

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ALANA LUCIA ORO

**TEGUMENTO DE *BOMBYX MORI* (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE) INFECTADO  
PELO *BOMBYX MORI NUCLEOPOLYHEDROVIRUS***

Maringá  
2017

ALANA LUCIA ORO

**TEGUMENTO DE *BOMBYX MORI* (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE) INFECTADO  
PELO *BOMBYX MORI* NUCLEOPOLYHEDROVIRUS**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração: Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Fernandez  
Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro

Maringá  
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

O74t Oro, Alana Lucia  
Tegumento de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) infectado pelo *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* / Alana Lucia Oro. -- Maringá, 2017.  
89 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida Fernadez.  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

1. Baculovirus - *Bombyx mori*. 2. Tegumento - Ultraestrutura. 3. Nucleopolyhedrovirus - Concentração sub-letal. 4. Bicho-da-seda - Susceptibilidade. I. Fernadez, Maria Aparecida, orient. II. Ribeiro, Lucinéia de Fátima Chasko, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. IV. Título.

CDD 21.ed. 595.78

AMMA-003420

ALANA LUCIA ORO

**TEGUMENTO DE *BOMBYX MORI* (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE) INFECTADO  
PELO *BOMBYX MORI* NUCLEOPOLYHEDROVIRUS**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração: Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 16/02/2017.

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Aparecida Fernandez  
Orientadora - Universidade Estadual de Maringá

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva  
Membro - Universidade Estadual do Oeste do Paraná

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão  
Membro - Universidade Estadual do Oeste do Paraná

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Luiza de Brito Portela Castro  
Membro - Universidade Estadual de Maringá

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Alessandra Aparecida Silva  
Membro - Universidade Estadual de Maringá

## **BIOGRAFIA**

Alana Lucia Oro, filha de Geraldo Dimas Oro e Ione Lucia Dorigoni Minosso, nasceu na cidade de Francisco Beltrão – PR em 12 de janeiro de 1989. Concluiu a graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado) pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná em 2010 e mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) pela Universidade Estadual de Maringá em 2013. Em março de 2013 iniciou o doutorado em Ciências Biológicas pelo mesmo programa, no qual finaliza o curso com a defesa da tese realizada em 16 de fevereiro de 2017. Tem experiência na área de Biologia Molecular e Morfologia.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me guiar e dar forças em todos os momentos da minha vida;

Aos meus pais, Geraldo e Ione, e à minha irmã, Natalia, pelo amor, incentivo e apoio incondicionais durante a minha vida acadêmica;

Aos colegas de laboratório, pela convivência e toda ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho. Especialmente aos amigos do grupo de pesquisa Grazielle, Verônica, Alex, Marina, Naiara, Roxelle e Douglas pela amizade, preciosa ajuda e confiança na realização dos experimentos;

Agradeço a minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Fernandez, pela oportunidade concedida e orientação a este trabalho;

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, pela amizade, confiança e dedicação por todos estes anos;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rose Meire Costa Brancalhão pelo auxílio e espaço cedido em seu laboratório, para os experimentos durante o doutorado;

À Elizandra, por toda ajuda no desenvolvimento dos experimentos de microscopia eletrônica deste trabalho;

À Central de Microscopia do COMCAP/UEM por toda ajuda prestada;

Aos técnicos Marli Licero e Valmir Perón pela amizade e apoio;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

*“A mesma rocha que bloqueia o caminho poderá funcionar como um degrau.”*

(Osho)

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta de dois artigos científicos completos:

I. ORO, A. L., BRITTA, E. A., NAKAMURA, C. V, BRANCALHÃO, R. M. C., RIBEIRO, L. F. C., FERNANDEZ, M. A.

**Ultraestrutura do tegumento de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) infectado pelo *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus***

Será submetido à revista científica *Micron* (ISSN 0968-4328), fator de impacto 1,98 e Qualis B2 no CBI da CAPES.

II. AL ORO, GM PESSINI, VA FASSINA, AS CHIARELLO, REF MUNHOZ, RMC BRANCALHÃO, LFC RIBEIRO, MA FERNANDEZ

**Parâmetros Biológicos e Produtivos de Linhagens de *Bombyx mori*, Linneau (Lepidoptera: Bombycidae) Infectadas pelo BmNPV**

Será submetido à revista científica *Neotropical Entomology* (ISSN 1678-8052), fator de impacto 0,77 e Qualis B4 no CBI da CAPES.

Adicionalmente é apresentada uma Introdução Geral da área de pesquisa, que envolve os dois artigos.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b> .....	09
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	11
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	17
<b>ARTIGO I – Ultraestrutura do tegumento de <i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera: Bombycidae) infectado pelo <i>Bombyx mori nucleopolyhedrovirus</i></b> .....	23
RESUMO .....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
<b>2.1 Insetos</b> .....	26
<b>2.2 Inoculação Viral</b> .....	26
<b>2.3 Microscopia de EletroTransmissão</b> .....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
AGRADECIMENTOS .....	32
REFERÊNCIAS .....	33
FIGURAS .....	42
<b>ARTIGO II - Parâmetros Biológicos e Produtivos de Linhagens de <i>Bombyx mori</i>, Linneau (Lepidoptera: Bombycidae) Infectadas pelo BmNPV</b> .....	44
RESUMO .....	45
INTRODUÇÃO .....	46
MATERIAIS E MÉTODOS .....	48
<b>Insetos</b> .....	48
<b>BmNPV</b> .....	48
<b>Experimentação</b> .....	48
<b>Análise Estatística</b> .....	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
AGRADECIMENTOS .....	57
REFERÊNCIAS .....	58
TABELAS .....	64
<b>ANEXO 01 - Normas <i>Micron</i></b> .....	69
<b>ANEXO 02 - Normas <i>Neotropical Etomology</i></b> .....	82

## RESUMO GERAL

O bicho-da-seda, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) é um inseto holometábolo importante para a sericicultura e para o campo científico encontrado apenas em bancos de germoplasma, onde as matrizes mais promissoras são selecionadas para características de interesse de produtividade e resistência a doenças. A cadeia produtiva da seda pode ser afetada por uma série de fatores, sendo as doenças virais responsáveis por perdas consideráveis. Entre os patógenos que acometem o bicho-da-seda, o *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) é um vírus da família *Baculoviridae*, gênero *Alphabaculovirus* (AlfaBV), altamente patogênico que infecta insetos, especialmente no estágio larval. BmNPV é poliorganotrófico e possui vários tecidos como alvos, onde um dos principais sinais da doença ocorre por alterações no tegumento. Entretanto, a literatura não apresenta detalhes estruturais da desorganização da cutícula durante a infecção pelo vírus, justificando assim o seu estudo, apresentado no primeiro artigo. Ainda, *B. mori* é hoje um organismo modelo em pesquisas científicas devido as suas características de fácil manuseio e criação. Neste sentido, existem vários estudos envolvendo o bicho-da-seda, visando selecionar os melhores representantes para programas de melhoramento e formação de híbridos. Entretanto, muitos genótipos não possuem informações disponíveis, fato este que limita o uso dos mesmos na produção de raças puras e híbridos, para melhorar a qualidade e produtividade de seda e aumentar a resistência a doenças, principalmente as causadas pelo BmNPV. Assim o segundo estudo avaliou características biológicas e produtivas de duas linhagens de *B. mori* (BBJ e AS31) pertencentes ao Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil e um híbrido comercial, inoculados experimentalmente com o BmNPV. Para tanto, lagartas híbridas de *B. mori* no 5º instar foram inoculadas com concentração viral de  $1,70 \times 10^7$  corpos de oclusão poliédricos/mL do BmNPV, e no 7º dia pós-inoculação o tegumento coletado seguiu as etapas para microscopia eletrônica de transmissão. Já as lagartas para análise das características produtivas dos genótipos (BBJ, AS31 e híbrido comercial)

foram inoculadas com oito diferentes concentrações do BmNPV no 5º instar, e os sinais da infecção pelo vírus acompanhados até a formação do casulo. Os dados das variáveis produtivas coletados foram analisados estatisticamente. Os resultados do tegumento revelaram detalhes da ultraestrutura e características teciduais na infecção pelo BmNPV que, elucidam o mecanismo de desestruturação das placas das microvilosidades e das lamelas da endocutícula, causando a desorganização da cutícula e a ruptura do tegumento. Na análise dos genótipos, os resultados indicam que a linhagem AS31 demonstrou ser a mais promissora para programas de melhoramento genético, quando avaliados os caracteres produtivos em lagartas inoculadas pelo BmNPV de teor de seda e duração do ciclo larval.

**Palavras-chave:** Baculovírus, bicho-da-seda, concentração sub-letal, susceptibilidade, ultraestrutura.

## GENERAL ABSTRACT

*Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) is a holometabolous insect of great importance for the scientific and economic field, currently its being found only in germplasm banks. The most promising matrices are selected by characteristics of productivity and diseases resistance. The silk productive chain can be affected by several factors, and the viral diseases are responsible for considerable losses. Between the pathogens affecting silkworm, *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) is a highly pathogenic virus from *Baculoviridae* family and *Alphabaculovirus* (AlphaBV) genus, which infects insects at the larval stage. BmNPV is poliorganotrophic and series of tissues are known as targets, appearing the main signs of the disease by changes in the integument. However, literature does not present information regarding cuticle disorganization during BmNPV infection, thus justifying this study. Currently, *B. mori* is a model organism in scientific research due to its characteristics of easy handling and rearing. There are several studies involving silkworms, usually on the genetic basis, analyzing the intrinsic qualitative and quantitative attributes of each strain. These analyses occur to select the best representatives for breeding and hybrid programs. Despite this, there are many genotypes with no information available, which limits their use in the production of pure breeds and hybrids. These information are used to improve the quality and productivity of silk, besides increase resistance to diseases, especially those caused by BmNPV. Therefore, the second study evaluated the biological and productive characteristics of two *B. mori* strains (BBJ and AS31) belonging to the Germplasm Bank of the State University of Maringá, Paraná, Brazil and a commercial hybrid, inoculated by BmNPV. For this purpose, *B. mori* hybrid caterpillars were inoculated in the 5th instar with a viral concentration  $1.70 \times 10^7$  polyhedral occlusion bodies/ mL of BmNPV. The integument was collected on the 7<sup>th</sup> day after inoculation and followed the steps for transmission electron microscopy. The caterpillars for the genotype production characteristics analysis (BBJ, AS31 and commercial hybrid) were inoculated by eight different concentrations of BmNPV in the 5th instar. Viral infection was followed until cocoon formation, and data collected of the productive

variables were analyzed statistically. The integument results revealed ultrastructure and characteristics of the BmNPV infection. These results elucidate the disruption mechanism of the microvilli plaques and the endocuticle lamellae, causing cuticle disorganization and rupture of the integument. At genotype analysis, the results indicate AS31 strain proved to be the most promising for breeding programs, which evaluated the productive traits, raw silk percent and larval cycle duration in larvae inoculated by BmNPV.

**Keywords:** Baculovirus, silkworm, sub lethal concentration, susceptibility, ultrastructure.

## INTRODUÇÃO GERAL

*Bombyx mori* L., popularmente conhecido como bicho-da-seda, é um inseto que apresenta metamorfose completa, caracterizado como holometábolo. O seu ciclo de vida, possui quatro distintos estágios de desenvolvimento: ovo, lagarta, pupa e mariposa; sendo que no estágio larval, ocorrem ainda cinco ínstars ou estádios larvais. É neste estágio que o inseto se alimenta exclusivamente por folhas de amoreira (*Morus* sp.), cessando a sua alimentação no final do 5º ínstar para tecer o casulo (Ude et al., 2014).

Os bichos-da-seda são somente encontrados em bancos de germoplasma, sendo assim totalmente dependentes do homem para sobreviver. Esta espécie domesticada provavelmente evoluiu da linhagem selvagem *Bombyx mandarina*, pois apresenta características e capacidade de acasalamento semelhantes. A facilidade de manuseio e criação também fazem destes insetos um ótimo organismo modelo em estudos científicos de lepidópteros (Fernandez et al., 2005; Goldsmith et al., 2005).

Existem vários estudos envolvendo *B. mori* e é crescente o campo de pesquisa nas áreas médicas e farmacêuticas destes insetos (Nwibo et al., 2015; Inagaki et al., 2016; Matsumoto; Sekimizu, 2016). Um grande progresso também é perceptível em estudos sobre sua base genética, visando selecionar as melhores linhagens para programas de melhoramento e formação de híbridos (Pereira et al., 2013; Gao et al., 2014; Li et al., 2016).

É estimado que mais de 4 mil linhagens de *B. mori* estejam acessíveis hoje no mundo (Nagaraju, 2002; Kumeresan et al., 2004), e para que esse avanço continue, é imprescindível a constante atualização de informações disponíveis sobre estes diferentes genótipos. Desse modo, muitas linhagens existentes ainda não foram descritas, fato este que limita o uso das mesmas na produção de raças puras e híbridos, para melhorar a qualidade e produtividade de seda e aumentar a resistência a doenças (Jingade et al., 2011; Seidavi; Goldsmith, 2014; Maqbool et al., 2015).

A habilidade de secreção de seda e produção de casulos pelas lagartas do *B. mori* tornam este inseto de grande valor comercial, uma vez que a fibra da

seda possui inúmeras aplicações, sendo um material multifuncional atraente para as indústrias têxteis e de biomateriais (Kundu et al., 2013; Tamada; Kojima, 2015; Konwarh et al., 2016). A atividade de produção da seda, a sericicultura, compreende a criação do bicho-da-seda, e inclui o cultivo da amoreira, a produção dos ovos e a obtenção dos casulos destinados às indústrias (Watanabe et al., 2000; Takahashi et al., 2001; Sabbag et al., 2013).

Esta atividade propicia um meio de subsistência econômica a trabalhadores de comunidades rurais, onde prevalece o trabalho familiar, contribuindo expressivamente para a diminuição do êxodo rural. Soma-se o aspecto ecológico, uma vez que agrotóxicos não devem ser utilizados na propriedade, destacando a prática sericícola como de baixo impacto ambiental e sustentável ao país (Brancahã, 2002).

Segundo Relatório Takii (Seab, 2015), a produção brasileira de casulos verdes na safra 2014/2015 foi 2,9 toneladas e a paranaense de 2,4 toneladas, determinando o Paraná como maior rendimento nacional com 85% da produção. No entanto, estes índices são considerados baixos se comparados a outros países, atribuindo como principais fatores restritivos a incidência de doenças nos barracões de criação (Potrich et al., 2007; Santos et al., 2011).

A susceptibilidade a patógenos é inerente ao bicho-da-seda em todos os estágios do seu ciclo de vida, e as maiores perdas estão relacionadas a doenças virais, representando um sério problema para a sericicultura (Miao et al., 2005). Os baculovírus são uma ampla família que infectam insetos, principalmente da ordem Lepidoptera e estão filogeneticamente divididos em quatro gêneros: *Betabaculovirus*, *Deltabaculovirus*, *Gammabaculovirus* e *Alphabaculovirus* (Jehle et al., 2006; King et al., 2011). Em 2002 no Paraná, foi identificado o *Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus* (BmNPV), vírus da família *Baculoviridae*, gênero *Alphabaculovirus* (AlfaBV) como principal patógeno agravante da produção da seda (Brancahã, 2002).

Os AlfaBV são específicos para lepidópteros e caracterizam-se pela presença de um corpo de oclusão poliédrico contendo partículas virais em seu interior. São constituídos por DNA circular de fita dupla que se associa com proteínas do capsídeo formando o nucleocapsídeo. Neste gênero os nucleocapsídeos são ainda envoltos por um envelope membranoso, e geralmente ocorrem de forma única (*single nucleopolyhedrovirus* – SNPV), ou

múltipla, de 2 a 15 nucleocapsídeos (*multiple nucleopolyhedrovirus* – MNPV). Estes nucleocapsídeos envelopados ou vírions são agrupados no corpo de oclusão, que confere proteção em especial, contra as condições adversas do meio ambiente (Rohrmann, 2013; Ardisson-Araújo et al., 2014).

