

HISTOFISIOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR E HEMÓCITOS DE *Spodoptera frugiperda*
(J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TRATADAS COM NIM (*Azadirachta indica* A.

JUSS)

por

ALICELY ARAÚJO CORREIA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira)

RESUMO

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal praga da cultura do milho. Seu controle demanda elevado número de aplicações de inseticidas sintéticos, podendo ocasionar seleção de populações resistentes e contaminação ambiental. Uma alternativa promissora para o controle deste inseto é a utilização de substâncias com ação inseticida oriundas de plantas como o nim, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). Contudo, os aspectos relacionados às reações imunológicas e histofisiológicas de lagartas de *S. frugiperda*, promovidos pela interação com o nim, ainda são pouco estudados. Assim, a presente pesquisa teve como objetivos: (a) caracterizar e realizar a contagem diferencial dos hemócitos de lagartas de *S. frugiperda*, antes e após o tratamento com nim (Neemseto[®]) nas concentrações 0,5 e 1,0%, nos intervalos de 48, 96, 144, 192 e 240h; (b) descrever, histologicamente, o canal alimentar dessas lagartas; (c) caracterizar o efeito das concentrações 0,5 e 1,0% do nim, nos mesmos intervalos de avaliação após tratamento, sobre a histofisiologia do mesêntero; (d) quantificar as células regenerativas e; (e) analisar, histoquimicamente, o produto de secreção do mesêntero. Na hemolinfa das lagartas de *S. frugiperda* foram identificados seis tipos de hemócitos: Adipohemócitos, Esferulócitos, Granulócitos, Oenocitóides, Plasmatócitos e Prohemócitos, sendo

os Granulócitos e Plasmatócitos mais freqüentes. A contagem diferencial dos hemócitos revelou um efeito concentração-dependente do nim, afetando a dinâmica hemocitária e possivelmente os eventos endócrinos, contribuindo para a mortalidade e anormalidades morfológicas observadas. Apesar da mortalidade e dos efeitos ocorrerem de forma mais expressiva no tratamento com nim a 1,0%, ambas as concentrações (0,5 e 1,0%) alteraram a imunidade celular das lagartas. Foram observadas alterações histofisiológicas que variaram de intensidade de acordo com o tempo e as concentrações, tais como: degeneração do epitélio e da musculatura do mesêntero, redução de células regenerativas e da atividade secretora desta região, nas duas concentrações do nim. Porém, estas alterações foram observadas nas lagartas tratadas com nim a 1,0% já a partir de 96h após o tratamento. Esses resultados demonstram a atividade inseticida da formulação comercial de nim (Neemseto[®]) em ambas as concentrações testadas, na histofisiologia do mesêntero e nas reações imunológicas de lagartas de *S. frugiperda*.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta-do-cartucho, nim indiano, resposta imunológica, fisiologia, histoquímica, mesêntero

HISTOPHYSIOLOGY OF THE FOOD CHANNEL AND HEMOCYTES OF *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TREATED WITH NEEM
(*Azadirachta indica* A. JUSS)

by

ALICELY ARAÚJO CORREIA

(Under the direction of Valéria Wanderley Teixeira)

ABSTRACT

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) is the main pest of corn crops. The control of *S. frugiperda* requires various insecticide applications that might result on selection of resistant populations and environmental contamination. A promising alternative toward the control of this pest is the use of vegetal insecticides such as neem, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). Few data exist related to the immunologic and histophysiologic reactions of *S. frugiperda* larvae under neem treatment. Thus, the present research had as objectives: (a) to characterize and to quantify the hemocytes of *S. frugiperda* larvae pre- and post-treatment with concentrations 0.5 and 1.0% of neem (Neemseto[®]) on the intervals of 48, 96, 144, 192 and 240h; (b) to describe, histologically, the food channel of the larvae; (c) to characterize the effect of the concentrations 0.5 and 1.0% of neem, in the same evaluation intervals after treatment, on the histophysiology of midgut; (d) to quantify the regenerative cells and; (e) to analyze, histochemically, the secretion product of midgut. Six types of hemocytes were identified in the hemolymph of *S. frugiperda* larvae: Adipohemocytes, Spherulocytes, Granulocytes, Eonocytoids, Plasmacytes and Prohemocytes. And, the most abundant hemocytes were Granulocytes and Plasmacytes. The counting of hemocytes showed effects as function of neem concentrations on

the hemocytary dynamics and possivelmente the endocrine events, contributing for mortality and observed morphologic abnormalities. Despite of expressive larval mortality and of effects with neem at concentration 1.0%, both concentrations (0.5 and 1.0%) modified the cellular immunity of the larvae. Histophysiological alterations occurred as function of tested neem concentrations and time after treatment observed as: degeneration of the epithelium and musculature of the midgut, reduction of regenerative cells and the secretory activity of this region, in the two concentrations of neem. These alterations, however, were observed for larvae treated with neem at concentration 1.0% already from 96h after treatment. These results demonstrate the insecticide activity of the commercial formulation neem (Neemseto[®]) in both tested concentrations, on the histophysiology of midgut and on the immunologic reactions of *S. frugiperda* larvae.

KEY WORDS: Fall armyworm, neem indian, immunological response, physiology, histochemical, midgut

HISTOFISIOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR E HEMÓCITOS DE *Spodoptera frugiperda*
(J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TRATADAS COM NIM (*Azadirachta indica* A.
JUSS)

por

ALICELY ARAÚJO CORREIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da
Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2008

HISTOFISIOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR E HEMÓCITOS DE *Spodoptera frugiperda*
(J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TRATADAS COM NIM (*Azadirachta indica* A.
JUSS)

por

ALICELY ARAÚJO CORREIA

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

José Vargas de Oliveira - UFRPE

RECIFE - PE

Fevereiro – 2008

HISTOFISIOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR E HEMÓCITOS DE *Spodoptera frugiperda*
(J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TRATADAS COM NIM (*Azadirachta indica* A.
JUSS)

por

ALICELY ARAÚJO CORREIA

Orientadora: _____
Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Examinadores: _____
Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

José Vargas de Oliveira – UFRPE

Jorge Braz Torres – UFRPE

A Deus,

Aos meus pais, Aluízio e Cely,

Aos meus irmãos, Olga, Júnior e Hélio Lúcio,

Ao meu esposo, Josenilton,

Aos meus sobrinhos, Alann e Rayssa,

Que nesta ordem entraram em minha

Vida dando-lhe sentido e razão

OFEREÇO

Ao meu amado esposo, Josenilton

Meu alicerce, por quem tenho grande

Respeito, amor e carinho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso Pai Eterno, pela graça e misericórdia infinita. “Sou o que sou pela graça de Deus.” (I Coríntios 15:10);

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade dada à minha formação profissional, ajudando-me a trilhar novas etapas na vida acadêmica;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo que tornou viável a realização deste trabalho;

À minha orientadora, Prof^a. Valéria Wanderley Teixeira, pelo acolhimento em seu laboratório e, principalmente, por sua amizade. Sou-lhe grata pela enorme contribuição para meu crescimento acadêmico-científico e humano. Obrigada Professora amiga;

