954) citando Musgrave e MacKinnon, que apontam como dimensões médias  $11 \mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$ .



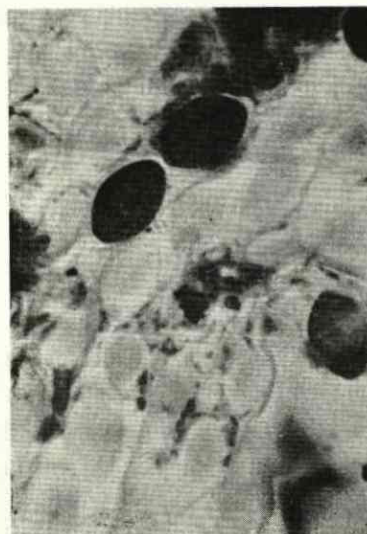
Fot. 1 — Esporozóitos (amp. 1700 X)



Fot. 2 — Gâmetas emparelhadas (amp. 3700 X)



Fot. 3 — Esporos corados com Giemsa (amp. 1600 X)



Fot. 4 — Esporos corados com Hematoxilina (amp. 1600 X)

#### 4. CONCLUSÕES

A infecção detectada revelou-se bastante patogénica, pois duas a três gerações após termos notado os primeiros sintomas de doença ainda apareciam numerosas larvas mortas revelando os seus esfregaços grande abundância de esporos de *M. dispora*.

Estamos neste momento tentando controlar a infecção de modo a obtermos culturas laboratoriais sãs quer desinfectando os ovos com hipoclorito quer mantendo a cultura a uma temperatura mais elevada, cerca de 32° C, à qual o protozoário não pode sobreviver embora a *P. interpunctella* consiga completar o ciclo.

Julgamos de muito interesse que os estudos referentes à infecção de Protozoários em insectos possam prosseguir, dada a importância que pensamos eles terem em relação a algumas das espécies entomológicas portuguesas nomeadamente pragas potenciais.

#### RESUMO

Identificou-se como responsável por uma infecção de *P. interpunctella* em cultura laboratorial o Protozoário *Mattesia dispora* Naville. Estudou-se a etiologia e o ciclo de vida do mesmo, indicando-se as técnicas usadas no diagnóstico. Salientou-se a importância das doenças causadas por Protozoários nas pragas não só de produtos armazenados como outras nomeadamente as pragas florestais.

#### SYNOPSIS

##### **Notice on the *Mattesia dispora* Naville infection in *Plodia interpunctella* (Hb.) (Lepidoptera, Phycitiidae) rearings**

Notice on the *Mattesia dispora* Naville infection in *Plodia interpunctella* (H b.) (Lepidoptera Phycitiidae) rearings.

We have identified as *Mattesia dispora* Naville the microorganism responsible for the infection of *P. interpunctella* laboratorial rearings.

The disease symptoms and life cycle of the Protozoa were described as well as the techniques used in the diagnosis.

The importance of such studies not only in stored products pests but also in other pests namely forestry's were emphasised.

BIBLIOGRAFIA

- FRANZ, J. M. and HUGER, A. M. 1971 — Microsporidia causing the collapse of an outbreak of a green Tortrix (*Tortrix viridana* L.) in Germany. *Proc. 4th Int. Coll. Ins. Path.*, 48-53.
- HEIMPFL, A. M. 1973 — Safety of insect pathogens for man and vertebrates. In Burgues and Hussey, Ed., *Microbial control of insects and mites*. Academic Press, New York.
- IGNOFFO, C. M. 1970 — Microbial insecticides: No-Yes; Now-When! *Proc. Tall Timber Conf. on Ecological Animal Control by Habitat Management*, n.º 2, 41-57.
- KUDO, R. 1954 — Protozoology. Springfield, Illinois, U.S.A.
- WEISER, J. and BRIGGS, J. 1973 — Identification of pathogens. In Burgues and Hussey, Ed., *Microbial control of insects and mites*. Academic Press, New York.



## ERRATA

Página N.º	Linha	Onde se lê	Deve ler-se
16	9	variáveis	variável
21	16	néanmoins	néanmoins
21	16	Incluse	inclure
46	29	soumis	soumises
47	4	mostrent	montrent
49	16	nova	novo
78	29	removidos	removidas
100	14	projects	projets
126	23	dûes	dûes
126	24	réactifs	réactifs
126	26	differentes	différents
126	26	différents	différents
126	30	reactifs	réactifs
128	33	l'operation	l'opération
127	1	operation	opération
127	2	considérer	considérer
127	5	détermination	détermination
127	8	différents	différents
127	11	différentes	différents
127	16	l'essai	l'essai
127	18	différentes	différents
165	19	réalisés dans le	réalisées dans la
165	24	le période	la période
167	16	firts	first
233	15	nuit	nuit
233	15	affalbil	affaiblit
233	15	prois	proie
233	16	En suite	Ensuite
233	24	tacic	tacique
233	24	Pliocénic	Pliocène
233	32	fréquentes	fréquents
234	10	un	une
234	10	complet	complète
234	15	réproduise	reproduise
235	1	dominating	dominant
250	8	hipoclorito	hipoclorito

THE  
MUSEUM

THE MUSEUM OF THE HISTORY OF THE  
CITY OF BOSTON  
HAS THE HONOR TO ANNOUNCE  
THAT THE EXHIBITION OF THE  
MUSEUM OF THE HISTORY OF THE  
CITY OF BOSTON  
WILL BE OPENED ON  
FRIDAY, SEPTEMBER 15, 1882,  
AT TWO O'CLOCK P.M.  
AND WILL CONTINUE  
UNTIL SEPTEMBER 22, 1882,  
AT TWO O'CLOCK P.M.  
ADMISSION FREE.  
THE MUSEUM IS OPEN  
DAILY FROM TEN O'CLOCK  
A.M. TO FIVE O'CLOCK P.M.  
EXCEPT ON SUNDAYS  
AND HOLIDAYS.  
THE MUSEUM IS  
LOCATED AT  
100 NASSAU ST.,  
CORNER OF STATE ST.,  
BOSTON, MASS.