Em seu ciclo infeccioso, os AlfaBV produzem dois fenótipos contendo a mesma estrutura de nucleocapsídeo e informações genéticas, porém apresentando diferentes envelopes virais; o vírus derivado do poliedro, *occlusion-derived virus* (ODV), e o vírus broto, *budded virus* (BV). Os ODVs possuem seus vírions ocluídos no poliedro, responsáveis pela transmissão horizontal da doença e disseminação entre hospedeiros. Os BVs não são ocluídos e mediam a infecção sistêmica ou célula-célula (Satadal et al., 2012; Rohrmann, 2013).

Este envelopamento de um ou mais vírions não é bem definido, porém, sabe-se que os MNPV são mais virulentos que a forma SNPV. Também é possível verificar a existência de variabilidade genética para NPVs da mesma espécie, mas de diferentes localidades geográficas que afetam sua virulência (Fan et al., 2007; Liang et al., 2013; Rohrmann, 2013). Outros fatores também afetam a virulência dos AlfaBVs, como a passagem seriada do inóculo para replicação viral em laboratório.

Em vários sistemas de células/vírus, após várias passagens para replicação viral o resultado é a redução do processo de oclusão e a perda da virulência pela diminuição de vírions ocluídos. Genes como o fp25k, requisitados para a formação dos poliedros no estágio final da infecção, são identificados sofrendo mutações e acumulando rapidamente durante passagens seriadas de NPVs, ocasionando na formação de poliedros mutantes que predominam no inóculo viral (Wu et al., 2005; Moscardi et al., 2011; Cheng et al., 2013; Chaeychomsri, 2015). Dessa maneira, é necessária monitoração constante das alterações do BmNPV que afetem caracteres produtivos no campo.

Estudos citopatológicos identificam a infecção causada pelo BmNPV em lagartas de *B. mori* em vários tecidos, apresentando tanto nucleocapsídeos envelopados únicos como múltiplos (Torquato et al., 2006; Pereira et al., 2008; Brancalhão et al., 2009; Senem et al., 2016). Estes autores revelam a presença de uma estrutura elétron-densa na região na área central do núcleo, denominada de viroplasma ou estroma virogênico, visualizadas no início da infecção viral. Os



poliedros virais maduros estão presentes no final da infecção, e seu acúmulo no interior do núcleo ocasiona a hipertrofia nuclear.

No tecido gorduroso de *B. mori*, a hipertrofia do núcleo é seguida da lise dos adipócitos, que liberam os poliedros virais juntamente com fosfolípidos, colesterol e ácidos graxos, proporcionando aspecto leitoso a hemolinfa. Como consequência, o tegumento das lagartas apresenta o primeiro sinal externo visível de alteração da sua coloração de branco para branco-amarelado, que caracteriza a infecção pelo BmNPV em lagartas de *B. mori* conhecida como amarelidão (Brancahão et al., 2002; Ribeiro et al., 2009).

O tegumento é a parte do corpo do inseto que mantém a integridade anatômica do organismo, assim como proteção ao meio externo. É constituído por uma camada epitelial, a epiderme e a cutícula, que difere física e mecanicamente em diferentes partes do corpo, possuindo anexos articulares que permitem os movimentos (Snodgrass; Eickwort, 1993; Chapman, 1998). Em lagartas de *B. mori*, efeitos avançados da infecção viral podem ocasionar rupturas no tegumento, devido a fragilidade ocasionada pela infecção do BmNPV, liberando os poliedros virais no meio que, são disseminados no ambiente (Brancahão et al., 2002; Ribeiro et al., 2009).

## REFERÊNCIAS

ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; MELO, F. L.; DE SOUZA ANDRADE, M.; BRANCALHÃO, R. M. C., BÁO, S. N.; RIBEIRO, B. M. Complete genome sequence of the first non-Asian isolate of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. **Virus genes** 49: 477-484, 2014.

BRANCALHÃO, R. M. C. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 24: 54–58, 2002.

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). **Arquivo do Instituto de Biologia** 69: 57–63, 2002.

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

CHAEYCHOMSRI, S.; CHAEYCHOMSRI, W.; IKEDA, M.; KOBAYASHI, M. Characterization of the *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus during serial passage in cell culture. **Journal of Advanced Agricultural Technologies** 2: 63-70, 2015.

CHAPMAN, R. F. **The insect structure and function**. New York: American Elsevier Publishing Company 533-566, 1998.

CHENG, X. H.; KUMAR, C. S.; ARIF, B. M.; KRELL, P. J.; ZHANG, C. X.; CHENG, X. W. Cell-dependent production of polyhedra and virion occlusion of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *fp25k* mutants in vitro and in vivo. **Journal of General Virology** 94: 177-186, 2013.

FAN, Q.; LI, S.; WANG, L.; ZHANG, B.; YE, B.; ZHAO, Z. The genome sequence of the multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi*. **Virology** 366: 304-315, 2007.

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

GAO, K.; DENG, X. Y.; QIAN, H. Y.; QIN, G. X.; HOU, C. X.; GUO, X. J. Cytoplasmic polyhedrosis virus-induced differential gene expression in two silkworm strains of different susceptibility. **Gene** 539: 230-237, 2014

GOLDSMITH, M. R.; SHIMADA, T.; ABE, H. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. **Annual Review Entomology** 50: 71-100, 2005.

INAGAKI, Y.; MATSUMOTO, Y.; SEKIMIZU, K. Using silkworms to establish alternative animal models for evaluation of drug-induced tissue injury. **Drug Discoveries & Therapeutics** 10: 40-43, 2016.

JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOU, E. A.; ROHRMANN, G. F.; THEILMANN, D. A.; THIEM, S. M.; VLAK, J. M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **Archives of Virology** 151: 257-66, 2006.

JINGADE, A. H.; VIJAYAN, K.; SOMASUNDARAM, P.; SRIVASABABU, G. K.; KAMBLE, C. K. A review of the implications of heterozygosity and inbreeding on germplasm biodiversity and its conservation in the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Science** 11: 1-16, 2011.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E.J. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier Academic Press, London, San Diego 855-881, 2011.

KONWARH, R.; GUPTA, P.; MANDAL, B. B. Silk-microfluidics for advanced biotechnological applications: A progressive review. **Biotechnology Advances** 34: 845-858, 2016.

KUMARESAN, P.; SINHA, R. K.; MOHAN, B.; THANGAVELU, K. Conservation of multivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) germplasm in India-An overview. **International Journal of Industrial Entomology** 9: 1-13, 2004.

KUNDU, B.; RAJKHOWA, R.; KUNDU, S. C.; WANG, X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. **Advanced Drug Delivery Reviews** 65: 457-470, 2013.

LI, G.; QIAN, H.; LUO, X.; XU, P.; YANG, J.; LIU, M.; XU, A. Transcriptomic Analysis of Resistant and Susceptible *Bombyx mori* Strains Following BmNPV Infection Provides Insights into the Antiviral Mechanisms. **International Journal of Genomics** 2016: 2086346, 2016.

LIANG, X.; LU, Z. L.; WEI, B. X.; FENG, J. L.; QU, D.; LUO, T. R. Phylogenetic analysis of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus *polyhedrin* and *p10* genes in wild isolates from Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. **Virus Genes** 46: 140-151, 2013.

MAQBOOL, A.; DAR, H. U.; AHMAD, M.; MALIK, G. N.; ZAFFAR, G.; MIR, S. A. Genetic divergence in some bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) breeds. **Scientific Research and Essays** 10: 381-385, 2015.

MATSUMOTO, Y.; SEKIMIZU, K. Evaluation of anti-diabetic drugs by using silkworm, *Bombyx mori*. **Drug Discoveries & Therapeutics** 10: 19-23, 2016.

MIAO, X. X.; XU, S. J.; LI, M. H.; LI, M. W.; HUANG, J. H.; DAIFY; MARINO, S. W.; MILLS, D. R.; ZENG, P. Y.; MITA, K.; JIA, S. H.; ZHANG, Y.; LIU, W. B.; XIANG, H.; GUO, Q. H.; XU, A. Y.; KONG, X. Y.; LIN, H X.; SHI, Y. Z.; LU, G.; ZHANG, X. L.; HUANG, W.; YASUKOCHI, Y.; SUGASAKI, T.; SHIMADA, T.; NAGARAJU, J.; XIANG, Z. H.; WANG, S. Y.; GOLDSMITH, M. R.; LU, C.; ZHAO, G. P.; HUANG, Y. P. Simple sequence repeat-based consensus linkage map of

*Bombyx mori*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 102: 16303-16308, 2005.

MOSCARDI, F.; DE SOUZA, M. L.; DE CASTRO, M. E. B.; MOSCARDI, M. L.; SZEWCZYK, B. Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. **Microbes and microbial technology**. Springer, New York 415-445, 2011.

NAGARAJU, J. Application of genetic principles for improving silk production. **Current science** 83: 409-414, 2002.

NWIBO, D. D.; HAMAMOTO, H.; MATSUMOTO, Y.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K. Current use of silkworm larvae (*Bombyx mori*) as an animal model in pharmacomedical research. **Drug Discoveries & Therapeutics** 9: 133-135, 2015.

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

PEREIRA, N. C.; MUNHOZ, R. E. F.; BIGNOTTO, T. S.; BESPALHUK, R.; GARAY, L. B.; SAEZ, C. R. N.; V.A. FASSINA; A. NEMBRI; FERNANDEZ, M. A. Biological and molecular characterization of silkworm strains from the Brazilian germplasm bank of *Bombyx mori*. **Genetics and Molecular Research** 12: 2138-2147, 2013.

POTRICH, M.; ALVES, L. F. A.; BRANCAHÃO, R. M. C.; DALCIN, G. Entomopatógenos associados a lagartas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) no Estado Paraná. **Arquivo do Instituto de Biologia** 74: 363–367, 2007.

RIBEIRO, L. F. C.; ZANATTA, D. B.; BRAVO, J. P.; BRANCAHÃO, R. M. C.; FERNANDEZ, M. A. Molecular markers in commercial *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) hybrids susceptible to multiple nucleopolyhedrovirus. **Genetics and Molecular Research** 8: 144-153, 2009.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus Molecular Biology**. National Library of Medicine (US), Bethesda (MD), NCBI, 3<sup>rd</sup> Ed., 2013.

SABBAG, O. J.; NICODEMO, D.; OLIVEIRA, J. E. M. Custos e viabilidade econômica da produção de casulos do bicho-da-seda. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 43: 187–194, 2013.

SANTOS, S. A.; VIDIGAL, P. G.; MERLINI, L. S. A criação do *Bombyx mori* (bicho-da-seda) e as principais doenças. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR** 14: 57-64, 2011.

SATADAL, C.; SUMAN DEB, A. K.; SAHA, N.; HAZRA, B.; BINDROO, B. B. Dimorphism in nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) (Family: *Baculoviridae*) causing grasserie disease in silkworm (*Bombyx mori* L.): light and electron microscopy and proteína profile. **Applied Biological Research** 14: 176-186, 2012.

SEAB. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. Relatório Takii – Perfil da sericicultura no Estado do Paraná - Safra 2014/2015. 8-16, 2015. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2016/Sericicultura\\_2016.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2016/Sericicultura_2016.pdf). Acesso em: 05, janeiro, 2017.

SEIDAVI, A.; GOLDSMITH, M. R. Comparison of Phenotypic Value Changes in Pure Lines of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) During Consecutive Generations Following Initial Selection on Cocoon Weight. **Journal of Insect Science** 14: 288, 2014.

SEMEM, J. V.; TORQUATO, E. F. B.; RIBEIRO, L. F. C.; BRANCALHÃO, R. M. C. Cytopathology of the trachea of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) to *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. **Micron** 80: 39-44, 2016.

SNODGRASS, R. E.; EICKWORT, G. C. **Principles of Insect Morphology**. New York, Cornell University Press 349–356, 1993.

TAKAHASHI, R.; TAKAHASHI, K. M.; TAKAHASHI, L. S. **Sericicultura uma Promissora Exploração Agropecuária**. Jaboticabal, Funep. 140, 2001.

TAMADA, Y.; KOJIMA, K. Silk Fibers as Smart Materials Toward Medical Textiles. **Handbook of Smart Textiles**. Springer Singapore 209-224, 2015.

TORQUATO, E. F. B.; MIRANDA-NETO, M. H. M.; BRANCALHÃO, R. M. C. Nucleopolyhedrovirus infected central nervous system cells of *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae). **Neotropical Entomology** 35: 70–74, 2006.

UDE, A. U.; ESHKOOR, R. A.; ZULKIFILI, R.; ARIFFIN, A. K.; DZURAIDAH, A. W.; AZHARI, C. H. *Bombyx mori* silk fibre and its composite: a review of contemporary developments. **Materials & Design** 57: 298-305, 2014.

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

WU, D.; DENG, F.; SUN, X.; WANG, H.; YUAN, L.; VLAK, J. M.; HU, Z. Functional analysis of FP25K of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology** 86: 2439-2444, 2005.

## **Ultraestrutura do tegumento de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) infectado pelo *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus***

Alana Lucia Oro<sup>1</sup>, Elizandra Aparecida Britta<sup>2</sup>, Celso Vataru Nakamura<sup>2</sup>, Rose Meire Costa Brancalhão<sup>3</sup>, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro<sup>3</sup>, Maria Aparecida Fernandez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

<sup>3</sup>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil

Autor Correspondente: Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro (lucineia.cr@gmail.com)

### **Resumo**

*Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) é um vírus entomopatogênico, da família *Baculoviridae* causador de doença em *Bombyx mori* (Linneau). Este vírus ocasiona uma série de distúrbios metabólicos que podem resultar na produção de casulos defeituosos, levando prejuízos às indústrias de fios de seda. O principal sinal de infecção é observado no tegumento das lagartas infectadas, dessa forma, o presente estudo objetivou analisar ultraestruturalmente a citopatologia do tegumento de lagartas híbridas de *B. mori* infectadas pelo BmNPV. Lagartas no 5º instar foram inoculadas com suspensão viral contendo  $1,70 \times 10^7$  corpos de oclusão poliédricos/mL, e a sintomatologia acompanhada até o encasulamento. No sétimo dia pós-inoculação, segmentos do tegumento foram processados para microscopia eletrônica de transmissão. A infecção foi confirmada pela presença de poliedros virais no núcleo das células epidérmicas, demonstrando citopatologia semelhante a descrita em outros tecidos infectados pelo BmNPV. Na região apical destas células foi observada a alteração das microvilosidades e a perda de contato das placas de membrana plasmática com a endocutícula. Estas estruturas, sintetizadoras de quitina, perdem sua funcionalidade devido as alterações metabólicas que ocorrem durante a infecção viral, ocasionando a desorganização da endocutícula. Todo tegumento do inseto é comprometido, resultando na fragilidade, e conseqüentemente na sua ruptura, liberando os poliedros do BmNPV para o meio externo. Este é o primeiro estudo que apresenta os aspectos ultraestruturais citopatológicos da infecção pelo BmNPV no tegumento e na manutenção estrutural da cutícula.

**Palavras-chave:** Baculovírus, citopatologia, cutícula, ultraestrutura.



## 1. Introdução

*Bombyx mori*, Linneau 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), conhecido como bicho-da-seda da amoreira, é um inseto holometábolo, que apresenta relevante importância econômica. É totalmente domesticado pelo homem, e por essa razão utilizado como modelo biológico em estudos científicos e tecnológicos (Goldsmith et al., 2005; Dourado et al., 2011). No Brasil, esta atividade sofre com prejuízos em sua produção, e isto é atribuído a uma série de fatores, entre eles estão as doenças nos barracões de criação, problema este de proporção mundial (Fernandez et al., 2005; Jiang et al., 2012; Wang et al., 2016; Chen et al., 2017).

Dentre os patógenos destacam-se os de origem viral e no estado do Paraná, Brasil, Brancalhão et al. (2002a), identificaram um vírus da família *Baculoviridae* como sendo um dos principais responsáveis por perdas na produção da seda, denominado *Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus* (BmNPV). Os baculovírus são uma ampla família que infectam insetos, principalmente da ordem Lepidoptera e estão filogeneticamente divididos em quatro gêneros: *Betabaculovirus*, *Deltabaculovirus*, *Gammabaculovirus* e *Alphabaculovirus* (Jehle et al., 2006; King et al., 2011; Rohrmann, 2013).