Ao meu co-orientador, Prof. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, pela amizade, sugestões e críticas que muito contribuíram para a elaboração deste trabalho. Sempre paciente e simples;

Ao meu co-orientador Prof. José Vargas de Oliveira, pela inestimável amizade, respeito, carinho e simpatia que sempre teve com todos nós. E também, por toda dedicação e ajuda na realização deste trabalho;

Ao Prof. Jorge Braz Torres, pela amizade, dedicação e paciência com todos. Obrigada pela disponibilidade e inestimável colaboração nas análises estatísticas, e também pelas sugestões e correções na realização deste trabalho;

A todos os demais Professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola da UFRPE, que me ajudaram no cumprimento de mais uma etapa profissional da minha vida;

Meu agradecimento especial ao meu esposo Josenilton Oliveira da Cunha, que sempre me ajudou a tomar decisões e, mais que isso, me apoiou e incentivou. Teve muita paciência (às vezes nem tanta) e entendeu (ou pelo menos tentou entender) o por quê de tantas horas no laboratório. Valeu amor;

Aos meus pais queridos, Aluizio José Felix Correia e Cely Araújo Correia, por todo incentivo e apoio durante toda minha vida. As lições de vida que aprendi na família foram mais que suficientes. Amo muito vocês. Obrigada;

Aos meus irmãos, Olga Araújo Correia, Aluizio Araújo Correia e Hélio Lúcio Martins Ribeiro de Araújo, pelas amizades e apoio;

Aos meus queridos sobrinhos, Alann Wagner Correia de Paula e Rayssa Laine Leite de Araújo, verdadeiras bênçãos de Deus;

Aos meus amigos do Núcleo de Oração, obrigado por estarem sempre orando e vigiando por mim ao Senhor, realmente todas as dificuldades superadas e bênçãos recebidas foram de acordo com a vontade de Deus e também com a ajuda de vocês. Amo todos;

A minha turma do mestrado, pela amizade e companheirismo. Entre altos e baixos, estamos atingindo nossos objetivos;

Aos amigos do Laboratório de Entomologia Agrícola, não vou citar nomes, pois todos têm um significado especial na minha vida. Muito obrigado pelo ambiente descontraído e agradável para trabalhar. Realmente as brincadeiras, piadas, festas, rodízios e bolos (Ah! Os bolos) tornam o ambiente científico mais produtivo. Abraços especiais;

A todos que fazem parte do Laboratório de Histologia, pelos momentos inesquecíveis, amizades e ajuda;

A todos os amigos e colegas que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

| | Páginas |
|---|---------|
| AGRADECIMENTOS | ix |
| CAPÍTULOS | |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 01 |
| LITERATURA CITADA..... | 05 |
| 2 DINÂMICA HEMOCITÁRIA EM LAGARTAS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TRATADAS COM NIM (<i>Azadirachta indica</i> A. JUSS)..... | 9 |
| RESUMO..... | 10 |
| ABSTRACT..... | 11 |
| INTRODUÇÃO..... | 12 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 14 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 16 |
| AGRADECIMENTOS..... | 19 |
| LITERATURA CITADA..... | 19 |
| 3 HISTOFISIOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR DE LAGARTAS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TRATADAS COM NIM (<i>Azadirachta indica</i> A. JUSS)..... | 27 |
| RESUMO..... | 28 |
| ABSTRACT..... | 29 |
| INTRODUÇÃO..... | 30 |

| | |
|-----------------------------|----|
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 31 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 33 |
| AGRADECIMENTOS..... | 37 |
| LITERATURA CITADA..... | 38 |

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), também conhecida como lagarta militar e lagarta do milharal apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a região central dos EUA até a Argentina e em algumas ilhas a oeste da Índia. No Brasil, ocorre durante todo o ano, em diversas regiões produtoras, destacando-se como praga-chave do milho (*Zea mays* L., Gramineae) e praga de outras culturas devido à disponibilidade e diversidade de plantas hospedeiras, tais como algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L., Malvaceae); arroz (*Oryza sativa* L., Poaceae); sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench, Poaceae); amendoim (*Arachis hypogaea* L., Fabaceae); pastagens, dentre outras (Cruz 1995, Schmidt 2002).

Na cultura do milho, as lagartas danificam, preferencialmente, o cartucho das plantas, consumindo grande parte da área foliar antes da abertura das folhas. No entanto, nos estágios mais avançados da planta pode, também, danificar o pendão e a espiga. Com o aumento do cultivo do milho “safrinha” e o plantio com irrigação via pivô central, essa praga tem apresentado mudança no seu comportamento, podendo atacar o colmo de plantas recém emergidas, provocando o “coração morto”, ou cortar plantas rente ao solo ocasionando injúria semelhante à lagarta rosca, *Agrotis ipsilon* (Huffnagel) (Cruz 1995). Conforme Cruz & Turpin (1982), as perdas variam de acordo com a infestação e com o estágio fenológico do milho, pois quando o mesmo apresenta oito a dez folhas, a redução na produtividade pode ser de 18,7%.

Em estudos sobre a biologia de populações de *S. frugiperda* coletadas na cultura do milho em Santa Rosa e Pelotas, RS, mantidas em laboratório a 25±1 °C, UR 70±15 % e fotofase de 14 h, em dieta artificial, Giolo *et al.* (2002) obtiveram os seguintes resultados: período de

desenvolvimento embrionário de dois dias; duração da fase larval de 16,45 e 14,10 dias; duração da fase pupal de 10,65 e 12,72 e ciclo total de 31,94 e 31,56 dias, respectivamente.

Busato *et al.* (2004) estudaram o consumo e utilização de alimento por lagartas de *S. frugiperda* criadas individualmente em dieta artificial, mantidas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa de $70\pm 15\%$ e fotofase 14 h. Esses autores observaram que, em laboratório, na temperatura de 28°C as lagartas obtiveram uma maior eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido, e custo metabólico, conseqüentemente consumiram uma menor quantidade de alimento, reduzindo a duração da fase larval.

O controle de *S. frugiperda* é realizado, geralmente, com inseticidas químicos sintéticos que, apesar de serem eficientes, podem acarretar diversos problemas, como a presença de resíduos nos alimentos acima dos limites permitidos por lei, ressurgência de pragas, surtos de pragas secundárias, intoxicações aos aplicadores e seleção de populações de pragas resistentes, entre outros efeitos diretos e indiretos. A busca por métodos alternativos de controle inclui a utilização de produtos naturais, que geralmente são menos prejudiciais ao ambiente, dentre os quais destacam-se os inseticidas de origem vegetal (Roel *et al.* 2000).