O *Alphabaculovirus* (AlfaBV) é constituído por um DNA circular de fita dupla, associado com proteínas do capsídeo, formando o nucleocapsídeo (Adams and McClintock, 1991; Rohrmann, 2013). Um envelope lipoprotéico envolve o nucleocapsídeo, formando o subgrupo “single” (SNPV) quando sozinho, ou “multiple” (MNPV), quando vários nucleocapsídeos são envoltos, considerado o mais virulento (Ardisson-Araújo, 2014). Todo esse conteúdo viral permanece no interior do corpo de oclusão de formato poliédrico, composto por poliedrina, que confere proteção aos vírions contra a sua desativação em ambiente desfavorável (Rohrmann, 2013).

Existem duas formas virais distintas de nucleocapsídeos, os ODVs (occlusion-derived vírus) e os BVs (budded vírus). Embora esses vírions, BV e ODV, sejam considerados genotipicamente idênticos, eles desempenham papéis diferentes no ciclo infeccioso, diferindo quanto à morfologia e composição protéica, origem dos envelopes virais, modo de penetração na célula hospedeira e infectividade (Zhou et al., 2005; Oliveira, 2006).

No estágio larval, o *B. mori* é particularmente susceptível ao BmNPV e a infecção ocorre principalmente por via oral, pela ingestão de alimento contaminado com poliedros virais (Ribeiro et al., 2009a; Rohrmann, 2013). No ciclo infeccioso, vários tecidos já foram reconhecidos como alvos do BmNPV, caracterizando-o como um vírus entomopatogênico poliorganotrófico (Brancahão et al., 2002b, 2009; Torquato et al., 2006a; Pereira et al., 2008; Ribeiro et al., 2009a; Baggio et al., 2014; Vessaro-Silva et al., 2014; Senem et al., 2016).

O sinal externo mais característicos da infecção são as mudanças que ocorrem no tegumento da lagarta contaminada, como alterações em sua coloração, decorrentes da lise de células gordurosas infectadas que liberam fosfolipídeos, colesterol e ácidos graxos na hemolinfa, juntamente com poliedros virais maduros. Como efeitos avançados da infecção, o tegumento pode sofrer rupturas, devido a fragilidade ocasionada pelo BmNPV, liberando os poliedros virais no meio que são disseminados (Brancahão et al., 2002b; Ribeiro et al., 2009a).

O tegumento dos insetos é constituído por uma camada epitelial denominada epiderme, com capacidade de secretar e manter a matriz extracelular, e a cutícula, que é periodicamente substituída na passagem das fases imaturas dos insetos (Locke, 2001; Schwarz and Moussian, 2007). A cutícula esclerotizada confere estruturação ao corpo

e resistência contra a dissecação, sendo vitais para o sucesso territorial dos insetos (Snodgrass and Eickwort, 1993; Chapman, 1998). Tendo em vista a importância do tegumento para os insetos e da sua relevante participação na disseminação de poliedros, o presente estudo teve como objetivo avaliar ultraestruturalmente a citopatologia causadas pelo BmNPV em células do tegumento de lagartas de *B. mori*.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Insetos

Os experimentos foram realizados com o híbrido comercial de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) obtido da indústria sericícola Fiação de Seda BRATAC S.A., Paraná, Brasil, e mantido em salas de criação, recebendo folhas frescas de amoreira (*Morus* sp.) como anteriormente descrito por Ribeiro et al. (2009b).

### 2.2. Inoculação viral

O inóculo BmNPV, cedido por Brancalhão (2002) (GenBank access number EU251694.1), foi quantificado em câmaras de Neubauer na concentração de  $1,70 \times 10^7$  cops/mL (cops: corpos de oclusão poliédricos). Para a inoculação, as lagartas mantidas confinadas individualmente, após a muda para o 5º instar, foram alimentadas com discos foliares (diâmetro de  $2 \text{ cm}^3$ ), previamente pulverizados com 10  $\mu\text{L}$  de suspensão viral. O controle foi alimentado com moldes foliares contendo água filtrada. Após a alimentação as lagartas foram transferidas para salas de criação recebendo folhas livres de BmNPV, três vezes ao dia até o início da formação do casulo.

A confirmação da infecção pelo BmNPV foi determinada pelo acompanhamento dos sinais apresentados pelas lagartas, como os descritos por Ribeiro et al. (2009b) de alterações na coloração do tegumento e inchaço das membranas segmentares, e pela presença de poliedros virais na hemolinfa (Senem et al., 2016).

### *2.3. Microscopia de Eletrônica de Transmissão*

As lagartas dos grupos controle e infectado foram aleatoriamente selecionadas no 7º dia pós-inoculação (dpi) (Ribeiro et al., 2009b). Foram anestesiadas no gelo e dissecadas ventralmente através de uma abertura longitudinal expondo todo o seu tegumento. Com auxílio de microscópio estereoscópio, este tecido foi segmentado na região dorsal, próximo as gônadas, e transferido para frascos individualizados e identificados contendo solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2). Todas as amostras foram coletadas em triplicata.

As amostras permaneceram em solução fixadora por 24 horas e foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 2 horas, e contrastadas em acetato de uranila 0,5% por 1 hora a temperatura ambiente. A desidratação ocorreu pelo aumento em série da concentração de acetona (50%, 70%, 80%, 90% e 100%) até a inclusão em resina Polybed 812. Os cortes ultrafinos obtidos foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JM 1400, no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá, UEM.

### **3. Resultados e Discussão**

Os primeiros sinais externos, característicos da infecção pelo BmNPV, ocorreram a partir do 5º DPI com a alteração na coloração do tegumento de branco para branco-amarelado, assim como observado por Ribeiro et al. (2009b). Entretanto, a evolução do quadro sintomático foi mais rápida que a descrita na literatura, ocorrendo inchaço das membranas intersegmentares, rastro leitoso pela ruptura do tegumento e morte de mais de 50% das lagartas em até 48 horas após o surgimento dos primeiros sinais (Brancahã, 2002; Ribeiro et al., 2009b).

Diferentes intervalos de evolução da doença são comuns nas infecções causadas pelo BmNPV, estas variações podem estar relacionadas com o inóculo, devido a virulência de isolados virais e quantidade de poliedros ingeridos (Hong et al., 2000; Brancalhão et al., 2002; Zhang et al., 2012); com as alterações climáticas de temperatura, humidade e poluição (Hussain et al., 2011; Porto, 2012; Rahmathulla, 2012; Li et al., 2015); com a criação das lagartas, pela dieta, qualidade e disponibilidade das folhas de amoreira ofertadas e número de indivíduos por caixa de criação (Porto et al., 2004; Sajad et al., 2014; Saviane et al., 2014; Thulasi and Sivaprasad, 2015) e com as linhagens e híbridos utilizados. Diferentes linhagens de *B. mori* possuem uma maior resistência a patógenos, e o seu estudo conciliado a produção de híbridos resistentes diminuem a incidência de doenças (Nakazawa et al., 2004; Pereira et al., 2013; Zhou et al., 2013).

Além disso, foi observado o prolongamento do estágio larval, com duração de 11 dias para as lagartas inoculadas, enquanto que o grupo controle teve duração de 9 dias. Este aumento da duração do ciclo larval também foi observado por Brancalhão et al. (2002) e Ribeiro et al. (2009) em lagartas de *B. mori* infectadas pelo BmNPV. O prolongamento pode estar relacionado a atividade da enzima ecdisteróide UDP-glicosiltransferase, desregulando o seu crescimento e metamorfose (O'Reilly and Miller, 1989, Bianchi et al., 2000). Muitos NPVs contêm o gene EGT, e estas alterações prolongam o estágio em que o inseto se alimenta constantemente e resultam no aumento da produção da progênie viral (Pinedo et al., 2003; Simón et al., 2012, Katsuma and Shimada, 2015).

A análise citopatológica das células do tegumento de *B. mori* infectado pelo BmNPV revelou núcleo hipertrófico com presença de viroplasma ou poliedros virais em diferentes fases do ciclo infeccioso, indicando o aspecto assincrônico da infecção viral (Fig. 1A e B) (Brancalhão et al., 2009; Senem et al., 2016). Durante a infecção, a primeira

estrutura viral visível é o viroplasma ou estroma virogênico, onde a produção dos nucleocapsídeos ocorre sem o envelope que, posteriormente, é adquirido na formação dos nucleocapsídeos envelopados ou vírions (Adams and McClintock, 1991; Slack and Arif, 2007). Rohrmann (2013) reporta que o envelope dos nucleocapsídeos resulta da membrana nuclear interna associada a proteínas virais. Após a síntese dos nucleocapsídeos, estes se concentram ao redor da poliedrina, iniciando a formação do poliedro (Fig. 1A e B), inicialmente sem formato definido, conforme discutido por Torquato et al. (2006b), denominando-o imaturo.

Quando maduros, os poliedros adquirem forma característica (Fig. 1B), cuja geometria prevalente é a de um octaédrico truncado (Torquato et al., 2006b). Na maturação adquirem um envelope membranoso também oriundo da membrana nuclear interna (Hong et al., 1997), observado na Fig. 1A. Diferentes formas e tamanhos de poliedros podem ser visualizadas, dependendo da quantidade de nucleocapsídeos incluídos, metabolismo da célula infectada, variabilidade genética e até mesmo plano de visualização em microscopia (Adams and McClintock, 1991; Torquato et al., 2006b; Cheng et al., 2013a; Chaeychomsri, 2015). Poliedros mutantes de baculovírus, podem formar corpos de oclusão cúbicos, após várias passagens do inóculo viral, seja em células em cultura ou organismo do inseto, para replicação do mesmo (Katsuma et al, 1999; Lua et al., 2002; Cheng et al., 2013b). A passagem seriada também pode levar ao acúmulo de poliedros mutantes no inóculo, e a diminuição da quantidade de nucleocapsídeos contidos no interior do poliedro, reduzindo a sua virulência (Kumar and Miller, 1987; Moscardi et al., 2011; Chakraborty et al., 2012). No presente estudo, a virulência do inóculo pode ser considerada alta, devido a rápida morte das lagartas após a manifestações dos primeiros sinais, e também devido ao alto índice de mortalidade verificada.

Somando-se a estas alterações, as células epiteliais cúbicas apresentaram sua região apical alterada, pela desorganização das microvilosidades cobertas pelas placas de membrana plasmática, que perdem o contato com a porção interna da endocutícula (Fig. 1B e 2A). Na Fig. 2B está o material controle para comparação. Estas áreas densamente marcadas são aglomerados de enzimas quitinossintetizantes (Locke and Huie, 1979; Locke, 1998), que devido as alterações metabólicas do inseto infectado perdem sua funcionalidade, assim como discutido por Vessaro-Silva et al. (2014).

A endocutícula se apresentou desorganizada nas células infectadas (Fig. 2A), perdendo o padrão lamelar normal de cadeias polissacarídicas de quitina interligadas paralelamente por microfibrilas (Locke, 1969; Lamer and Dorn, 2001; Ziese and Dorn, 2003; Merzendorfer, 2006). Isso possivelmente ocorreu devido a quebras das ligações moleculares das quitinas e microfibrilas, próximas as microvilosidades. Smagghe et al. (1996) observaram alterações nas microvilosidades e no padrão lamelar da cutícula de *Spodoptera exigua* exposta a tebufenozoíde, um inseticida que atua como agonista de ecdisteróides, esteroides que influenciam no processo da ecdise. De forma semelhante, Oh et al. (2013) visualizaram irregularidades na cutícula lamelar e presença de quitinases entre estas lamelas em *Pieris rapae*, infectadas com granulovírus.

As alterações citopatológicas resultaram em aberturas entre o epitélio e a endocutícula (Fig. 1B e 2A), ocasionando uma fragilidade no tegumento do inseto infectado pelo BmNPV. De forma análoga, aberturas no tegumento são características na muda do inseto, onde o processo de apólise, separa a endocutícula e a camada epitelial formando o espaço apolisial (Locke, 1969; Cohen, 2001; Merzendorfer and Zimoch, 2003). Oh et al. (2013) visualizaram a ruptura parcial da membrana basal em células epidérmicas de *Pieris rapae* infectadas com granulovirus, o mesmo ocorrendo neste estudo (não mostrado). Mansour et al. (2012) relataram no lepidóptero *Plutella xylostella*,

tratado com isotiocianato de alila, composto organossulfurado e repelente natural, células epidérmicas indistinguíveis e quase completamente destruídas, separadas da endocutícula por aberturas no espaço apolissial.

Regiões elétron-lucentes são visualizados em ambos os grupos, controle e infectado por todo o citoplasma de células da epiderme de *B. mori* (Fig. 1A, B e C). Hu et al. (2013) relaciona estas regiões elétron-lucentes e elipsais a grânulos de urato presentes em células da epiderme de linhagens mutantes de lagartas com coloração branca, que é o caso do híbrido utilizado. Estes grânulos provenientes do corpo gorduroso são acumulados no tegumento para estruturação da nova cutícula durante a metamorfose, e posteriormente são transportados para hemolinfa e excretados pela lagarta com o início da sua movimentação para os bosques, ocasionando na alteração gradual do tegumento de branco para translúcido (Kato et al., 2006).

Toda a desestruturação da cutícula contribui para a fragilidade e desestabilização do tegumento da lagarta. Esta debilidade tegumentar ocasionada pela infecção viral, impossibilita a proteção e manutenção da integridade anatômica que este exerce no organismo do inseto, podendo ocasionar danos nas funções de anexos articulares que permitem os movimentos, nas impressões de respostas as mudanças do ambiente realizadas por órgãos especializados do exoesqueleto e nas glândulas responsáveis pela produção de hormônios (Vicent and Wegst, 2004; Andersen, 2010). Estes resultados também foram observados por Brancalhão et al. (2002) e Ribeiro et al. (2009), que descreveram a fragilidade e ruptura do tegumento como parte da sintomatologia característica da infecção pelo BmNPV em lagartas de *B. mori*.

Assim, verifica-se que a citopatologia da infecção nas células epiteliais tegumentares de lagartas de *B. mori* segue o padrão para AlfaBV. Adicionalmente, devido



as características teciduais do órgão houve a desestruturação das placas das microvilosidades e das lamelas da endocutícula, causando a ruptura do tegumento.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem as instalações do COMCAP/UEM e dos laboratórios da UEM - Maringá/PR e da UNIOESTE – Cascavel/PR, pela infraestrutura. À Fiação de Seda BRATAC S.A., pela cooperação e fornecimento de lagartas híbridas comerciais. Pelo suporte e financiamento da CAPES/ CNPq/ Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior.

## Referências

- Adams, J.R., McClintock, J.T., 1991. Baculoviridae. Nuclear polyhedrosis viruses of insects. Atlas of Invertebrate Viruses. CRC Press, Florida.
- Andersen, S.O., 2010. Insect cuticular sclerotization: a review. Insect Biochem. Mol. Biol. 40, 166-178.
- Ardisson-Araújo, D.M.P., Melo, F.L., Souza Andrade, M., Brancalhão, R.M.C., Bão, S.N., Ribeiro, B. M., 2014. Complete genome sequence of the first non-Asian isolate of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. Virus Genes. 49, 477-484.
- Baggio, M.P.D., Ribeiro, L.F.C., Vessaro-Silva, S.A., Brancalhão, R.M.C., 2014. *Bombyx mori* pylorus infection by *Alphabaculovirus*. Genet. Mol. Res. 13, 6332-6339.
- Bianchi, F.J., Snoeiijing, I., van der Werf, W., Mans, R.M., Smits, P.H., Vlak, J.M., 2000. Biological activity of SeMNPV, AcMNPV, and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol. 75, 28–35.
- Brancalhão, R.M.C., 2002. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda. Biotec. Cien. Desenvolv. 24, 54–58.
- Brancalhão, R.M.C., Torquato, E.F.B., Castro, M.E.B., 2002a. Identificação de um isolado de *Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus (BmMNPV) no Estado do Paraná. Cent. Pesqui. Desenvolv. 33, 6–13.
- Brancalhão, R.M.C., Souza, V.B.V., Soares, M.A.M., 2002b. Infecção causada por *Nucleopolyhedrovirus* nas células gordurosas de *Bombyx mori* L. 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). Arq. Inst. Biol. 69, 57–63.

Brancalhão, R.M.C., Torquato, E.F.B., Fernandez, M.A., 2009. Cytopathology of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) silk gland caused by multiple nucleopolyhedrovirus. *Genet. Mol. Res.* 8, 162–172.

Chaeychomsri, S., Chaeychomsri, W., Ikeda, M., Kobayashi, M., 2015. Characterization of the *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus during serial passage in cell culture. *J. Adv. Agric. Technol.* 2, 63-70. doi: 10.12720/joaat.2.1.63-70

Chakraborty, S., Reid, S., 1999. Serial passage of a *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* cell cultures. *J. Invertebr. Pathol.* 73(3), 303-308.

Chakrabarty, S., Deb, S., Saha, A.K., Hazra, N., Manna, B., Bindroo, B.B., 2012. Dimorphism in nuclear polyhedrosis virus (BmNPV)(Family: *Baculoviridae*) causing ‘grasserie’ disease in silkworm (*Bombyx mori* L.): light and electron microscopy and protein profile. *Appl. Biol. Res.* 14(2), 176-186.

Chapman, R.F., 1998. *The insects: structure and function*. 4<sup>th</sup>. Cambridge. Cambridge.

Chen, S., Hou, C., Bi, H., Wang, Y., Xu, J., Li, M., James A.A., Huang, Y., Tan, A., 2017. Transgenic CRISPR/Cas9-mediated viral gene targeting for antiviral therapy of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV). *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.02465-16.

Cheng, X.H., Kumar, C.S., Arif, B.M., Krell, P.J., Zhang, C.X., Cheng, X.W., 2013a. Cell-dependent production of polyhedra and virion occlusion of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *fp25k* mutants in vitro and in vivo. *J. Gener. Virol.* 94, 177-186.

Cheng, X.H., Hillman, C.C., Zhang, C.X., Cheng, X.W., 2013b. Reduction of polyhedrin mRNA and protein expression levels in *Sf9* and *Hi5* cell lines, but not in *Sf21* cells, infected with *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *fp25k* mutants. *J. Gener. Virol.* 94, 166-176.

- Cohen, E., 2001. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag. Sci.* 57, 946-950.
- Dourado, L.A., Ribeiro, L.F.C., Brancalhão, R.M.C., Tavares, J., Borges, A.R., Fernandez, M.A., 2011. Silkworm salivary glands are not susceptible to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Genet. Mol. Res.* 10, 335-339.
- Fernandez, M. A., Ciferri, R. R., Patussi, E. V., Pereira, M. F., Felipes, J., Bravo, J. P., Balani, V.A., 2005. A utilização da biotecnologia na sericicultura brasileira. *Biotechnol. Cienc. Desenvolv.* 35, 56-61.
- Goldsmith, M.R., Shimada, T., Abe, H., 2005. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. *Annu. Rev. Entomol.*, 50, 71-100.
- Hong, T., Summers, M.D., Braunagel, S.C., 1997. N-terminal sequences from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion derived virus. *Proc. Natl Acad. Sci.* 94, 4050-4055.
- Hong, H.K., Woo, S.D., Choi, J.Y., Lee, H.K., Kim, M.H., Je, Y.H., Kang, S.K., 2000. Characterization of four isolates of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. *Arch. Virol.* 145, 2351-2361.
- Hu, Y.G., Shen, Y.H., Zhang, Z., Shi, G.Q., 2013. Melanin and urate act to prevent ultraviolet damage in the integument of the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 83(1), 41-55.
- Hussain, M., Naeem, M., Khan, S.A., Bhatti, M.F., Munawar, M., 2011. Studies on the influence of temperature and humidity on biological traits of silkworm (*Bombyx mori* L.; Bombycidae). *Afr. J. Biotech.* 10, 12368-12375.

Jehle, J.A., Blissard, G.W., Bonning, B.C., Cory, J.S., Herniou, E.A., Rohrmann, G.F., Theilmann, D.A., Thiem, S.M., Vlak, J. M., 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch. Virol.* 151(7), 1257-1266.

Jiang, L., Cheng, T., Zhao, P., Yang, Q., Wang, G., Jin, S., Lin, P., Xiao, Y., Xia, Q., 2012. Resistance to BmNPV via overexpression of an exogenous gene controlled by an inducible promoter and enhancer in transgenic silkworm, *Bombyx mori*. *PloS One*, 7(8), 1-9.

Kato, T., Sawada, H., Yamamoto, T., Mase, K., Nakagoshi, M., 2006. Pigment pattern formation in the quail mutant of the silkworm, *Bombyx mori*: parallel increase of pteridine biosynthesis and pigmentation of melanin and ommochromes. *Pigment Cell Res*, 19, 337-345.

Katsuma, S., Noguchi, Y., Shimada, T., Nagata, M., Kobayashi, M., Maeda, S., 1999. Molecular characterization of baculovirus *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* polyhedron mutants. *Arch. Virol.* 144, 1275-1285.

Katsuma, S., Shimada, T., 2015. The killing speed of *egt*-inactivated *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus depends on the developmental stage of *B. mori* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 126, 64-70.

King, A.M., Lefkowitz, E., Adams, M.J., Carstens, E.B., 2011. *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.

Kumar, S., Miller, L.K., 1987. Effects of serial passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in cell culture. *Virus Res.* 7, 335-349.

Lamer, A., Dorn, A., 2001. The serosa of *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera): ontogeny, secretory activity, structural changes, and functional considerations. *Tissue and Cell*. 33, 580-595.

Li, M.W., Yu, H.J., Yi, X.L., Li, J., Dai, F.Y., Hou, C.X., 2015. Marker-assisted selection in breeding silkworm strains with high tolerance to fluoride, scaleless wings, and high silk production. *Genet. Mol. Res.* 14, 11162-11170.

Locke, M., 1969. The structure of an epidermal cell during the development of the protein epicuticle and the uptake of molting fluid in an insect. *J. Morphol.* 127(1), 7-39.

Locke M., 1998. *Epidermis. Microscopic anatomy of invertebrates. Insecta.* New York.

Locke, M., 2001. The Wigglesworth Lecture: Insects for studying fundamental problems in biology. *J. Insect Physiol.* 47, 495-507.

Locke, M., Huie, P., 1979. Apolysis and the turnover of plasma membrane plaques during cuticle formation in an insect. *Tissue and Cell.* 11, 277-291.

Lua, L.H., Pedrini, M.R., Reid, S., Robertson, A. Tribe, D.E., 2002. Phenotypic and genotypic analysis of *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* serially passaged in cell culture. *J. Gen. Virol.* 83, 945–955.

Mansour, E.E., Zhang, G.A., Mi, F., Wang, Y., Kargbo, A., 2012. Ultra-structural changes in the integument induced by the use of three of six forms of allylisothiocyanate tested against *Plutella xylostella* and *Pieris rapae* larvae. *Pest. Biochem. Physiol.* 102(3), 237-243.

Merzendorfer, H., 2006. Insect chitin synthases: a review. *J. Comp. Physiol.* 176, 1–15.

Merzendorfer, H., Zimoch, L., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4393-4412.

Moscardi, F., Souza, M.L., Castro, M.E.B., Moscardi, M.L., Szewczyk, B., 2011. *Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. Microbes and microbial technology.* Springer, New York.

Nakazawa, H., Tsuneishi, E., Ponnuvel, K.M., Furukawa, S., Asaoka, A., Tanaka, H., Yamakawa, M., 2004. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against *nucleopolyhedrovirus*. *Virology* 321(1), 154-162.

Oh, S., Kim, D.H., Patnaik, B.B., Jo, Y.H., Noh, M.Y., Lee, H.J., Jeong, H.C., 2013. Molecular and immunohistochemical characterization of the chitinase gene from *Pieris rapae granulovirus*. *Arch. Virology* 158, 1701-1718.

Oliveira, J.V., Wolff, J.L.C., Garcia-Maruniak, A., Ribeiro, B.M., de Castro, M. E. B., de Souza, M.L., Andrade Zanotto, P.M., 2006. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virology* 87, 3233-50.

O'Reilly, D.R., Miller, L.K., 1989. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science* 245, 1110–1112.

Pereira, E.P., Conte, H., Ribeiro, L.F.C., Zanatta, D.B., Bravo, J.P., Fernandez, M.A., Brancalhão, R.M.C., 2008. Cytopathological process by multiple nucleopolyhedrovirus in the testis of *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *J. Invertebr. Pathology* 99(1), 1-7.

Pereira, N.C., Munhoz, R.E.F., Bignotto, T.S., Bessaluk, R., Garay, L.B., Saez, C.R.N., V.A. Fassina, A. Nembri; Fernandez, M.A., 2013. Biological and molecular characterization of silkworm strains from the Brazilian germplasm bank of *Bombyx mori*. *Genet. Mol. Res.* 12(2), 2138-2147.

Pinedo, F.J.R., Moscardi, F., Luque, T., Olszewski, J.A., Ribeiro, B.M., 2003. Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) gene of *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. *Biol. Control* 27, 336–344.

Porto A.J., Okamoto, F., Cunha, E.A., Otsuk, I.P., 2004. Caracterização de oito raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). Cienc. Rural. 34, 259-264.

Porto, A.J., (2012). Desempenho de raças de *Bombyx mori* L. sob condições limites de temperatura. Semina: Cienc. Agr. 33(4), 1263-1272.

Rahman, M.M., Gopinathan, K.P., 2004. Systemic and in vitro infection process of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. Virus Res. 101(2), 109-118.

Rahmathulla, V.K., 2012. Management of climatic factors for successful silkworm (*Bombyx mori* L.) crop and higher silk production: A Review. Psyche: J. Entomol. doi: 10.1155/2012/121234

Ribeiro, L.F.C., Brancalhão, R.M.C., Torquato, E.F.B., Fernandez, M.A., 2009a. Susceptibility of the *Bombyx mori* cardia cells to *Nucleopolyhedrovirus*, multiple subgroup, BmMNPV. J. Invertebr. Pathol. 100, 195-198.

Ribeiro, L.F.C., Zanatta, D.B., Bravo, J.P., Brancalhão, R.M.C., Fernandez, M.A., 2009b. Molecular markers in commercial *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) hybrids susceptible to *multiple nucleopolyhedrovirus*. Genet. Mol. Res. 8, 144-153.

Rohrmann, G.F., 2013. Baculovirus molecular biology. National Library of Medicine. Corvallis.

Sajad, U.H., Hasan, S.S., Dhar, A., Mittal, V., 2014. Nutrigenic efficiency change and cocoon crop loss due to assimilation of leaf spot diseased mulberry leaf in silkworm, *Bombyx Mori* L. J. Plant Pathol. Microbiol. 5(2), 1-7.

Saviane, A., Toso, L., Righi, C., Pavanello, C., Crivellaro, V., Cappellozza, S., 2014. Rearing of monovoltine strains of *Bombyx mori* by alternating artificial diet and mulberry leaf accelerates selection for higher food conversion efficiency and silk productivity. Bulletin Insectol. 67(2), 167-174.



Slack, J., Arif, B.M., 2007. The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Adv. Virus Res.* 69, 99–165.

Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M., Caballero, P., 2012. Deletion of *egt* is responsible for the fast-killing phenotype of natural deletion genotypes in a *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus population. *J. Invertebr. Pathol.* 111, 260–263.

Schwarz, H., Moussian, B., 2007. Electron-microscopic and genetic dissection of arthropod cuticle differentiation. *Modern Resesearch and Educational Topics in Microscopy.* Formatex. 316-325.

Senem, J.V., Torquato, E.F.B., Ribeiro, L.F.C., Brancalhão, R.M.C., 2016. Cytopathology of the trachea of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) to *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. *Micron*, 80, 39-44.

Smaghe, G., Viiiuela, E., Budia, F., Degheele, D., 1996. In vivo and in vitro effects of the nonsteroidal ecdysteroid agonist tebufenozide on cuticle formation in *Spotfopfera exigua*: An ultrastructural approach. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32, 121-134.

Snodgrass, R.E., Eickwort, G.C., 1993. *Principles of Insect Morphology.* Cornell University Press, New York.

Torquato, E.F., Neto, M., Brancalhão, R., 2006. Nucleopolyhedrovirus infected central nervous system cells of *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae). *Neotrop. Entomol.* 35(1), 70-74.

Torquato, E.F., Neto, M., Brancalhão, R., Franco, V.S., 2006. Nucleopolyhedrovirus: scanning electron microscopy technique. *Neotrop. Entomol.* 35(6), 787-790.

Thulasi, N., Sivaprasad, S., 2015. Larval growth, silk production and economic traits of *Bombyx mori* under the influence of honey-enriched mulberry diet. *J. Appl. Natl. Sci.* 7(1), 286-292.

Vessaro-Silva, S.A., Brancalhão, R.M.C., Baggio, M.P.D., Ribeiro, L.F.C., 2014. Cells of the rectum of *Bombyx mori* affected by experimental inoculation with *Alphabaculovirus*. *Genet. Mol. Res.* 13, 6885-6891.

Vincent, J.F., Wegst, U.G., 2004. Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Struct. Develop.* 33(3), 187-199.

Wang, X.Y., Yu, H.Z., Geng, L., Xu, J.P., Yu, D., Zhang, S.Z., Ma, Y., Fei, D.Q., 2016. Comparative Transcriptome Analysis of *Bombyx mori* (Lepidoptera) Larval Midgut Response to BmNPV in Susceptible and Near-Isogenic Resistant Strains. *PloS One*, 11(5), 1-22.

Zhang, M.J., Cheng, R.L., Lou, Y.H., Ye, W.L., Zhang, T., Fan, X.Y., Zhang, C.X., 2012. Disruption of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* ORF71 (Bm71) results in inefficient budded virus production and decreased virulence in host larvae. *Virus Genes*, 45(1), 161-168.

Zhou, M., Sun, X., Sun, X., Vlak, J.M., 2005. Horizontal and vertical transmission of wild-type and recombinant *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid *nucleopolyhedrovirus*. *J. Invertebr. Pathol.* 89, 165-175.

Zhou, Y., Gao, L., Shi, H., Xia, H., Gao, L., Lian, C., Liu, X., 2013. Microarray analysis of gene expression profile in resistant and susceptible *Bombyx mori* strains reveals resistance-related genes to *Nucleopolyhedrovirus*. *Genom.* 101(4), 256-262.

Ziese, S., Dorn, A., 2003. Embryonic integument and “molts” in *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera). *J. Morphol.*, 255(2), 146-161.

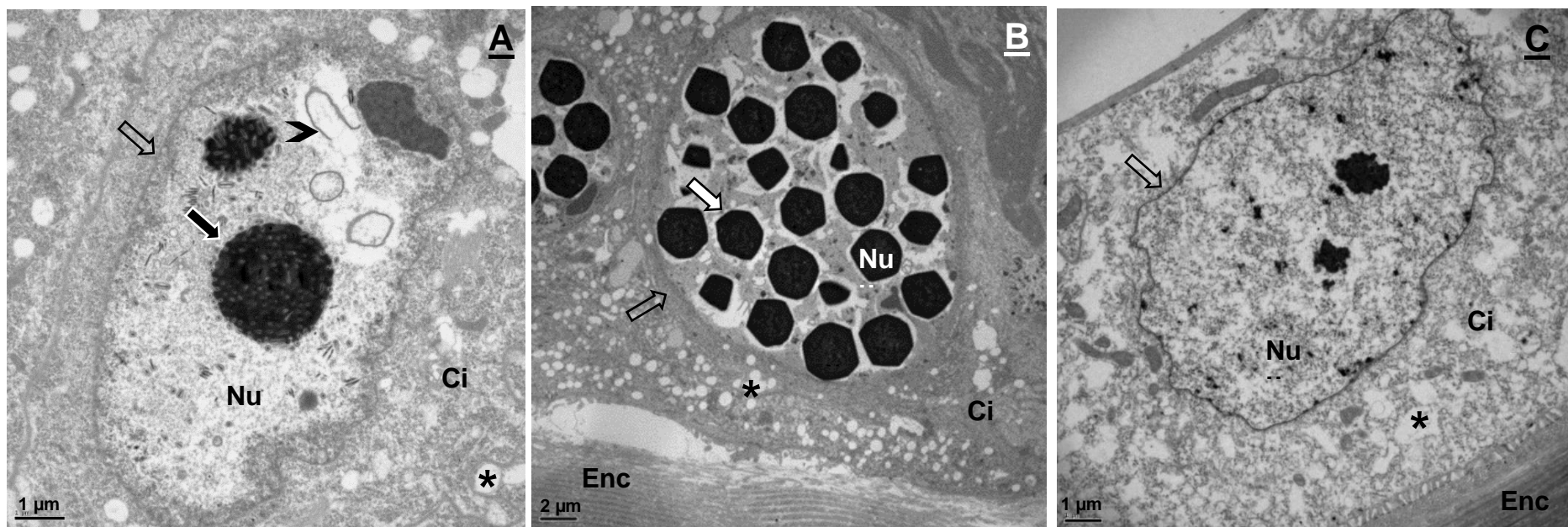


Figura 1 - Eletromicrografias de transmissão do tegumento de *B. mori*, infectados pelo BmNPV, 7<sup>o</sup> DPI (A e B) e controle (C). Núcleo (Nu) hipertrófico com poliedros em formação (seta preta), envelope (ponta de seta preta) e poliedros maduros (seta branca). Citoplasma (Ci), regiões elétron-lucentes (asterisco), envoltório nuclear (seta vazada) e endocutícula (Enc).