Pesquisas envolvendo plantas com atividade inseticida evoluíram bastante nas últimas décadas, em diversos países. Plantas da família Meliaceae têm sido as mais investigadas, destacando-se o nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss), por sua atividade inseticida, acaricida, fungicida e nematocida (Roel 2001). O nim é originário da Ásia, natural de Burma e das regiões áridas do subcontinente indiano (Martinez 2002, Neves *et al.* 2003). O nim e seus derivados afetam mais de 400 espécies de insetos pertencentes às ordens Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Thysanoptera e Neuroptera. O interesse por essa espécie deve-se à presença de um limonóide denominado azadiractina, presente nas folhas, frutos e sementes, cuja atividade sobre alguns insetos é comparável à dos melhores inseticidas sintéticos

encontrados no mercado (Schmutterer 1990, Roel 2001). Tanto o óleo, como os extratos ou o pó de suas sementes, folhas e ramos têm sido avaliados no controle da lagarta-do-cartucho e outras pragas do milho [Mordue (Luntz) & Blackwell 1993, Martinez 2002, Boeke *et al.* 2004]. Segundo Mordue (Luntz) & Nisbet (2000), os principais entraves no emprego do nim são a baixa disponibilidade de sementes e o custo elevado dos produtos derivados. Portanto, a viabilização do uso de folhas no preparo de extratos pode ser uma alternativa a outras partes da planta.

O nim exerce vários efeitos sobre os insetos, como a inibição alimentar, inibição da síntese do ecdisona, inibição da biossíntese da quitina, deformações em pupas e adultos, redução da fecundidade e longevidade de adultos, alterações na capacidade de atração de feromônios, esterilização, inibição de oviposição, redução da transmissão de vírus, mortalidade e repelência [Mordue (Luntz) & Blackwell 1993, Roel 2001, Martinez 2002].

Segundo Schmutterer (1990), insetos da ordem Lepidoptera são os mais sensíveis às substâncias derivadas do nim. Esse efeito tem sido particularmente demonstrado em condições de laboratório para várias espécies (Simmonds 2000). Blaney *et al.* (1990) relataram que 1ppm de azadiractina reduziu a alimentação de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) em dieta artificial. Os efeitos dos produtos derivados do pó e do óleo de sementes de nim (10mg i.a. L⁻¹) foram demonstrados por Viñuela *et al.* (2000) para lagartas de *Spodoptera exigua* (Hübner), que após se alimentarem de folhas tratadas apresentaram parada na alimentação, alongamento do período de ecdise, mortalidade larval e pupal e esterilização de adultos.

A habilidade de reconhecer a presença de um organismo ou de uma substância estranha é fundamental para o sistema imunológico de qualquer indivíduo (Negreiro *et al.* 2004). Assim, os insetos possuem um complexo e eficiente sistema imunológico inato composto por barreiras estruturais e por respostas ativas, contra elementos estranhos (Snodgrass 1993, Chapman 1998). Compreendem-se como barreiras estruturais o rígido exoesqueleto, o sistema digestivo e as

barreiras respiratórias, que constituem a primeira linha de defesa dos insetos (Bulet *et al.* 1999, Lavine & Strand 2002).

Quando os agentes invasores conseguem ultrapassar o tegumento e o trato digestivo, tornam-se expostos a uma variedade de mecanismos celulares e humorais interagindo na defesa do hospedeiro. Esse resultado cooperativo entre o plasma e hemócitos da hemolinfa, que constituem a barreira final do sistema de defesa dos insetos, atuam na coagulação, cicatrização, fagocitose, encapsulação, nodulação e citotoxicidade (Bulet *et al.* 1999, Russo *et al.* 2001, Lavine & Strand 2002).

Os hemócitos são células que circulam livremente pela hemolinfa dos insetos, podendo se arranjar em agregados denominados órgãos hematopoiéticos ou fagocíticos de diferentes complexidades (Jones 1970). São células versáteis e seu número e tipo são espécie específico e variam com a idade da espécie de inseto (Gupta 1979, Götz & Boman 1985). A classificação dessas células baseia-se nas diferenças morfológicas entre as mesmas no que diz respeito à aparência geral e características nucleares e citoplasmáticas (Barduco *et al.* 1988, Kurihara *et al.* 1992). Uma revisão feita por Gupta (1985) tentou homogeneizar a nomenclatura que era bastante heterogênea até a época. Disso resultou a caracterização de sete tipos principais de hemócitos: prohemócitos (PRs), plasmatócitos (PLs), granulócitos (GRs), esferulócitos (Es), adipohemócitos (ADs), oenocitóides (OEs) e coagulócitos (COs).

Apesar do nim possuir alto desempenho como inseticida, sendo capaz de exercer diversos efeitos sobre a morfologia externa e alguns parâmetros biológicos dos insetos (Roel 2001), não foram encontradas, na literatura consultada, informações sobre os efeitos do nim na histofisiologia dos órgãos de *S. frugiperda*. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da formulação comercial de nim (Neemseto[®]), sobre a histofisiologia do canal alimentar e

hemócitos de *S. frugiperda*, visando detectar em qual concentração ocorrem mínimas alterações histológicas e imunológicas que possam ser determinantes para o seu controle.

Literatura Citada

- Barduco, M.C., E.A. Gregório & L.A. Toledo. 1988.** Hemócitos de *Diatrea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) no período larval, estudo morfológico e quantitativo. Rev. Bras. Biol. 48: 925-932.
- Blaney, W.M., M.S.J. Simmonds, W.V. Ley, J.C. Anderson & P.L. Toogood. 1990.** Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopterous larvae. Entomol. Exp. Appl. 55: 149-160.
- Boeke, S.J., M.G. Boersma, G.M. Alink, J.J.A. van Loon, A. van Huis, M. Dicke & I.M.C.M. Rietjens. 2004.** Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. J. Ethnopharmacol. 94: 25-41.
- Bulet, P., C. Hetru, J. Dimarcq & D. Hoffmann. 1999.** Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev. Comp. Immun. 23: 329-344.
- Busato, G.R., A.D. Grützmacher, M.S. Garcia, F.P. Giolo & S.D. Nörnberg. 2004.** Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas temperaturas. Cienc. Agrotecnol. 28: 1278-1283.
- Chapman, R.F. 1998.** The insects: structure and function. 4. ed. Cambridge, Cambridge University Press, 770p.
- Cruz, I. 1995.** A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 45p. (Circular Técnica, no. 21).
- Cruz, I, & F.T. Turpin. 1982.** Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura de milho. Pesqu. Agropecu. Bras. 17: 355-360.

- Giolo, F.P., A.D. Grützmacher, M.S. Garcia & G.R. Busato. 2002.** Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. Rev. Bras. Agrocienc. 8: 219-224.
- Götz, P. & H.G. Boman. 1985.** Insect immunity, p. 454-485. In G.A. Kertut & L.I. Gilbert. (eds.), Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Oxford, Pergamon Press, 711p.
- Gupta, A.P. 1979.** Insect hemocytes: development, forms, functions, and techniques. Cambridge, Cambridge University Press, 614p.
- Gupta, A.P. 1985.** Cellular elements in the hemolymph, p. 402-444. In G.A. Kertut & L.I. Gilbert (eds.), Comprehensive insects physiology, biochemistry and pharmacology. Oxford, Pergamon Press, 711p.
- Jones, J.C. 1970.** Hemocytopenesis in insects, p. 7-65. In A.S. Gordon (ed.), Regulation of hematopoiesis. New York, Appleton Press, 1650p.
- Kurihara, Y., T. Shimazu, & H. Wago. 1992.** Classification of hemocytes in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) I. Phase microscopic study. Appl. Entomol. Zool. 27: 225-235.
- Lavine, M. D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 32: 1295-1309.
- Martinez, S.S. 2002.** O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina, Instituto Agrônômico do Paraná, 142p.
- Mordue (Luntz), A.J. & A. Blackwell. 1993.** Azadirachtin: an update. J. Insect Physiol. 39: 903-924.
- Mordue (Luntz), A.J. & A. Nisbet. 2000.** Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its actions against insects. An. Soc. Entomol. Bras. 29: 615-632.

- Negreiro, M.C.C., F.G. Andrade & A.M.F. Falleiros. 2004.** Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. *Semina: Cienc. Agr.* 25: 293-308.
- Neves, B.P., I.P. Oliveira & J.C.M. Nogueira. 2003.** Cultivo e utilização do nim indiano. Goiânia, Embrapa Arroz e Feijão, 12p. (Circular Técnica, no. 62).
- Roel, A.R. 2001.** Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. *Rev. Int. Desenv. Local* 1: 43-50.
- Roel, A.R., J.D. Vendramim, R.T.S. Frighetto & N. Frighetto. 2000.** Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. *Bragantia* 59: 53-58.
- Russo, J., M. Brehélin & Y. Carton. 2001.** Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina bouvardi*. *J. Insect Physiol.* 47: 167-172.
- Schmidt, F.B. 2002.** Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron na cultura do milho. Piracicaba, Dissertação de Mestrado. ESALQ/USP, 63p.
- Schmutterer, H. 1990.** Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 271-297.
- Simmonds, M.S.J. 2000.** Molecular-and chemo-systematics: do they have a role in agrochemical discovery? *Crop Prot.* 19: 591-596.
- Snodgrass, R.E. 1993.** Principles of insect morphology. New York, Cornell University Press, 667p.
- Viñuela, E., A. Adán, G. Smaghe, M. González, M.P. Medina, F. Budia, H. Vogt & P. Estal. 2000.** Laboratory effects of ingestion of azadirachtin by two pests (*Ceratitis capitata* and

Spodoptera exigua) and three natural enemies (*Chrysoperla carnea*, *Opius concolor* and *Podisus maculiventris*). *Biocontrol Sci. Technol.* 10: 165-177.

CAPÍTULO 2

DINÂMICA HEMOCITÁRIA EM LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TRATADAS COM NIM (*Azadirachta indica* A. JUSS)

ALICELY A. CORREIA¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA², ÁLVARO A.C. TEIXEIRA² E JOSÉ V.
OLIVEIRA¹

¹Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.
Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos , 52171-900, Recife, PE.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos , 52171-900, Recife, PE.

¹Correia, A. A., V. Wanderley-Teixeira, A. A. C. Teixeira & J. V. Oliveira. Dinâmica hemocitária em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas.

RESUMO - O conhecimento dos mecanismos imunes dos insetos é de grande importância, pois alterações causadas nesses mecanismos podem auxiliar no desenvolvimento do controle de insetos-praga. Assim, neste estudo foram analisadas amostras de hemolinfa de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), visando à caracterização e contagem diferencial dos hemócitos, antes e após o tratamento por ingestão com a formulação Neemseto® à base de nim, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae), a fim de detectar em qual concentração ocorrem mínimas alterações imunológicas que possam ser determinantes para o seu controle. A hemolinfa de lagartas de *S. frugiperda* não tratadas e tratadas com nim a 0,5 e 1,0% foi coletada nos intervalos de 48, 96, 144, 192 e 240h após o tratamento e os esfregaços analisados em microscópio de luz. A análise revelou a presença de seis tipos de hemócitos na hemolinfa das lagartas: Adipohemócitos (ADs), Esferulócitos (Es), Granulócitos (GRs), Oenocitóides (OEs), Plasmatócitos (PLs) e Prohemócitos (PRs). As células mais frequentes foram granulócitos e plasmatócitos, respectivamente, para os tratamentos nos intervalos de avaliação. A contagem diferencial dos hemócitos de lagartas de *S. frugiperda* sob influência do nim revelou um efeito dependente da concentração sobre a dinâmica hemocitária. Contudo, apesar da mortalidade e dos efeitos ocorrerem de forma mais expressiva no tratamento com nim a 1,0%, ambas as concentrações estudadas alteraram a imunidade celular das lagartas.

PALAVRAS-CHAVE: Resposta imunológica, lagarta-do-cartucho, milho, morfologia, hemolinfa

HEMOCYTARY DYNAMICS OF *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) LARVAE TREATED WITH NEEM (*Azadirachta indica* A. JUSS)

ABSTRACT - The knowledge of the immune mechanisms of the insects is of great importance because alterations caused in these mechanisms can assist in the insect-pests control development. Thus, the present study analyzed the hemolymph of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae aiming to characterize and to quantify the hemocytes at pre- and post-treatment with the Neemseto[®] formulation (*Azadirachta indica* A. Juss), in order to detect in which concentration minimum immunological alterations occur that can be determinative for its control. Samples of hemolymph of untreated and treated larvae with neem at 0.5 and 1.0% concentrations were collected in the intervals of 48, 96, 144, 192 and 240h post-treatment and the smear analyzed in light microscopy. The analysis showed six types of hemocytes in the larvae of *S. frugiperda* hemolymph: Adipohemocytes (ADs), Spherulocytes (Es), Granulocytes (GRs), Eonocytoids (OEs), Plamatocytes (PLs) and Prohemocytes (PRs). And, Granulocytes and Plasmacytes were the most abundant throughout the sampling intervals, respectively. The hemocytes counting in the hemolymph of *S. frugiperda* larvae characterized neem effects on hemocytary dynamics dependent of the concentrations. Despite of mortality and great effects detected with use of neem at 1.0%, both studied concentrations induced alterations on cellular immunity of the larvae.

KEY WORDS: Immunological response, fall armyworm, corn, morphology, hemolymph

Introdução

A Classe Insecta é a mais numerosa em espécies dentro do reino animal. A extrema proliferação e a diversidade dos insetos, entre outros fatores, pode estar relacionado ao sistema imunológico inato, que representa uma defesa contra partículas e organismos estranhos, sendo composto por barreiras estruturais e fisiológicas (Bulet *et al.* 1999, Lavine & Strand 2002). As barreiras estruturais de natureza física dos insetos são: a cutícula (exoesqueleto), o canal alimentar e o sistema respiratório, que são bastante eficientes (Bulet *et al.* 1999). Quando essas barreiras estruturais e fisiológicas são rompidas, os agentes estranhos atingem a hemocele desencadeando complexos e interconectados mecanismos humorais e celulares. A resposta humoral consiste da síntese de uma grande variedade de peptídeos antimicrobianos, principalmente pelos corpos gordurosos e cascatas proteolíticas que, sob ativação conduzem à coagulação da hemolinfa ou melanização, bem como reações intermediárias de oxigênio e nitrogênio (Hoffmann 1995, Leclerc & Reichhart 2004). Por outro lado, as defesas celulares referem-se a respostas imunes como fagocitose, nodulação, encapsulação e citotoxicidade, mediadas por hemócitos, células livres circulantes na hemolinfa (Silva 2002, Schmid-Hempel 2005).