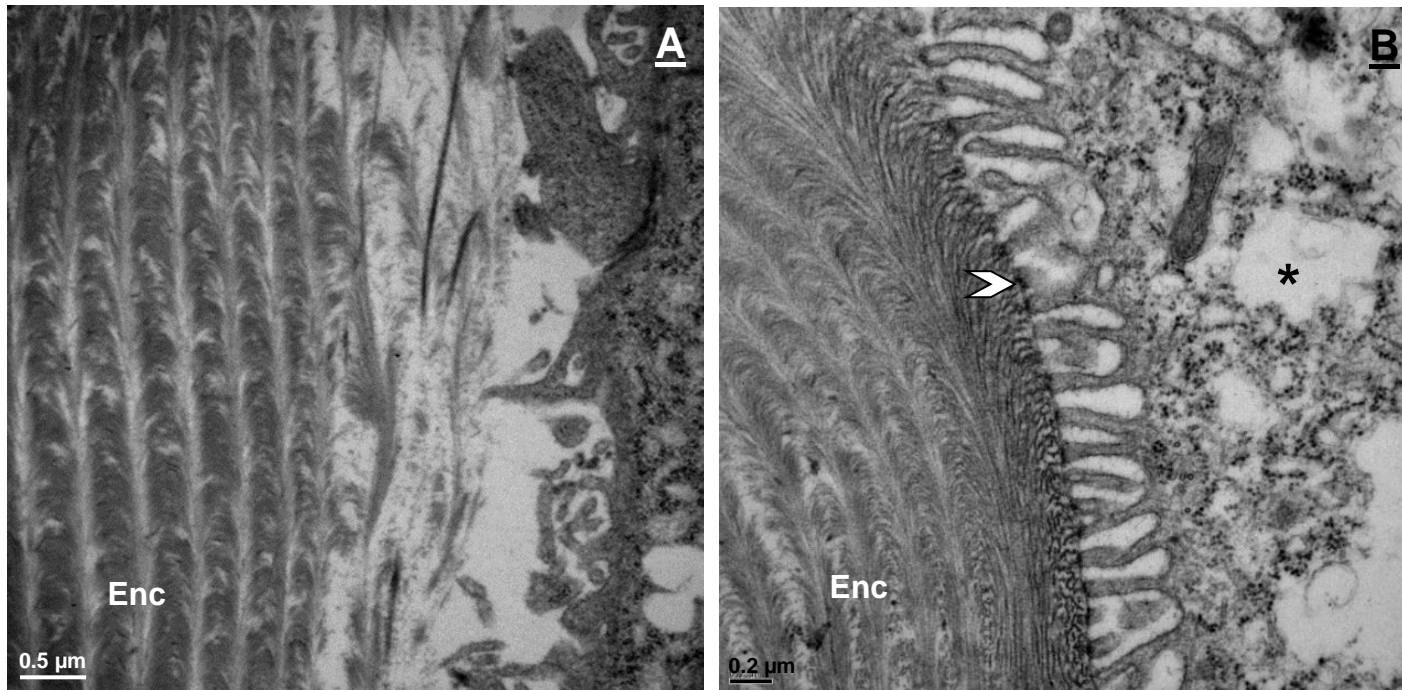


Figura 2 - Eletromicrografias de transmissão do tegumento de *B. mori* infectados pelo BmNPV, 7<sup>o</sup> DPI (A) e controle (B). Ápice celular com as microvilosidades desorganizadas (A), placas de membrana plasmática (ponta de seta branca), endocutícula (Enc) e regiões elétron-lucentes (asterisco).

ECOLOGY, BEHAVIOR AND BIONOMICS

**Parâmetros Biológicos e Produtivos de Linhagens de *Bombyx mori*, Linneau (Lepidoptera: Bombycidae) Infectadas pelo BmNPV**

AL ORO<sup>1</sup>, GM PESSINI<sup>1</sup>, VA FASSINA<sup>1</sup>, AS CHIARELLO<sup>1</sup>, REF MUNHOZ<sup>1</sup>, RMC BRANCALHÃO<sup>2</sup>, LFC RIBEIRO<sup>2</sup>, MA FERNANDEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde; Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil

**Autor Correspondente:**

Maria Aparecida Fernandez

Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá

Av. Colombo, 5790; 87020-900 - Maringá, Paraná, Brasil

Phone: 55 (44) 3011 1314/Fax: 55 (44) 3011 4893

E-mail: mafernandez@uem.br

**Running Title:** Caracterização de Linhagens de *Bombyx mori* Infectadas pelo BmNPV

RESUMO - O híbrido melhorado para o campo e resistente a patógenos é resultado do cruzamento de linhagens de *Bombyx mori* (Linneau). *Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus* é o principal responsável por perdas nas criações afetando diretamente a produção de fios. Neste estudo, verificou-se o efeito de diferentes concentrações de BmNPV em duas linhagens (AS31 e BBJ) e um híbrido comercial de *B. mori*. As lagartas foram inoculadas com oito concentrações de BmNPV, e seus dados produtivos registrados analisados estatisticamente. Foi observado diferentes valores de CL<sub>50</sub> para os três genótipos analisados. Os valores de AS31 foram semelhantes aos observados em estudos de atividade antiviral com linhagens potencialmente resistentes. BBJ e AS31 apresentaram valores aproximados no limiar da CL<sub>50</sub>, nas análises estatísticas de mortalidade por concentração e por dia pós-inoculação (DPI), e no início dos sintomas. A concentração C7 ( $5 \times 10^7$  corpos de oclusão poliédricos /mL) e o 6º e 7º DPIs foram os mais expressivos para mortalidade. O início dos sintomas ocorreu a partir do 4º DPI nas maiores concentrações. As manifestações nestes DPIs também são relatadas em estudos citopatológicos para altas concentrações. Híbrido e AS31 foram semelhantes nas características produtivas e de prolongamento do estágio larval, apresentando teor de seda significativo mesmo em elevadas concentrações. Podemos concluir que as linhagens AS31 e BBJ apresentam semelhanças em relação a susceptibilidade viral, porém, AS31 demonstrou ser a linhagem com maior potencial para estudos de melhoramento genético por apresentar produtividade equivalente ao híbrido comercial.

**Palavras-chave:** Baculovírus, concentração sub-letal, produtividade, sericultura, susceptibilidade.

## Introdução

A sericicultura é uma importante atividade agroindustrial no Brasil e no mundo, que envolve a criação do bicho-da-seda, *Bombyx mori*, L. (Lepidoptera: Bombycidae), para a produção de casulos, cujos fios são processados em larga escala e destinados à fiação (Goldsmith *et al* 2005). *B. mori*, não se encontra mais presente na natureza e, devido ao contínuo processo de domesticação, perdeu a tolerância ao ambiente externo, estando presente apenas em bancos de germoplasma. Estes estoques representam o único modo de preservar a herança genética do inseto, e a Universidade Estadual de Maringá (UEM) possui o único banco de germoplasma de *B. mori* público do Brasil (Pereira *et al* 2013).

Além de suas aplicações na indústria de fiação o bicho-da-seda também é utilizado como inseto modelo, fornecendo uma gama de informações relacionadas à pesquisas na área de genética. Estudos sobre o polimorfismo de *B. mori* tem promovido grande avanço na caracterização e conservação de linhagens puras e obtenção de híbridos (Fernandez *et al* 2005). A introdução de híbridos no campo é uma alternativa para aumentar a produtividade de seda, diminuir a sua susceptibilidade a doenças e melhorar sua adaptabilidade à variadas condições do ambiente (Zanatta *et al* 2009).

Linhagens de *B. mori* dependem de várias respostas imunes inatas para combater a invasão de patógenos, apresentando particularidades relacionadas ao seu desenvolvimento, comportamento e características bioquímicas e morfológicas (Arukumar *et al* 2006, Zhou *et al* 2013). O cruzamento de diferentes linhagens geográficas cria grande diversidade genética que adiciona muitas características como a forma do corpo, a tolerância térmica, a duração do ciclo e a resistência imunológica. As linhagens japonesa e chinesa são as mais utilizadas na produção de híbridos comerciais, mostrando grandes diferenças nos caracteres quantitativos e qualitativos que afetam a produção de seda e a resistência a patógenos (Nagaraju 2000).

Durante o estágio larval, *B. mori* é susceptível a doenças, principalmente as virais. Dentre estas, as causadas pelo *Alphabaculovirus* (*AlfaBV*), podem causar grandes perdas econômicas à sericultura (Miao *et al.*, 2005). Os *AlfaBVs* são específicos de lepidópteros e são constituídos por uma molécula circular de DNA de cadeia dupla, que se associa com proteínas para formar o nucleocapsídeo; quando envolto individualmente por um envelope lipoproteico é denominado simples (SNPV), já os múltiplos (MNPV) apresentam mais de um nucleocapsídeo por envelope. Os NPV se agrupam em um corpo de oclusão poliédrico, constituído por poliedrina que confere proteção aos vírions (Ardisson-Araújo *et al* 2014).

Brancahão (2002) identificou no estado do Paraná, BR, um isolado geográfico do NPV que infecta lagartas de *B. mori*, o *Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus* (BmNPV). A citopatologia deste isolado geográfico viral foi descrita por vários autores (Pereira *et al* 2008, Brancahão *et al* 2009, Ribeiro *et al* 2009a, Baggio *et al* 2014, Vessaro-Silva *et al* 2014, Senem *et al* 2016), que discutem o impacto do BmNPV na produtividade da seda. Katsuma (2015) e Chaeychomsri (2015) relata que mutações no gene *fp25k* pode ocorrer e se acumularem rapidamente durante passagens seriadas para replicação viral. Estas mutações coincidem com as alterações fenotípicas ocasionadas pela redução da poliedrina, resultando em poliedros mutantes (Harrison *et al* 1996, Lin *et al* 2000, Cheng *et al* 2013).

A acumulação destas mutações pode resultar em diminuição da replicação viral e da virulência (Kumar & Miller 1987, Lua *et al* 2002, Simón *et al* 2012), sendo assim necessário monitorar alterações do BmNPV que afetem caracteres produtivos no campo. Este estudo objetivou avaliar características biológicas e produtivas de duas linhagens e um híbrido comercial de *B. mori* inoculados experimentalmente com um isolado geográfico de BmNPV da região noroeste do estado do Paraná, Brasil.



## **Materiais e Métodos**

### *Insetos*

Os experimentos foram realizados com 80 indivíduos para cada concentração testada nos genótipos das linhagens japonesa (BBJ) e chinesa (AS31), obtidas do banco de germoplasma da UEM, e do híbrido comercial de *Bombyx mori* obtido da indústria sericícola Fiação de Seda BRATAC S.A., Paraná, Brasil. Durante todo o experimento as lagartas foram mantidas em salas de criação, recebendo folhas frescas de amoreira (*Morus* sp.) como anteriormente descrito por Pereira *et al* (2008).

### *BmNPV*

O inóculo do BmNPV foi obtido em 2014, de lagartas de *B. mori* coletadas em barracões de criação na região noroeste, maior produtora de seda do estado do Paraná, que apresentavam os sintomas da poliedrose nuclear e, que tiveram infecção confirmada pela presença de poliedros virais na hemolinfa.

O protocolo seguiu a metodologia descrita por Brancalhão (2002). As concentrações virais foram obtidas em câmaras de Neubauer em cops/mL (cops: corpos de oclusão poliédricos). As oito concentrações virais foram determinadas como (C1)  $5 \times 10^4$  cops/mL, (C2)  $1 \times 10^5$  cops/mL, (C3)  $5 \times 10^5$  cops/mL, (C4)  $1 \times 10^6$  cops/mL, (C5)  $5 \times 10^6$  cops/mL, (C6)  $1 \times 10^7$  cops/mL, (C7)  $5 \times 10^7$  cops/mL e (C8)  $1 \times 10^8$  cops/mL.

### *Experimentação*

O experimento foi conduzido com nove tratamentos, sendo um controle e oito concentrações virais, contendo vinte lagartas por lote e quatro repetições cada tratamento. Para o experimento de inoculação pelo BmNPV, lagartas em jejum, 24 h após a muda para o 5º ínstar, foram alimentadas com moldes foliares em formato de gota (diâmetro de 4 cm<sup>3</sup>),

previamente pulverizados com 10  $\mu$ L de suspensão viral. O controle foi alimentado com moldes foliares contendo água filtrada.

As lagartas foram mantidas confinadas individualmente para garantia da total ingestão dos moldes foliares contendo a suspensão viral. Após a alimentação as lagartas foram transferidas para salas de criação recebendo folhas livres de BmNPV, três vezes ao dia até o início da formação do casulo.

A confirmação da infecção pelo inóculo foi determinada pelo acompanhamento dos sinais nas lagartas (Ribeiro *et al* 2009b), e pela presença de poliedros virais na hemolinfa coletada de lagartas com morte confirmada (Senem *et al* 2016).

#### *Análise Estatística*

A mortalidade no estágio larval foi acompanhada durante todo o desenvolvimento do 5º ínstar. O CL<sub>50</sub> da infecção pelo BmNPV foi estimado utilizando o teste de PROBIT, fornecido pela IBM SPSS Statistics 20 (SPSS, Chicago, IL, USA). Quatro repetições de cada concentração viral foram somadas e os valores de CL<sub>50</sub> determinados com intervalos de confiança de 95 %.

As variáveis quantitativas foram analisadas pelas características produtivas de comprimento do casulo (CC, mm), largura do casulo (LC, mm), teor de seda (TS, %) [TS= peso da casca sérica (g) / peso do casulo (g) x 100; 24 % é retirado desse valor pela perda durante a fiação de seda], e mortalidade das lagartas. Também foi descrito a mortalidade larval por dia. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando análise de variância no esquema fatorial duplo (três genótipos x nove tratamentos), seguindo o teste de agrupamento Scott-Knott (0.05 %) no SISVAR Statistical Software.

## Resultados e Discussão

Os resultados das quatro repetições, 20 indivíduos cada, foram somados para o cálculo do  $CL_{50}$ . O valor da  $CL_{50}$  em cops/mL calculado para as linhagens foi de  $4,81 \times 10^5$  para BBJ,  $1,38 \times 10^6$ , para AS31, e  $1,70 \times 10^7$ , para o híbrido. Analisando o limiar de confiança de 95 % para as linhagens BBJ e AS31 é possível observar valores similares de  $CL_{50}$ , que podem ser visualizados próximos as concentrações testadas C3 ( $5 \times 10^5$  cops/mL) e C4 ( $1 \times 10^6$  cops/mL). O híbrido não apresentou valores em seu limiar semelhante ao das linhagens, sendo visualizado próximo as concentrações testadas C6 ( $1 \times 10^7$  cops/mL) e C7 ( $5 \times 10^7$  cops/mL), conforme Tabela 1.

A susceptibilidade viral é diferente para linhagens e híbridos, a maioria das linhagens de *B. mori* são susceptíveis ao BmNPV, e a seleção de híbridos resistentes a patógenos para a produção de seda no campo é de grande importância (Nagaraju 2002, Bao *et al* 2009). Esta resistência dos híbridos é de origem genética e fisiológica, e é controlada por genes, que produzem proteases e lipases presentes no suco gástrico das lagartas contra a infecção viral (Nakazawa *et al* 2004, Selot *et al* 2007, Ponnuvel *et al* 2012, Wu *et al* 2016). Vários estudos são realizados para a caracterização de linhagens e produção de um vigor híbrido que possua altas taxas de resistência e produção no campo (Fernandez *et al* 2005, Rao *et al* 2006, Singh *et al* 2006, Zanatta *et al* 2009).

Valores de  $CL_{50}$  similares ao AS31 foram relatados por Cheng *et al* (2014), em duas linhagens de *B. mori* potencialmente resistentes ao BmNPV, de  $1,06 \times 10^6$  para A40 e  $1,27 \times 10^6$  cops/mL para A53. A linhagem A40 apresentou ainda um limiar de  $4,33 \times 10^5 \pm 2,63 \times 10^6$  cops/mL, que abrange o  $CL_{50}$  de BBJ. Estes resultados demonstram que apesar da concentração sub-letal de 50 % das linhagens apresentarem valores menores que do híbrido, elas ainda podem ser consideradas como potencialmente resistentes, principalmente AS31. Na análise do híbrido

comercial, este se mostrou efetivo para parâmetros de resistência, apresentado um limiar que corresponde ao  $CL_{50}$  de linhagens conhecidas como altamente resistentes (Cheng *et al* 2014).

Na utilização de marcadores RAPD para verificar a diversidade genética de 14 linhagens de *B. mori*, Pereira *et al* (2013) observaram que todas as 9 linhagens japonesas relatadas demonstraram amplificação do marcador para susceptibilidade ao BmNPV, que não ocorreu para as linhagens chinesas, incluindo AS31. Estes autores também consideraram AS31, pela ausência do marcador e pelas expressivas características produtivas como eventual linhagem para constituição de um banco de germoplasma elite.

A variável mortalidade não foi significativa na interação *Concentração x Genótipo* (Tabela 2), apresentando respostas individuais para cada genótipo. As linhagens BBJ e AS31 apresentaram maiores valores de mortalidade para o grupo controle de 21,25 e 16,25 un. (unidades), respectivamente, em relação ao híbrido de 1,25 un. Mesmo com um valor expressivo, nenhuma lagarta do grupo controle apresentou sintomas característicos da doença pelo BmNPV ou poliedros virais na hemolinfa. Pereira *et al* (2013) demonstraram taxa zero de mortalidade para o grupo controle de AS31, porém taxas significativas foram observadas em outras linhagens chinesas e japonesas. Altas taxas de mortalidade também foram apresentadas por outros autores em linhagens controles, com temperaturas controladas e em condições de limites de temperatura no 5º ínstar larval, podendo ser associada a produção por rusticidade (adaptação ao campo), onde normalmente linhagens mais produtivas apresentam menos rusticidade (Porto & Okamoto 2003, Porto *et al* 2004, Porto 2012). Hanada & Watanabe (1986) consideraram como normais uma perda de 15 % em uma criação comercial.

A mortalidade das lagartas também foi descrita como variável na interação *Concentração x DPI*, onde foi observada durante os 11 dias do 5º ínstar larval para cada genótipo. Nesta interação é possível observar que em todos os genótipos o CV (coeficiente de variação) obteve valores percentuais abaixo de 10 %, o que demonstra boa precisão da média

destas características. Nesta análise a variável é demonstrada nas Tabela 3, 4 e 5 para BBJ, AS31 e híbrido, respectivamente, e foi estatisticamente significativa ao nível 5 % de probabilidade, sendo realizado o seu desdobramento.

Para o desdobramento das concentrações, C6, C7 e C8 foram as que se destacaram, apresentando os maiores valores de mortalidade para a maioria dos DPIs com significância em todos os genótipos. Da mesma forma, estas concentrações são as maiores no 5º DPI, para BBJ e AS31, e no 8º DPI, AS31 e híbrido. Já os DPIs que apresentaram diferença significativa em todos os genótipos foram o 6º e 7º DPI, enquanto que o 1º, 2º e 3º DPI não foram significativos. Os DPIs não cotados não apresentaram diferença significativa em relação a variável mortalidade entre os genótipos. Para o desdobramento dos DPIs, a variável mortalidade também foi significativa na maioria das concentrações, não sendo estatisticamente significativo apenas o grupo controle em todos os genótipos analisados.

Em ambos desdobramentos desta interação (Tabelas 3, 4 e 5), foi verificado um comportamento similar das linhagens BBJ e AS31, destacando o 6º e 7º DPI com os maiores valores de mortalidade, e a concentração C7 como a mais agressiva nos DPIs significativos. Em relação ao híbrido comercial a concentração C8 e o 8º DPI apresentaram o maior número de mortes. Estas concentrações estão muito acima do  $CL_{50}$  encontrado para cada genótipo, podendo ser consideradas  $CL_{80}$  para as linhagens BBJ  $1,40 \times 10^7$  cops/mL e AS31  $4,71 \times 10^7$  cops/mL.

A diferença nos tempos de infecção é característica do BmNPV, e pode ocorrer por vários fatores, como virulência do isolado, quantidade de vírus ingeridos, instar larval, incidência de outros patógenos e condições ambientes como temperatura, densidade populacional, poluição e alimento ofertado (Porto *et al* 2004, Porto 2012, Saviane *et al* 2014, Li *et al* 2015). Além disso, as diferenças na resistência ao BmNPV em linhagens de *B. mori*

também é um fator importante a se considerar (Kang *et al* 2011, Pereira *et al* 2013, Zhou *et al* 2013).

Na análise das demais variáveis da interação *Concentração x Genótipo* (Tabela 2), foram estatisticamente significativas comprimento do casulo (CC) e teor de seda (TS), sendo assim realizado os seus desdobramentos. A variável produtiva largura do casulo (LC) não foi significativa. Para as concentrações de CC, houve diferença significativa apenas nas linhagens BBJ e híbrido, ambas apresentando maior comprimento no controle, C1, C2 e C3. No geral, as linhagens japonesas possuem um maior comprimento do casulo em relação as chinesas, sendo que a primeira demonstra normalmente valores acima de 30 mm enquanto a segunda apresenta valores abaixo deste (Porto *et al* 2004, Zanatta *et al* 2009, Pereira *et al* 2013). BBJ apresentou 34,27 mm de comprimento de casulo, e valores similares para as linhagens japonesas, acima de 34 mm, foram relatados por Zanatta *et al* (2009). Já para AS31 os valores relatados no controle de 30,23 mm foram semelhantes aos observados por Pereira *et al* (2013) de 29,23 mm. Estes valores são importantes se considerar que estatisticamente até a concentração viral C3, tanto BBJ quanto o híbrido comercial não sofreram perda de produtividade quando analisado a variável de comprimento do casulo, comparado ao grupo controle.

Na variável TS, o desdobramento das concentrações apresentou diferença significativa para as linhagens BBJ e AS31. O controle apresentou maior produtividade nas duas linhagens com diferença significativa, 18,28 % em BBJ e 18,81 % em AS31. Nas linhagens analisadas apenas Zanatta *et al* (2009) apresentou dados semelhantes de TS, possuindo uma média de 18,21 % na maioria das linhagens. Pereira *et al* (2013) observou um TS de 14,60 % para AS31, muito abaixo da encontrada neste estudo. Já quando analisada a média das linhagens estudadas, os valores de 16,28 %, 16,37 %, 16,01 % são semelhantes para Pereira *et al* (2013), Porto *et al* (2004) e Porto & Okamoto (2003). Valores menores foram encontrados em estudos de linhagens polivoltinas por Singh *et al* (2006) e Rao *et al* (2006) de 12,46 % e 11,10 %,

respectivamente. Estas médias estão muitas abaixo até mesmo dos valores apresentados para lagartas inoculadas com altas concentrações de BmNPV, em todos os genótipos.

O híbrido não apresentou diferença significativa nos valores de TS dos tratamentos. Isso pode ser explicado pelo alto  $CL_{50}$  que o híbrido apresenta em comparação as outras linhagens. Com uma maior resistência ao vírus, os valores produtivos de TS são pouco prejudicados, demonstrando valores mais homogêneos. Os maiores valores nas concentrações controle, C1 e C2 no genótipo BBJ, encontrados nas variáveis CC e TS, demonstraram que estas são as concentrações suportadas por esse genótipo antes de ocorrer alguma perda produtiva, e como são baixas concentrações, a sua resistência também demonstrou ser baixa. Já AS31 e o híbrido possuíram um maior TS, significativo em C3 e C7, demonstrando que estes dois genótipos possuem semelhanças em relação a sua produção e que suportam altas concentrações virais sem alteração desta produtividade. Características produtivas desempenham importante papel em programas de melhoramento para seleção de linhagens e produção de vigor híbrido. Em muitos casos somente esse levantamento é suficiente para se obter o avanço desejado (Porto *et al* 2004).

A análise sintomatológica nas lagartas de *B. mori*, 5º ínstar, demonstraram tempos diferentes de manifestação, dependendo da concentração viral e do genótipo. No geral, os sinais de infecção foram detectados a partir da parada da alimentação nas menores concentrações (C1 a C3), ocorrendo a partir do 6º DPI para as linhagens, e do 7º DPI para o híbrido. As demais manifestações como alterações do tegumento, foram visíveis 24 hrs após o início dos primeiros sintomas, ou seja, 7º DPI nas linhagens e 8º DPI no híbrido. Asha *et al* (2011) observaram tempos de manifestação dos sintomas entre 5,92 e 7,20 dias, dependendo da concentração viral utilizada.

Em altas concentrações, BBJ e AS31 apresentaram sintomas visíveis a partir do 4º DPI em algumas repetições de C7 e C8. Já o híbrido comercial demonstrou ser o mais resistente ao início dos sintomas, que se manifestaram a partir do 5º DPI em C6, C7 e C8. Brancalhão *et al*

(2002) visualizaram a manifestação dos primeiros sintomas a partir do 4° / 5° DPI em concentrações virais de  $2,26 \times 10^6$  cops/mL, enquanto que Ribeiro *et al* (2009b) observaram o início dos sintomas em dois diferentes híbridos comerciais a partir do 5° DPI utilizando concentrações de  $1,4 \times 10^6$  cops/mL de BmNPV em lagartas do 5° ínstar larval. Estas concentrações correspondem aos valores testados de C4/ C5, onde BBJ também teve início no 5° DPI na maioria das concentrações, porém está muito abaixo que o demonstrado para o híbrido comercial. Os frequentes estudos relacionados a resistência ao BmNPV, busca por novas linhagens para produção de híbridos resistentes e atualização dos bancos de germoplasma, levam ao constante melhoramento destes híbridos, o que explicaria as diferenças encontradas entre as pesquisas (Fernandez *et al* 2005, Pereira *et al* 2013, Gao *et al* 2014, Li *et al* 2016).

Outra característica visualizada da infecção viral foi o prolongamento do 5° ínstar do estágio larval nas diferentes concentrações analisadas. O grupo controle foi semelhante em todos os genótipos possuindo tempo de duração de 9 dias. Pereira *et al* (2013) observaram este mesmo período em 14 diferentes linhagens de *B. mori* e todas possuíram o tempo de duração de 8 dias, enquanto que Kumaresan *et al* (2007) observou uma variação de 3 dias a mais em 18 linhagens polivoltinas.

Asha *et al* (2012) visualizaram uma média de 9,97 dias em linhagens e híbridos no grupo controle, enquanto que em duas concentrações virais analisadas de  $10^1$  e  $10^3$  cops/mL, os valores aumentaram para uma média de 10,67 e 10,79 dias, respectivamente. As linhagens do presente estudo apresentaram tempos semelhantes de duração do 5° ínstar larval de 10/ 11 dias nas concentrações até C3 para BBJ e até C5 para AS31. O tempo de duração de 11 dias foi observado a partir de C4 em BBJ e C6 em AS31, demonstrando uma maior resistência de AS31 ao prolongamento do 5° ínstar larval pela infecção pelo BmNPV.



O híbrido demonstrou duração do ciclo larval de 9 dias até C4, e duração de 11 dias nas maiores concentrações C7 e C8. Brancalhão *et al* (2002) e Ribeiro *et al* (2009b) observaram o mesmo tempo de duração do estágio larval de 9 a 11 dias em híbridos comerciais. Pode ser observado que o prolongamento do estágio larval é diretamente proporcional ao aumento das concentrações virais, entretanto o aumento da duração do ciclo não influenciou os parâmetros de produtividade quando analisados AS31 e híbrido, já que C7 apresentou maior valor de TS nos dois genótipos, quando comparado as outras concentrações.

O prolongamento do estágio larval em lagartas infectadas pode ocorrer através do gene *EGT*, presente no genoma dos baculovírus, que codifica a produção da enzima *UDP-glicosiltransferase*, responsável pela inativação dos ecdisteróides do hospedeiro, envolvidos na regulação do desenvolvimento larval e na ecdise. Esta enzima bloqueia a capacidade da lagarta de passar para o estágio seguinte, adiando o ciclo, possivelmente para aumentar a produção e poliedros para um maior rendimento da multiplicação viral (O'Reilly & Miller 1989, Bianchi *et al* 2000, Simón *et al* 2012, Katsuma & Shimada 2015).

Os sinais e sintomas da infecção causados pelo BmNPV são reflexos das manifestações citopatológicas nos tecidos de lagartas de *B. mori* infectados pelo BmNPV. Neste caso, o núcleo se apresenta hipertrofiado e os vírions em diferentes estágios de desenvolvimento, indicando a replicação assincrônica da infecção viral (Rohrmann 2013). Autores relatam diferentes DPIs de início dos sinais e surgimento de poliedros virais no interior do núcleo celular. A ação do BmNPV em vários tecidos, caracteriza-o como um vírus entomopatogênico poliorganotrófico, deixando a lagarta debilitada por comprometer sua capacidade motora, de alimentação e de desenvolvimento, refletindo em prejuízos na fiação do casulo e possível morte do inseto (Brancalhão *et al* 2002, Torquato *et al* 2006, Pereira *et al* 2008, Brancalhão *et al* 2009, Ribeiro *et al* 2009, Baggio *et al* 2014, Vessaro-Silva *et al* 2014, Senem *et al* 2016).

Dessa forma, o comportamento citopatológico do inóculo viral coletado seguiu o mesmo padrão da infecção já descrita para o isolado geográfico de Brancalhão (2002), mostrando que a evolução da doença foi a mesma nos genótipos, e as alterações metabólicas podem ser observadas na sintomatologia da doença.

Diante do exposto, a resistência a infecção por diferentes concentrações do BmNPV, as linhagens BBJ e AS31 foram similares em relação ao limiar do  $CL_{50}$ , ao início da manifestação dos sintomas, aos DPIs e a concentrações com mortalidade mais expressiva. As interações demonstraram a concentração C7 e o 6º e 7º DPI com maior mortalidade. Entretanto em relação a análise de duração do 5º ínstar do estágio larval, a linhagem AS31 demonstrou maior similaridade com os valores observados para o híbrido comercial. Assim como, relacionado a produtividade, onde AS31 e o híbrido apresentaram maior teor de seda em C3 e C7, demonstrando que as lagartas que sobreviveram a infecção viral ainda assim produzem casulos de qualidade mesmo em concentrações agressivas. Na análise dos genótipos, os resultados indicam que a linhagem AS31 demonstrou ser a mais promissora para programas de melhoramento genético, quando avaliados os caracteres produtivos em lagartas inoculadas pelo BmNPV, de teor de seda e duração do ciclo larval.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Fiação de Seda BRATAC S.A., pela cooperação e fornecimento de lagartas híbridas comerciais. Pelo suporte e financiamento da CAPES/ CNPq/ Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, e as instalações do laboratório da UEM – Maringá/PR e UNIOESTE – Cascavel/PR.