O sucesso das respostas de defesa depende do número e dos tipos de hemócitos envolvidos nesses mecanismos (Russo *et al.* 2001). Contudo, a relativa abundância, a variabilidade de tipos e a atividade funcional dos hemócitos circulantes são conhecidas por variar dentro e entre os estágios de vida de uma espécie de inseto, bem como entre espécies próximas relacionadas (Negreiro *et al.* 2006). A acurada classificação é um importante pré-requisito para o estudo dos hemócitos (Ling *et al.* 2003).

A origem e a classificação dos hemócitos são bastante discrepantes entre os autores devido à diversidade de formas e funções nas diferentes espécies estudadas e dos vários métodos empregados para sua observação e preservação, o que levou a uma codificação polinomial destas

células (Negreiro *et al.* 2006). Segundo uma revisão mais recente feita por Lavine & Strand (2002), os tipos mais comuns de hemócitos registrados na literatura para os insetos são denominados Prohemócitos (PRs), Plasmatócitos (PLs), Granulócitos (GRs) e Esferulócitos (Es).

O conhecimento dos mecanismos imunes dos insetos apresenta uma importância muito grande, pois os distúrbios causados nesses como alterações na contagem total e diferencial dos hemócitos, em insetos parasitados ou infectados, podem ser utilizados no auxílio para o controle de insetos vetores e pragas, uma vez que se caracteriza como a primeira indicação de uma reação de defesa (Brunham *et al.* 1993).

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal praga do milho (*Zea mays* L., Gramineae) no Brasil e, nos últimos anos, vem aumentando a sua importância em várias áreas cultivadas, incluindo outras culturas, como o algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L., Malvaceae); arroz (*Oryza sativa* L., Poaceae); sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench, Poaceae) e amendoim (*Arachis hypogaea* L., Fabaceae) (Cruz 1995, Carneiro *et al.* 2004). Devido a diversos efeitos colaterais decorrentes do uso de inseticidas sintéticos, novas alternativas de controle têm sido pesquisadas, como a utilização de plantas com atividade inseticida (Sharma *et al.* 2003, Carneiro *et al.* 2004).

Extratos, pós e óleos de plantas como o nim, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) têm sido investigados em relação a sua bioatividade sobre várias espécies de insetos. Os resultados demonstram deterrência alimentar, inibição da síntese do ecdisona, redução no crescimento, deformações em pupas e adultos, redução da fecundidade e longevidade de adultos, alterações na capacidade de atração de feromônios, esterilização e inibição de oviposição, diminuição da transmissão de vírus, repelência e mortalidade (Roel 2001). Entretanto, os efeitos patológicos dos inseticidas de origem vegetal sobre hemócitos de insetos são bastante escassos (Sharma *et al.* 2003). Assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar e quantificar os hemócitos de

lagartas de *S. frugiperda* antes e após o tratamento com a formulação Neemseto[®] à base de nim, visando detectar em qual concentração ocorrem mínimas alterações imunológicas que possam ser determinantes para o seu controle.

Material e Métodos

Obtenção dos insetos. Foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda* obtidas da criação estoque do Laboratório de Entomologia Agrícola do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), mantidas à temperatura de $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12h, e alimentadas com folhas de milho.

Instalação dos Bioensaios. Folhas de milho híbrido duplo AG 1051 semeado em casa-de-vegetação, contendo duas plantas/vaso de 5L com solo + húmus de minhoca (proporção 2:1) + 12,13g de N-P-K (formulação 4-14-8) foram empregadas na alimentação das lagartas. Eventualmente, foram semeadas plantas no campo experimental do Departamento de Agronomia da UFRPE. Pedacos de folhas de milho (6,0 x 4,5cm) com 20 a 40 dias de idade foram imersos na calda do produto formulado de nim [Neemseto[®] – 0,5 (5mL/L) e 1,0% (10mL/L)], e em água destilada (testemunha), por aproximadamente cinco segundos, e postos para secar durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram oferecidos como alimento às lagartas de *S. frugiperda* do oitavo dia de idade (3^o instar), em placas de Petri de 10cm de diâmetro forradas com papel de filtro umedecido com água destilada, durante 48 horas. Após este período, as folhas foram substituídas, diariamente, por novas folhas não tratadas, até as lagartas atingirem a fase de pupa. Cada tratamento constou de 100 lagartas individualizadas em placas de Petri, das quais foram retiradas 20 lagartas para avaliação da sobrevivência e pupação. As lagartas restantes foram utilizadas para coleta da hemolinfa.

Coleta da hemolinfa para análise morfológica dos hemócitos. Amostras de 5 μ L de hemolinfa foram coletadas de 10 lagartas por tratamento, nos intervalos de 48, 96, 144, 192 e 240h. Cada lagarta correspondeu a uma repetição, sendo utilizadas 10 repetições/intervalo de tempo/tratamento. A coleta de 5 μ L de hemolinfa foi feita através de uma incisão na região mesopleural da lagarta e com o auxílio de uma micropipeta. Em seguida, o material coletado foi colocado sobre uma lâmina microscópica e realizado o esfregaço. Os esfregaços foram mantidos por, aproximadamente, 20 minutos à temperatura ambiente para secagem, visando permitir uma melhor adesão dos hemócitos à lâmina. O material foi fixado em metanol por cinco minutos e, em seguida, submetido à coloração de Giemsa durante o mesmo período. Realizou-se uma lavagem rápida das lâminas com água destilada para a retirada do excesso de corante, deixando-as secar em temperatura ambiente para posterior montagem com Entellan. A análise morfológica dos hemócitos foi realizada, utilizando-se microscópio de luz da marca OLYMPUS BX-49, e as fotografias realizadas em fotomicroscópio OLYMPUS BX-51.

Contagem diferencial dos hemócitos. A contagem dos hemócitos seguiu a metodologia parcialmente modificada de Falleiros *et al.* (2003). Em cada repetição (lâmina) foram contadas 300 células em campos aleatórias, utilizando-se objetiva de imersão. A proporção (%) de células (hemócitos) obtida nas amostras (repetições) de lagartas de *S. frugiperda* submetidas aos tratamentos foi submetida à análise de variância em esquema fatorial 3x5 considerando os três tratamentos (testemunha, nim a 0,5% e nim a 1,0%) e cinco intervalos de avaliação após tratamento (48, 96, 144, 192 e 240h) como fatores principais. No caso de resposta significativa na proporção de hemócitos em função dos intervalos de avaliação após tratamento, os resultados foram submetidos à análise de regressão para a sua interpretação e, sendo selecionadas as equações que melhor representavam à resposta biológica e com base na sua significância (F e P) e

maior coeficiente de determinação (R^2). Toda as análises foram conduzidas utilizando o Programa Estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

Resultados e Discussão

Na avaliação realizada aos dois dias após a instalação do experimento, verificou-se 100% de sobrevivência das lagartas alimentadas com folhas tratadas com nim. No entanto, a partir dos seis dias após tratamento, a sobrevivência variou de 25,0 a 87,5%. A menor sobrevivência ocorreu no tratamento com nim na concentração de 1,0% (Fig. 1). Todos os tratamentos com nim alongaram a fase larval, cuja duração foi de 20 dias, diferindo da testemunha, onde o desenvolvimento larval foi em torno de 16 dias, observando-se, deste modo, uma resposta concentração-dependente. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Martinez & van Emden (2001) e Viana & Prates (2003) em que lagartas do gênero *Spodoptera* apresentaram redução no crescimento, mortalidade e deformidades quando tratadas com o nim.