## Referências

Asha MH, Bhaskar RN, Narayanaswamy TK, Mohan Rao A (2011). Sensitivity of silkworm breeds and their hybrids of *Bombyx mori* L. to BmNPV on ET<sub>50</sub> for symptom expression (days) and total larval mortality (%). *Int J Sci Nat* 2(1): 7-10

Asha MH, Bhaskar RN, Naika R, Gowda M, Raghunath BV (2012). Influence of silkworm breeds and their hybrids to BmNPV on fifth instar larval duration (days), pupal duration (days) and silk productivity (cg/day). *Int J Pure Appl Sci Technol* 9(2): 69-73

Ardisson-Araújo DMP, Melo FL, Souza Andrade M, Brancalhão RMC, Bão SN, Ribeiro BM (2014). Complete genome sequence of the first non-Asian isolate of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes* 49(3): 477-484. doi: 10.1007/s11262-014-1112-6

Arunkumar KP, Metta M and Nagaraju J (2006). Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkmoth, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. *Mol Phylogenet Evol* 40: 419-427

Baggio MPD, Ribeiro LFC, Vessaro-Silva AS, Brancalhão RMC (2014). *Bombyx mori* pylorus infection by *Alphabaculovirus*. *Genet Mol Res* 13(3): 6332–6339.

Bao YY, Tang XD, Lv ZY, Wang XY, Tian CH, Xu YP, Zhang CX (2009). Gene expression profiling of resistant and susceptible *Bombyx mori* strains reveals nucleopolyhedrovirus-associated variations in host gene transcript levels. *Genom* 94(2): 138-145.

Brancalhão, RMC (2002). Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda. *Biotecnol Cien Desenvol* 24: 54–58

Brancalhão RMC, Torquato EFB, Castro MEB (2002a). Identificação de um isolado de *Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus (BmMNPV) no Estado do Paraná. *Cent Pesqui Desenvol* 33: 6–13

Brancahão RMC, Souza VB, Soares MAM (2002b). Infecção causada por *Nucleopolyhedrovirus* nas células gordurosas de *Bombyx mori* L. 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). Arq Inst Biol 69(2): 57–63

Brancahão RMC, Torquato EFB, Fernandez MA (2009) Cytopathology of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) silk gland caused by multiple nucleopolyhedrovirus. Genet Mol Res 8(1): 162–172

Cheng Y, Wang XY, Du C, Gao J, Xu JP (2014). Expression analysis of several antiviral related genes to BmNPV in different resistant strains of silkworm, *Bombyx mori*. J Insect Sci 14(1): 76. doi: 10.1093/jis/14.1.76

Chaeychomsri S, Chaeychomsri W, Ikeda M, Kobayashi M. (2015). Characterization of the *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* during serial passage in cell culture. J Adv Agric Technol 2(1): 63-70. doi: 10.12720/joaat.2.1.63-70

Cheng XH, Hillman CC, Zhang CX, Cheng XW (2013). Reduction of polyhedrin mRNA and protein expression levels in *Sf9* and Hi5 cell lines, but not in *Sf21* cells, infected with *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *fp25k* mutants. J Gen Virol 94(1): 166-176

Fernandez MA, Ciferri RR, Patussi EV, Pereira MF (2005). A utilização da biotecnologia na sericultura brasileira. Biotecnol Cienc Desenvol 35: 56-61

Gao K, Deng XY, Qian HY, Qin GX, Hou, CX, Guo XJ (2014). Cytoplasmic polyhedrosis virus-induced differential gene expression in two silkworm strains of different susceptibility. Gene 539(2): 230-237.

Goldsmith MR, Shimada T, Abe H (2005) The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. Annu Rev Entomol 50: 71-100.

Hanada Y, Watanabe JK (1986) Manual de criação do bicho-da-seda. Cocamar, Curitiba, p 224

- Harrison RL, Jarvis DL, Summers MD (1996). The Role of the AcMNPV 25K gene“FP25”, in Baculovirus *polh* and *p10* Expression. *Virology* 226(1): 34-46. doi: 10.1006/viro.1996.0625
- Kang L, Shi H, Liu X, Zhang C, Yao Q, Wang Y, Chang C, Shi J, Cao J, Kong J, Chen K (2011). Arginine kinase is highly expressed in a resistant strain of silkworm (*Bombyx mori*, Lepidoptera): Implication of its role in resistance to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol* 158(3): 230-234
- Katsuma S (2015). Baculovirus controls host caterpillars by manipulating host physiology and behavior. *Agri-Biosci Monogr* 5(1):1-27. doi: 10.5047/agbm.2015.00501.0001
- Kumar S, Miller LK (1987). Effects of serial passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in cell culture. *Virus Res* 7(4): 335-349
- Kumaresan P, Sinha RK (2007). An analysis of genetic variation and divergence in Indian tropical polyvoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) genotypes. *Casp J Environ Sci*, 5(1): 11-17
- Li MW, Yu HJ, Yi XL, Li J, Dai FY, Hou CX (2015). Marker-assisted selection in breeding silkworm strains with high tolerance to fluoride, scaleless wings, and high silk production. *Genet Mol Res*, 14(3): 11162-11170.
- Lin G, Zhong J, Wang X (2000). Abnormal formation of polyhedra resulting from a single mutation in the polyhedrin gene of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *J Invertebr Pathol* 76(1): 13-19.
- Li G, Qian H, Luo X, Xu P, Yang J, Liu M, Xu A (2016). Transcriptomic Analysis of Resistant and Susceptible *Bombyx mori* Strains Following BmNPV Infection Provides Insights into the Antiviral Mechanisms. *Int J Genom*. doi: 10.1155/2016/2086346
- Lua LH, Pedrini MR, Reid S, Robertson A, Tribe DE (2002). Phenotypic and genotypic analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus serially passaged in cell culture. *J Gen Virol* 83: 945– 955

- Miao XX, Xu SJ, Li MH, Li MW, Huang JH, Dai FY, Marino SW, Mills DR, Zeng PY, Mita K, Jia SH, Zhang Y, Liu WB, Xiang H, Guo QH, Xu AY, Kong XY, Lin HX, Shi YZ, Lu G, Zhang XL, Huang W, Yasukochi Y, Sugasaki T, Shimada T, Nagaraju J, Xiang ZH, Wang SY, Goldsmith MR, Lu C, Zhao GP, Huang YP (2005). Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. Proc Nat Acad Sci USA 102(445): 16303-16308
- Nagaraju J (2000). Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*. Curr Sci 78(2): 151–161
- Nagaraju, J. (2002). Application of genetic principles for improving silk production. Curr Sci 83(4):409-414
- Nakazawa H, Tsuneishi E, Ponnuvel KM, Furukawa S, Asaoka A, Tanaka H, Ishibashi J, Yamakawa M (2004). Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. Virol 321(1): 154-162
- Pereira EP, Conte H, Ribeiro LFC, Zanatta DB, Bravo JP, Fernandez MA, Brancalhão RMC (2008). Cytopathological process by multiple nucleopolyhedrovirus in the testis of *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). J Invertebr Pathol 99(1): 1-7
- Pereira NC, Munhoz REF, Bignotto TS, Bepalhuk R, Garay LB, Saez CRN, Fassina VA, Nembri A, Fernandez MA (2013). Biological and molecular characterization of silkworm strains from the Brazilian germplasm bank of *Bombyx mori*. Genet Mol Res 12(2): 2138-2147
- Ponnuvel KM, Nithya K, Sirigineedi S, Awasthi AK, Yamakawa M (2012). In vitro antiviral activity of an alkaline trypsin from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. Arch Insect Biochem Physiol 81(2): 90-104
- Porto AJ, Okamoto F (2003). Desempenho produtivo de quatro raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) e seus cruzamentos. Bol Ind Anim 60(2): 179-184

Porto AJ, Okamoto F, Cunha EA, Otsuk IP (2004). Caracterização de oito raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). Cienc. Rural 34(1): 259-264

Porto AJ (2012). Desempenho de raças de *Bombyx mori* L. sob condições limites de temperatura. Seminar Cien Agrar 33(4): 1263-1272

Rao CGP, Seshagiri SV, Ramesh C, Basha KI, Nagaraju H (2006). Evaluation of genetic potential of the polyvoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) germplasm and identification of parents for breeding programme. J Zhejiang Univ SCI B 7(3): 215-220

Ribeiro LFC, Brancalhão RMC, Torquato EFB, Fernandez MA (2009a) Susceptibility of the *Bombyx mori* cardia cells to Nucleopolyhedrovirus, multiple subgroup, BmMNPV. J Invertebr Pathol 100: 195–198. doi: 10.1016/j.jip.2009.01.001

Ribeiro LFC, Zanatta DB, Bravo JP, Brancalhão RMC, Fernandez MA (2009b). Molecular markers in commercial *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) hybrids susceptible to multiple nucleopolyhedrovirus. Genet Mol Res 8(1): 144-153.

Rohrmann GF (2013) Baculovirus Molecular Biology. National Library of Medicine, Corvallis, p 211

Saviane A, Toso L, Righi C, Pavanello C, Crivellaro V, Cappellozza S (2014). Rearing of monovoltine strains of *Bombyx mori* by alternating artificial diet and mulberry leaf accelerates selection for higher food conversion efficiency and silk productivity. Bulletin Insectol 67(2): 167-174

Selot R, Kumar V, Shukla S, Chandrakuntal K, Brahmaraju M, Dandin SB, Laloraya M, Kumar PG (2007). Identification of a soluble NADPH oxidoreductase (BmNOX) with antiviral activities in the gut juice of *Bombyx mori*. Biosci Biotechnol Biochem 71(1): 200-205

Senem JV, Torquato EFB, Ribeiro LFC, Brancalhão, RMC (2016). Cytopathology of the trachea of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) to *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. *Micron* 80: 39-44

Simón O, Williams T, López-Ferber M, Caballero P (2012). Deletion of *egt* is responsible for the fast-killing phenotype of natural deletion genotypes in a *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus population. *J Invertebr Pathol* 111(3): 260–263

Singh R, Rao DR, Sharma SD, Chandrashekar K, Basavaraja HK, Kariappa BK, Dandin, SB (2006). Development of a Robust Polyvoltine Breed “NP<sub>1</sub>” of the Mulberry Silkworm, *Bombyx mori* L. *Int J Ind Entomol* 12(1): 29-34

Torquato EFB, Miranda-Neto MHM, Brancalhão RMC (2006). Nucleopolyhedrovirus infected central nervous system cells of *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae). *Neotrop Entomol* 35(1): 70–74. doi: 10.1590/S1519-566X2006000100010

Vessaro-Silva SA, Brancalhão RMC, Baggio MP, Ribeiro LFC (2014). Cells of the rectum of *Bombyx mori* affected by experimental inoculation with *Alphabaculovirus*. *Genet Mol Res* 13(3): 6885–6891

Wu K, Yang B, Huang W, Dobens L, Song H, Ling E (2016). Gut immunity in Lepidopteran insects. *Dev Comp Immunol* 64: 65-74. doi: 10.1016/j.dci.2016.02.010

Zanatta DB, Bravo JP, Barbosa JF, Munhoz REF, Fernandez MA (2009). Evaluation of economically important traits from sixteen parental strains of the silkworm *Bombyx mori* L (Lepidoptera: Bombycidae). *Neotrop Entomol* 38(3): 327-331

Zhou Y, Gao L, Shi H, Xia H, Gao L, Lian C, Liang C, Yao Q, Chen K, Liu X (2013). Microarray analysis of gene expression profile in resistant and susceptible *Bombyx mori* strains reveals resistance-related genes to nucleopolyhedrovirus. *Genom*, 101(4): 256-262



Tabela 1 Susceptibilidade da infecção pelo BmNPV nos genótipos do 5º estágio larval de *Bombyx mori*.

Genótipos	LC <sub>50</sub> of BmNPV	95% limite de confiança	gl*	$\chi^2$
BBJ	$4,81 \times 10^5$	$1,79 \times 10^5 \pm 1,02 \times 10^6$	6	11,983
AS31	$1,38 \times 10^6$	$4,94 \times 10^5 \pm 3,55 \times 10^6$	6	17,793
Hib	$1,70 \times 10^7$	$6,21 \times 10^6 \pm 8,39 \times 10^7$	6	20,092

\*Graus de Liberdade

Tabela 2 Variáveis produtivas dos três genótipos de *Bombyx mori* (BBJ, AS31 e híbrido) em relação as concentrações.

	LC			CC			TS			M		
	BBJ	AS31	Hib	BBJ	AS31	Hib	BBJ	AS31	Hib	BBJ	AS31	Hib
Controle	19,56Ba*	18,90Aa	20,64Aa	34,27Aa	30,26Ba	35,32Aa	18,28Aa	18,81Aa	17,26Aa	21,25Af	16,25Bf	1,25Cf
C1	19,46Ba	19,30Aa	20,16Aa	34,83Aa	30,91Ba	34,23Aa	16,06Aa	14,76Ab	16,67Aa	35,00Ae	27,50Be	13,75Ce
C2	19,25Ba	19,56Aa	20,26Aa	34,80Aa	30,74Ba	33,83Aa	17,30Aa	14,85Ab	15,97Aa	40,00Ae	33,75Be	12,50Ce
C3	18,88Ba	19,40Aa	20,23Aa	34,36Aa	30,21Ba	34,89Aa	13,12Bb	15,36Ab	16,09Aa	58,75Ad	26,25Bd	13,75Cd
C4	18,13Ba	18,96Aa	20,47Aa	32,09Ab	30,92Aa	33,22Ab	16,08Aa	14,59Ab	15,93Aa	52,50Ad	35,00Bd	16,25Cd
C5	18,51Bb	19,09Ab	18,36Ab	33,21Ab	30,02Ba	31,79Ab	14,92Ab	15,08Ab	14,40Aa	62,50Ac	53,75Bc	23,75Cc
C6	18,17Bb	19,22Ab	19,53Ab	32,21Ab	30,45Ba	33,00Ab	13,50Ab	15,04Ab	16,04Aa	81,25Ab	66,25Bb	53,75Cb
C7	18,14Bb	19,00Ab	18,56Ab	32,50Ab	30,40AB	31,84Ab	11,19Bc	15,46Ab	15,42Aa	91,25Aa	87,50Ba	65,00Ca
C8	18,21Ba	20,03Aa	19,32Aa	30,94Bb	30,06Ba	32,88Ab	13,99Ac	15,61Ab	14,34Aa	93,75Aa	91,25Ba	70,00Ca
Média**	18,70	19,27	19,72	33,24	30,44	33,44	14,94	15,50	15,77	59,58	48,61	30,00
		19,25			32,38			15,42			46,06	
CV (%)		4,83			3,95			11,01			19,66	

\*Valores diferem por letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas pelo teste Scott-Knott ( $P < 0.05$ ). LC = largura do casulo (mm); CC = comprimento do casulo (mm); TS = teor de seda (%); M = mortalidade (un.).

\*\* Média de cada genótipo e media da interação dos três genótipos.

Tabela 3 Valores de mortalidade relacionando concentrações e DPIs da linhagem BBJ.

	Controle	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
1°	5,50Aa	5,25Ab	5,25Ab	5,25Ab	5,25Ab	5,25Ab	5,25Ac	5,50Ab	5,75Ab
2°	5,00Aa	5,25Ab	5,25Ab	5,50Ab	5,50Ab	5,25Ab	6,00Ab	5,35Ab	5,25Ab
3°	5,85Aa	5,50Ab	5,50Ab	5,25Ab	5,25Ab	5,60Ab	5,25Ac	5,60Ab	5,60Ab
4°	5,25Aa	5,25Ab	5,25Ab	5,25Ab	5,43Ab	5,35Ab	5,25Ac	5,85Ab	5,85Ab
5°	5,35Ba	6,30Aa	5,35Bb	5,50Bb	5,25Bb	5,50Bb	6,10Ab	6,29Aa	6,31Ba
6°	5,25Ca	6,29Ba	5,96Ba	6,10Ba	6,29Ba	6,45Ba	7,17Aa	6,78Aa	7,05Aa
7°	5,60Ba	5,75Ba	6,39Ba	6,10Ba	6,39Ba	6,72Aa	6,71Aa	7,20Aa	6,24Ba
8°	5,75Aa	5,50Ab	5,93Aa	6,10Aa	6,36Aa	6,03Aa	6,53Aa	5,60Ab	6,29Aa
9°	5,25Aa	5,75Aa	5,60Ab	6,03Aa	5,85Aa	6,03Aa	5,50Ac	5,79Ab	6,60Aa
10°	5,00Ba	5,25Bb	5,85Aa	5,50Bb	5,25Bb	6,10Aa	6,04Ab	6,49Aa	6,04Aa
11°	5,00Ba	5,00Bb	5,00Bb	5,25Bb	5,50Bb	5,60Ab	5,60Ac	6,10Ab	6,10Aa
Média**					5.74				
CV%					9.57				

\* Valores diferem por letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas pelo teste Scott-Knott ( $P < 0.05$ ). Os valores foram transformados pela fórmula  $\sqrt{x} + 5$ .

\*\* Média de cada genótipo e media da interação das oito concentrações e o controle.

Tabela 4 Valores de mortalidade relacionando concentrações e DPIs da linhagem AS31.

	Controle	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
1°	5,00Aa*	5,25Ab	5,00Ab	5,00Ab	5,25Ab	5,25Ab	5,00Ad	5,25Ac	5,25Ac
2°	5,25Aa	5,00Ab	5,25Ab	5,25Ab	5,25Ab	5,25Ab	5,00Ad	5,60Ac	5,35Ac
3°	5,25Aa	5,25Ab	5,00Ab	5,25Ab	5,50Ab	5,25Ab	5,35Ad	5,25Ac	5,25Ac
4°	5,25Ba	5,00Bb	5,25Bb	5,00Bb	5,60Ab	6,03Aa	5,35Bd	5,75Ac	6,20Ab
5°	5,25Ba	5,25Bb	5,00Bb	5,35Bb	5,25Bb	5,25Bb	5,85Ac	5,96Ac	5,96Ac
6°	5,25Ba	5,70Bb	5,75Ba	5,85Ba	5,60Bb	5,50Bb	6,28Ab	6,99Aa	6,72BAb
7°	5,50Ca	6,57Ba	6,20Ba	6,41Ba	6,18Ba	6,54Ba	6,47Bb	7,18Aa	7,38Aa
8°	5,85Ca	5,60Cb	6,31Ba	5,50Cb	6,06Ca	6,20Ba	7,12Aa	6,62Bb	6,29Bb
9°	5,50Ba	5,50Bb	6,39Aa	5,75Ba	5,93Ba	6,74Aa	6,29Ab	6,29Ab	6,56Ab
10°	5,00Aa	5,00Ab	5,25Ab	5,00Ab	5,00Ab	5,25Ab	5,75Ac	5,50Ac	5,50Ac
11°	5,00Aa	5,00Ab	5,00Ab	5,00Ab	5,00Ab	5,25Ab	5,25Ad	5,25Ac	5,85Ac
Média**					5.61				
CV%					8.32				

\* Valores diferem por letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas pelo teste Scott-Knott (P<0.05). Os valores foram transformados pela fórmula  $\sqrt{x + 5}$ .

\*\* Média de cada genótipo e media da interação das oito concentrações e o controle.

Tabela 5 Valores de mortalidade relacionando concentrações e DPIs do híbrido comercial.

	Controle	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
1°	5,00Aa*	5,00Aa	5,25Aa	5,00Ab	5,00Ab	5,25Ab	5,25Ac	5,00Ac	5,00Ac
2°	5,00Aa	5,00Aa	5,00Aa	5,00Ab	5,00Ab	5,25Ab	5,00Ac	5,25Ac	5,50Ac
3°	5,00Aa	5,00Aa	5,25Aa	5,00Ab	5,25Ab	5,00Ab	5,00Ac	5,25Ac	5,00Ac
4°	5,25Ba	5,60Aa	5,00Ba	5,50Aa	5,00Bb	5,50Ab	5,75Ab	5,75Ab	5,25Bc
5°	5,00Ba	5,00Ba	5,00Ba	5,35Aa	5,00Bb	5,25Bb	5,75Ab	5,00Bc	5,60Ac
6°	5,00Ca	5,25Ca	5,25Ca	5,00Cb	5,00Cb	5,25Cb	5,75Bb	5,60Bb	6,38Ab
7°	5,00Ba	5,50Ba	5,25Ba	5,25Bb	5,25Bb	5,25Bb	6,78Aa	6,95Aa	7,28Aa
8°	5,00Da	5,50Ca	5,85Ca	5,85Ca	6,39Ba	6,39Ba	6,39Ba	7,07Aa	6,81Ab
9°	5,00Aa	5,60Aa	5,50Aa	5,50Aa	5,60Ab	5,35Ab	6,20Aa	5,60Ab	5,60Ac
10°	5,00Ba	5,00Ba	5,25Ba	5,00Bb	5,00Bb	5,50Ab	5,75Ab	6,10Ab	5,50Ac
11°	5,00Ba	5,00Ba	5,00Ba	5,00Bb	5,00Bb	5,00Bb	5,50Ab	5,50Ab	5,50Ac
Média**					5.39				
CV%					7.69				

\* Valores diferem por letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas pelo teste Scott-Knott (P<0.05). Os valores foram transformados pela fórmula  $\sqrt{x + 5}$ .

\*\* Média de cada genótipo e media da interação das oito concentrações e o controle.

## **ANEXO 01**

Normas para submissão de artigos *Micron*



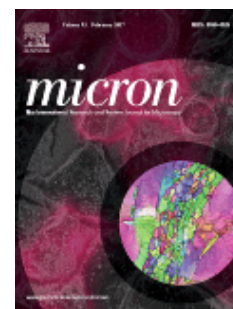
# MICRON

The International Research and Review Journal for Microscopy

## AUTHOR INFORMATION PACK

### TABLE OF CONTENTS

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.3</b>



ISSN: 0968-4328

### DESCRIPTION

*Micron* is an interdisciplinary forum for all work that involves new applications of **microscopy** or where advanced microscopy plays a central role. The journal will publish on the design, methods, application, practice or theory of microscopy and **microanalysis**, including reports on optical, electron-beam, X-ray microtomography, and scanning-probe systems. It also aims at the regular publication of review papers, short communications, as well as thematic issues on contemporary developments in microscopy and microanalysis. The journal embraces original research in which microscopy has contributed significantly to knowledge in biology, life science, nanoscience and nanotechnology, materials science and engineering.

#### Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click [here](#) for more information on our author services.

Please see our Guide for Authors for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our Support Center

### AUDIENCE

Scientists and engineers involved in the design, application, practice or theory of microscopy and microanalysis.

### IMPACT FACTOR

2015: 1.838 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Aqualine Abstracts  
 BIOSIS  
 Elsevier BIOBASE  
 Current Contents/Life Sciences  
 BIOMED  
 EMBASE  
 INSPEC  
 Research Alert  
 SCISEARCH  
 Science Citation Index  
 Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editors:*

**F. Braet**, Australian Centre for Microscopy & Microanalysis, University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia (Biological Sciences)

**R.F. Egerton**, Dept. of Physics, University of Alberta, 11322 - 89 Avenue, Edmonton, T6G 2J1, Canada (Physical Sciences)

### *Review Editors:*

**W. De Souza**, Inst. de Biofisica, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil (Biological Sciences)

**F. Hofer**, Forschungsinstitut für Elektronenmikroskopie, Technische Universität Graz, Graz, Austria (Physical Sciences)

### *Editorial Board:*

**U. Aebi**, Universität Basel, Basel, Switzerland

**H. Assender**, University of Oxford, Oxford, UK

**D. Bhella**, Medical Research Council (MRC), Glasgow, Scotland, UK

**E.J. Boekema**, Rijksuniversiteit Groningen, Groningen, Netherlands

**G. Botton**, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

**N.D. Browning**, University of California, Davis, Davis, California, USA

**J.L. Carrascosa**, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

**G. Cox**, The University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia

**P. Crozier**, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA

**Y.F. Dufrêne**, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

**A. Gregorc**, University of Maribor, Ljubljana, Slovenia

**J.R. Harris**, Johannes Gutenberg Universität Mainz, Mainz, Germany

**A. Holzenburg**, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

**B.P. Jena**, Wayne State University School of Medicine, Detroit, Michigan, USA

**A. Kirkland**, University of Oxford, Oxford, UK

**M. Lekka**, Polish Academy of Sciences, Kraków, Poland

**H. Luensdorf**, Helmholtz Zent. für Infektionsforschung Mikrobiol., Braunschweig, Germany

**Q. Luo**, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China

**S. Mithieux**, The University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia

**D.A. Muller**, Cornell University, Ithaca, New York, USA

**T. Müller-Reichert**, TU Dresden, Dresden, Germany

**J. Reyes Gasga**, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico D.F., Mexico

**D.L. Taatjes**, University of Vermont, Burlington, Vermont, USA

**M. Varela del Arco**, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

**J. Verbeeck**, Universiteit Antwerpen, Antwerpen, Belgium

**P. Verkade**, University of Bristol, Bristol, UK

**P. Xi**, Peking University, Beijing, China

**Y. Zhu**, Brookhaven National Laboratory, Upton, New York, USA

**J.M. Zuo**, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, USA



## GUIDE FOR AUTHORS

---

### ***Your Paper Your Way***

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

**To find out more, please visit the Preparation section below.**

### ***Submission checklist***

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### *Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

## **BEFORE YOU BEGIN**

### ***Ethics in publishing***

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

### ***Declaration of interest***

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. More information.

### ***Submission declaration and verification***

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

## **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

## **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

## **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

## **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### *Funding body agreements and policies*

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

## **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.

- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

#### *Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

#### *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### *Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 24 months.

#### *Elsevier Publishing Campus*

The Elsevier Publishing Campus ([www.publishingcampus.com](http://www.publishingcampus.com)) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

#### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

## **PREPARATION**

## **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that **50MB** is the **MAXIMUM POSSIBLE** file size for a **MANUSCRIPT** and individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

### *References*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### *Formatting requirements*

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

## **REVISED SUBMISSIONS**

### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### *LaTeX*

You are recommended to use the Elsevier article class elsarticle.cls to prepare your manuscript and BibTeX to generate your bibliography.

Our LaTeX site has detailed submission instructions, templates and other information.

## **Article structure**

### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

### *Results*

Results should be clear and concise.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should consist of no more than 500 words and should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### *Highlights*

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### *Acknowledgements*

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### *Math formulae*

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

## **Artwork**

### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

**information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

#### **References**

##### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

##### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

##### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

##### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

##### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

##### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their

article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/micron>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

## **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead



of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### ***Supplementary material***

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages.

## **ARTICLE ENRICHMENTS**

### ***AudioSlides***

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### ***Interactive plots***

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. Full instructions.

### ***Virtual Microscope***

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. More information and examples. Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact [virtualmicroscope@elsevier.com](mailto:virtualmicroscope@elsevier.com) for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### ***Online proof correction***

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

**Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. An offprint order form will be supplied by the Publisher for ordering any additional paid offprints.

**Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

**AUTHOR INQUIRIES**

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

## **ANEXO 02**

Normas para submissão de artigos *Neotropical Etymology*

## Neotropical Entomology Instructions for Authors

### Manuscript Submission

#### Legal Requirements

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

#### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

#### Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Upon submission, the e-mail addresses of all authors will be requested. At the end of the submission process, the corresponding author will receive an acknowledgement e-mail and all co-authors will be contacted automatically to confirm their affiliation to the submitted work.

#### Sections

Submissions to the following sections will be taken into consideration:

‘Forum’, ‘Ecology, Behavior and Bionomics’, ‘Systematics, Morphology and Physiology’, ‘Biological Control’, ‘Pest Management’, ‘Public Health’, ‘Scientific Notes’.

#### English Language Editing

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to ask a native speaker to help you or arrange for your manuscript to be checked by a professional language editor prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

Edanz Editing Global: <http://www.edanzediting.com/springer>

Edanz will charge authors directly for these language polishing services.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

#### Title Page

The title page should include:

- The section to which your article belongs to.
- A concise and informative title.
- The name(s) of the author(s) – left-justified below the title; only initials of the first and middle names of authors are provided followed by their last names in full. Names of different authors are separated by a comma. Do not use “and” or “&” to separate different authors.
- The affiliation(s) of the author(s).

- The complete name, the regular and e-mail addresses, telephone and fax numbers of the corresponding author only.
- A running title no longer than 65 characters.

### Abstract

Please provide a one-paragraph long abstract of up to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

## Text

### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Set page as A4 size and margins at 1 inch.
- Use a normal, plain font (e.g., 12-point Times Roman) for text.
- Lines must be double spaced.
- The name of insect and mite species must be written in full and followed by the species author when first mentioned in the Title, Abstract and Main Text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.
- Save your file in doc format. Do not submit docx files.

### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings. Headings in bold, sub-headings of the second level in roman, and level 3 sub-headings in italic font type.

### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### Scientific Names

Write scientific names in full, followed by the author's name (for insect and mite species), whenever they first appear in the Abstract and Main text. Names should also be listed in full at the beginning of a paragraph or sentence. E.g., *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Use the abbreviated generic name (e.g., *S. Frugiperda*) in the rest of the paper, except in tables and figures, where the name should be in full.

### Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

## References

### Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. References to more than one publication are chronologically ordered, separated by commas. Use '&' for two authors and italicized '*et al*' for more than two authors. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Panizzi 1990).

This result was later contradicted by Parra & Zucchi (2006).

This effect has been widely studied (Vilela 1991, Moscardi *et al* 1995, Frey da Silva & Grazia 2006, Moscardi *et al* 2009).

### Reference List

Type references in alphabetical order, one per paragraph, with no space between them. The authors' last names are typed in full, followed by capital initials. Use a comma to separate the names of authors. Add the reference year after the authors' names, between parentheses. Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see [www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php). Please avoid citations of dissertations, theses and extension materials. Do not cite restricted-circulation materials (such as institutional documentation and research reports), partial research reports or abstracts of papers presented at scientific meetings.

- Journal article

Warner KD (2012) Fighting pathophobia: how to construct constructive public engagement with biocontrol for nature without augmenting public fears. *BioControl* 57:307–317

- Article by DOI

Grosman AH, Janssen A, Brito EF, Cordeiro EG, Colares F, Fonseca JO, Lima ER, Pallini A, Sabelis MW (2008) Parasitoid increases survival of its pupae by inducing hosts to fight predators. *PLoS ONE* 3(6):e2276. doi:10.1371/journal.pone.0002276

- Book

Carey JR (1993) *Applied demography for biologists with special emphasis on insects*. Oxford University Press, New York, p 206

- Book chapter

Datnoff LE, Seebold KW, Correa FJ (2001) The use of silicon for integrated disease management reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. In: Datnoff LE, Snyder GH, Korndorfer GH (eds) *Silicon in agriculture*. Elsevier Science, Amsterdam, pp 209–219

- Online document

Monteiro RC, Lima EFB (2011) Thysanoptera of Brazil. <http://www.lea.esalq.usp.br/thysanoptera/> Accessed 25 Nov 2011

- Dissertation

Nihei SS (2004) *Sistemática e biogeografia de Muscini (Diptera, Muscidae)*. PhD. Thesis, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, p 203

## Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## Artwork

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

### Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics (line art), the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts (Calibri type) embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

### Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

### Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

### Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### Figure Lettering

To add lettering, please use Calibri font only.

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

### Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, **not in the figure file**.

Figure captions begin with the term Fig followed by a space and the figure number, both in roman type (e.g., Fig 1). No punctuation is to be included after the number.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

Figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that:

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

### Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

### Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

### Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

### Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

### Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.



If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

### Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

### Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

### Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM\_3.mpg", "ESM\_4.pdf".

### Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

### Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that:

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material.
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk).

### After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

### Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

### Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

### Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

### Color Illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

### Proof Reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, no further changes can be made to the article. Scientific errors can be corrected by means of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

### Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.



<http://www.springer.com/journal/13744>

Neotropical Entomology

Editor-in-Chief: Fontes, E.

ISSN: 15 19-5 66X (print version)

ISSN: 1678-8052 (electronic version)

Journal no. 13744