Desta forma, as alterações observadas na fase larval são representativas da atividade inseticida da azadiractina. Na maior concentração de nim, observou-se ainda, já a partir do intervalo de 48h, deterrência alimentar e anormalidades morfológicas, provavelmente relacionadas à ecdise incompleta ou ausência de ecdise. Muitas lagartas morreram durante a ecdise sem conseguir liberar totalmente a exúvia (que geralmente ficava presa na parte posterior do abdome), enquanto outras lagartas morreram numa fase intermediária entre pré-pupa e pupa. Em relação à não-liberação da exúvia, Mordue (Luntz) & Blackwell (1993) mencionaram a ocorrência de sintomas semelhantes em insetos submetidos a diferentes concentrações de azadiractina, e atribuíram essas alterações à redução na concentração do ecdisona ou atraso na sua liberação na hemolinfa. Schmutterer (1990), afirma ainda, que a Ordem Lepidoptera consiste no

grupo de insetos mais sensível ao efeito de reguladores de crescimento (efeitos morfogenéticos) dos derivados do nim.

De acordo com as análises morfológicas, foram visualizados, em todos os tratamentos, seis tipos de hemócitos (Fig. 2) em lagartas de *S. frugiperda*: Adipohemócitos (ADs), Esferulócitos (Es), Granulócitos (GRs), Oenocitóides (OEs), Plasmatócitos (PLs) e Prohemócitos (PRs). Essas células seguiram o mesmo padrão morfológico observado por outros autores para a Ordem Lepidoptera (Falleiros *et al.* 2003, Nardi 2004, Negreiro *et al.* 2004) fornecendo assim subsídios para uma padronização dessas células. A análise histológica não revelou alterações nessas células quando as lagartas foram tratadas com nim nas diferentes concentrações.

Através da Análise de Regressão foram obtidas equações, de acordo com a significância ($P \leq 0,05$), que explicam o comportamento dos hemócitos ao longo do tempo/tratamento (Tabela 1). Alguns tratamentos não apresentam equações de regressão, pois os percentuais da contagem diferencial dos hemócitos de *S. frugiperda* não se ajustaram ao modelo estatístico.

A dinâmica hemocitária ao longo dos intervalos de avaliação após tratamentos (Fig. 3) foi variável para alguns tipos de hemócitos, enquanto outros se mantiveram constantes. A quantidade de adipohemócitos diminuiu significativamente no tratamento com nim a 1,0%. Esta diferença foi observada no intervalo de 48h, o que pode estar relacionado ao gasto das reservas energéticas destas células para reparação dos efeitos ocasionados pela ação do nim (Hillyer & Christensen 2002). Uma vez que, nessa condição a identificação desses hemócitos torna-se difícil, pois há redução no número das gotículas de lipídios. Após o intervalo de 48h, não foram observadas diferenças estatísticas, o que comprova o retorno destas células à morfologia normal.

Houve um aumento proporcional no número médio de esferulócitos na concentração de nim a 1,0%, e uma diminuição na concentração de 0,5%, acarretando diferença estatística entre os tratamentos no intervalo de 240h. Estes resultados corroboram com Ratcliffe *et al.* (1985) e Sass *et*

al. (1994), que comprovaram o envolvimento destes hemócitos no transporte de componentes cuticulares e remodelação tecidual, uma vez que foi observado que o nim ocasionou danos expressivos na cutícula de lagartas de *S. frugiperda* na maior concentração, afetando o processo de ecdise.

Para os granulócitos, observou-se que nos dois primeiros intervalos de tempo (48 e 96h) não houve diferença estatística entre os tratamentos (Fig. 3). No entanto, no intervalo 144h houve uma redução significativa dessas células na concentração de nim a 0,5%, em relação à testemunha. Este fato mostrou que nessa concentração o nim é capaz de interferir na defesa celular, pois Nardi (2004) e Ribeiro & Brehélin (2006), afirmaram que os granulócitos têm função de reconhecimento de partículas estranhas na hemolinfa. Assim, esses hemócitos estão envolvidos nos processos de fagocitose e detoxificação, bem como no processo de remodelação da membrana basal durante a metamorfose.

Numericamente, verificou-se uma redução dos oenocitóides a partir de 96h, nas duas concentrações, em relação à testemunha. Este fato, provavelmente, se deve à lise dessas células, uma vez que, segundo Lavine & Strand (2002), esse processo ocorre em função da liberação de fenoloxidasas, que atuam na esclerotização da cutícula, visto que as lagartas mortas apresentaram-se escurecidas.

O número médio de plasmatócitos aumentou gradativamente entre os tratamentos, e os prohemócitos diminuíram. Considerando esta relação, Barduco *et al.* (1988) e Falleiros *et al.* (2003), constataram que os prohemócitos são células indiferenciadas, que primeiro transformam-se em plasmatócitos, e após liberação na hemolinfa podem se diferenciar em granulócitos, esferulócitos e adipohemócitos. No entanto, o aumento dos plasmatócitos não foi suficiente para impedir as alterações morfológicas ocasionadas pelo nim nas duas concentrações estudadas.

A contagem diferencial dos hemócitos de lagartas de *S. frugiperda* sob influência de nim revelou uma relação concentração-dependente, que foi capaz de afetar a dinâmica hemocitária e provavelmente os eventos endócrinos, contribuindo para a mortalidade e anormalidades morfológicas produzidas. Contudo, apesar da mortalidade e dos efeitos ocorrerem de forma mais expressiva no tratamento com nim a 1,0%, ambas as concentrações alteraram a imunidade celular dos insetos. Assim, verificou-se que o uso de nim (Neemseto[®]) na concentração de 0,5% é suficiente para desencadear efeitos desse inseticida nas respostas imunológicas de *S. frugiperda*, contribuindo para redução de doses e aplicação de inseticidas químicos que apresentam problemas aos organismos benéficos e ao meio ambiente.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho e a Jorge B. Torres (UFRPE) pela ajuda nas análises estatísticas e sugestões no artigo.

Literatura Citada

- Barduco, M.C., E.A. Gregório & L.A. Toledo. 1988.** Hemócitos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) no período larval, estudo morfológico e quantitativo. Rev. Bras. Biol. 48: 925-932.
- Brunham, R.C., F.A. Plummer & R.S. Stephens. 1993.** Bacterial antigenic variation, host immune response and pathogen-host coevolution. Infect. Immun. 61: 2273–2276.
- Bulet, P., C. Hetru, J. Dimarcq & D. Hoffmann. 1999.** Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev. Comp. Immun. 23: 329-344.

- Carneiro, A.A., E.A. Gomes, L.F.V. Nonato, W.M.A. Britto, F.T. Fernandes, N.P. Carneiro, C.T. Guimarães & I. Cruz. 2004.** Caracterização molecular de fungos entomopatogênicos utilizados no controle biológico de pragas do milho – *Beauveria bassiana* versus *Spodoptera frugiperda*. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 10p. (Comunicado Técnico, no. 93).
- Cruz, I. 1995.** A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 45p. (Circular Técnica, no. 21).
- Falleiros, A.M.F., M.T.S. Bombonato e E.A. Gregório. 2003.** Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Braz. Arch. Biol. Technol. 46:287-294.
- Hillyer, J.F. & B.M. Christensen. 2002.** Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Histochem. Cell Biol. 117: 431-440.
- Hoffmann, J.A. 1995.** Innate immunity of insects. Curr. Opin. Immunol. 7: 4-10.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 32:1295-1309.
- Leclerc, V & J.M. Reichhart. 2004.** The immune response of *Drosophila melanogaster*. Immunol. Rev. 198: 59-71.
- Ling, E., K. Shirai, R. Kanekatsu, K. Kiguchi. 2003.** Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining. Histochem. Cell Biol. 120:505–511.
- Martinez, S.S. & H. F. van Emden. 2001.** Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. Neotrop. Entomol. 30: 113-125.
- Mordue (Luntz), A.J. & A. Blackwell. 1993.** Azadirachtin: an update. J. Insect Physiol. 39: 903-924.

- Nardi, J.B. 2004.** Embryonic origins of the two main classes of hemocytes – granular cells and plasmatocytes – in *Manduca Sexta*. Dev. Genes Evol. 214: 19-28.
- Nardi, J.B., B. Pilas, C.M. Bee, S. Zhuang, K. Garsha & M.R. Kanost. 2006.** Neuroglial-positive plasmatocytes of *Manduca sexta* and the initiation of hemocyte attachment to foreign surfaces. Dev. Comp. Immunol. 30: 447-462.
- Negreiro, M.C.C., F.G. Andrade & A.M.F. Falleiros. 2004.** Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. Semina: Cienc. Agr. 25: 293-308.
- Ratcliffe, N.A., A.F. Rowley, S.W. Fitzgerald & C.P. Rhódes. 1985.** Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol. 97: 183-279.
- Ribeiro, C. & M. Brehélin. 2006.** Insect haemocytes: what type of cell is what? J. Insect Physiol. 52: 417-429.
- Roel, A.R. 2001.** Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. Rev. Int. Desenv. Local 1: 43-50.
- Russo, J., M. Brehélin & Y. Carton. 2001.** Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. Melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. J. Insect Physiol. 47: 167-172.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Sass, M., A. Kiss & M. Locke. 1994.** Integument and hemocytes peptides. J. Insect Physiol. 40: 407-421.
- Schmid-Hempel, P. 2005.** Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu. Rev. Entomol. 50: 529-551.

- Schmutterer, H. 1990.** Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annu. Rev. Entomol. 35: 271-297.
- Sharma, P.R., O.P. Sharma & B.P. Saxena. 2003.** Effect of Neem gold on haemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Curr. Sci. 84: 690-695.
- Silva, C.C.A. 2002.** Aspectos do sistema imunológico dos insetos. Biotecnol. Cienc. Desenv. 24: 68-72.
- Silva, C. da, G.B. Dunphy & M.E. Rau. 2000.** Interaction of hemocytes and propheneloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. Dev. Comp. Immunol. 24: 367-379.
- Viana, P.A. & H.T. Prates. 2003.** Desenvolvimento e mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* em folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica*. Bragantia 62: 6-74.

Tabela 1. Equações para as proporções (%) e respectivos parâmetros de ajuste (F, Teste de Fisher; P, valor da significância e; R², coeficiente de determinação) da contagem diferencial dos hemócitos de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas e não tratadas com nim a 0,5 e 1,0% em função dos intervalos 48, 96, 144, 192 e 240h após tratamento. Temp.: 25,2 ± 1,4°C; UR de 67 ± 0,7% e fotofase de 12h.

| Tipos de hemócitos | Tratamentos | Equações | F ^P | R ² |
|--------------------|-------------|--|----------------------------|----------------|
| Adipohemócitos | Testemunha | $\hat{y} = 5,535 - 0,021x$ | 5,39 ^{0,027} | 0,16 |
| | Nim 0,5% | $\hat{y} = 3,294 - 0,008x$ | 8,36 ^{0,005} | 0,15 |
| | Nim 1,0% | $\hat{y} = \bar{y} = 1,92$ | 2,95 ^{0,092} | |
| Esferulócitos | Testemunha | $\hat{y} = \bar{y} = 12,88$ | 0,23 ^{0,800} | |
| | Nim 0,5% | $\hat{y} = 0,997 + 0,317x - 0,001x^2$ | 3,66 ^{0,033} | 0,13 |
| | Nim 1,0% | $\hat{y} = \bar{y} = 24,91$ | 0,68 ^{0,566} | |
| Granulócitos | Testemunha | $\hat{y} = \bar{y} = 45,30$ | 0,65 ^{0,528} | |
| | Nim 0,5% | $\hat{y} = \bar{y} = 42,27$ | 2,39 ^{0,081} | |
| | Nim 1,0% | $\hat{y} = 51,911 - 0,092x$ | 13,92 ^{0,001} | 0,22 |
| Oenocitóides | Testemunha | $\hat{y} = \bar{y} = 2,87$ | 0,42 ^{0,660} | |
| | Nim 0,5% | $\hat{y} = \bar{y} = 2,45$ | 2,28 ^{0,091} | |
| | Nim 1,0% | $\hat{y} = \bar{y} = 1,65$ | 1,01 ^{0,395} | |
| Plasmatócitos | Testemunha | $\hat{y} = -9,933 + 0,689x - 0,003x^2$ | 8,83 ^{0,001} | 0,39 |
| | Nim 0,5% | $\hat{y} = -11,79 + 0,928x - 0,007x^2 + 0,000016x^3$ | 8,94 ^{<0,001} | 0,37 |
| | Nim 1,0% | $\hat{y} = 13,741 + 0,1007x$ | 13,75 ^{0,001} | 0,22 |
| Prohemócitos | Testemunha | $\hat{y} = 37,42 - 0,502x + 0,0022x^2$ | 10,18 ^{<0,001} | 0,43 |
| | Nim 0,5% | $\hat{y} = 23,88 - 0,432x + 0,003x^2 - 0,0000069x^3$ | 2,9 ^{0,045} | 0,16 |
| | Nim 1,0% | $\hat{y} = 29,019 - 0,603x + 0,0043x^2 - 0,0000095x^3$ | 12,19 ^{<0,001} | 0,44 |

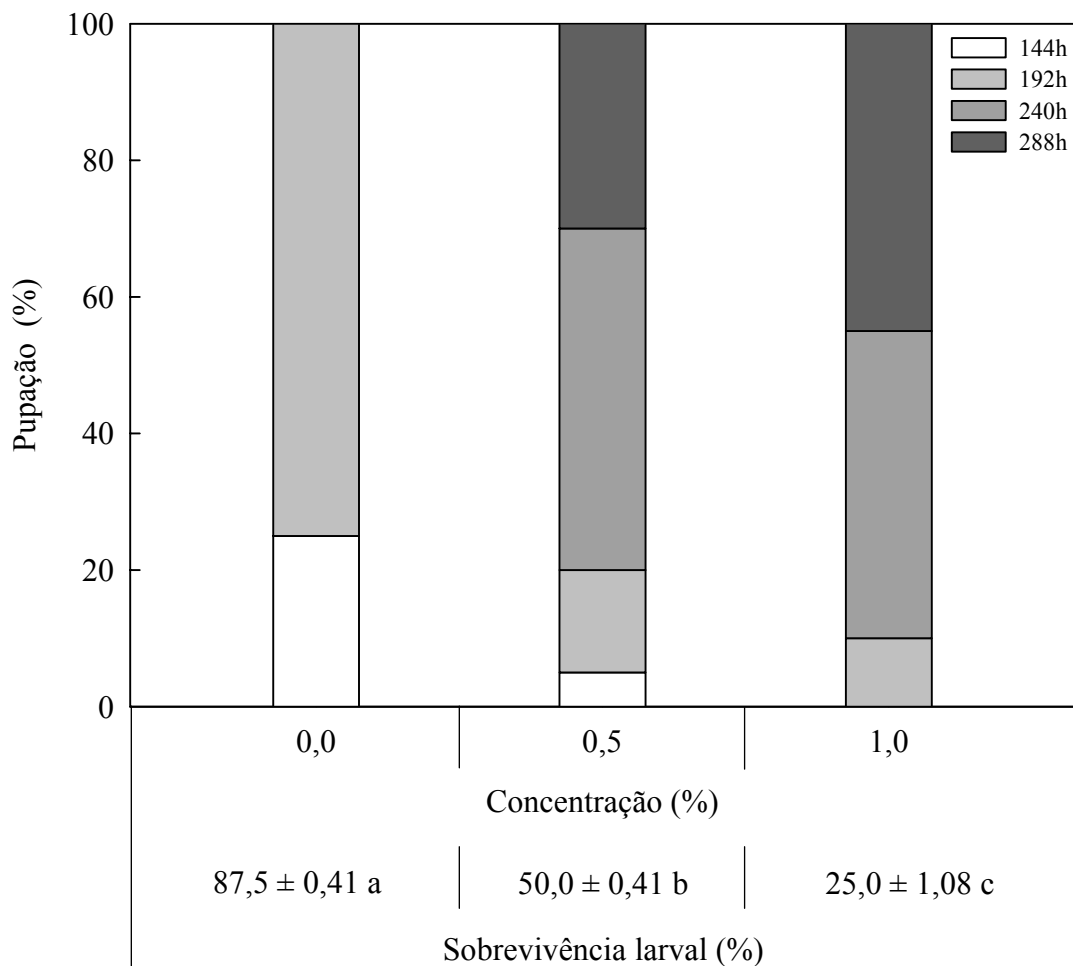


Figura 1. Proporção de lagartas de *S. frugiperda* que atingiram a fase de pupa e respectiva taxa de sobrevivência (Média ± EP), submetidas as diferentes concentrações de nim. Médias indicadas com diferentes letras relativas à sobrevivência larval diferem entre concentrações pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

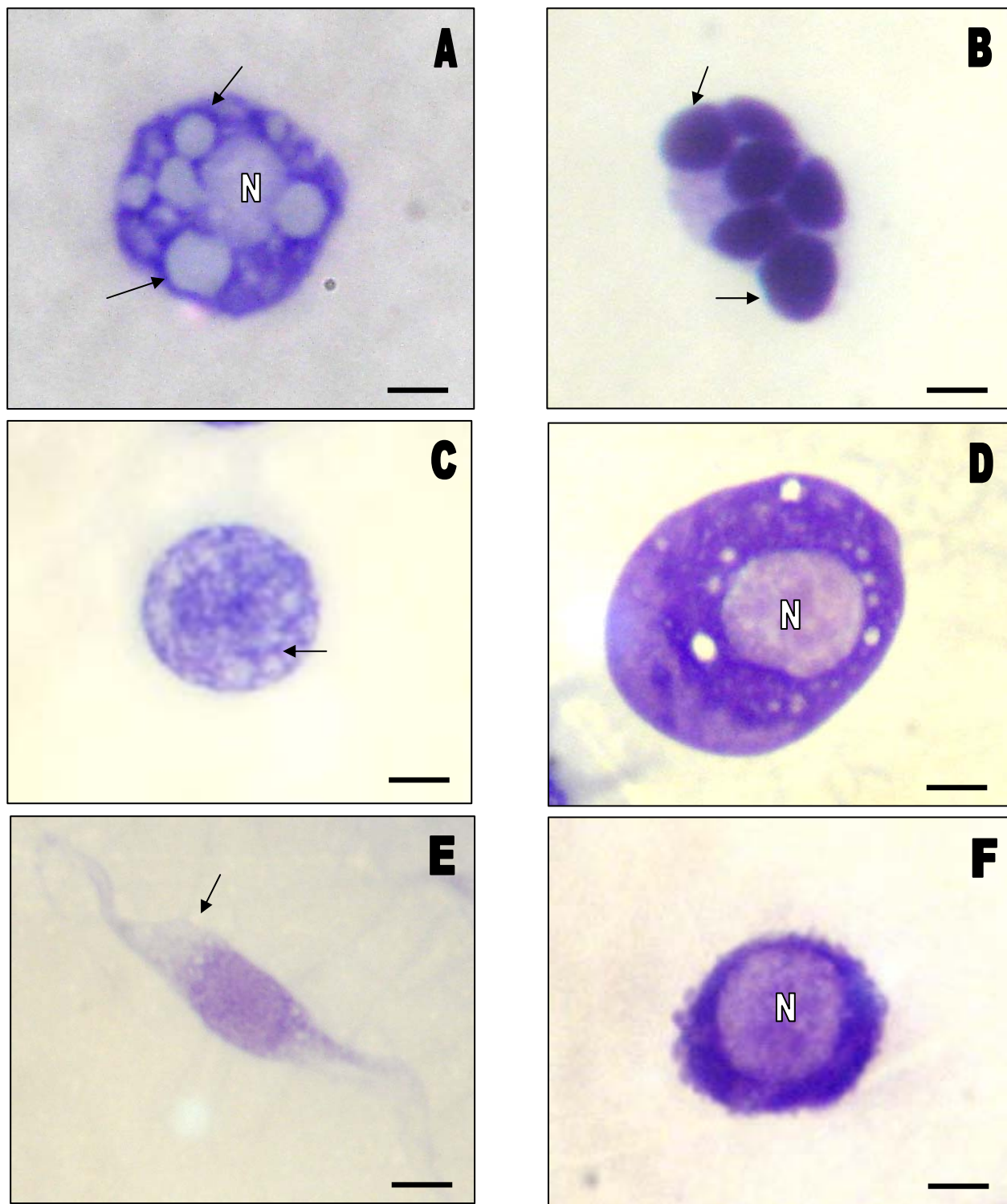


Figura 2. Hemócitos de *S. frugiperda*. **Adipohemócito** (A) com várias gotículas de lipídios de forma e tamanhos irregulares no citoplasma (setas) próximas ao núcleo (N). **Esferulócito** (B) com várias vesículas (setas) dispostas irregularmente chegando a mascarar o núcleo. **Granulócito** (C) grande quantidade de grânulos irregulares pequenos no citoplasma (seta). **Oenocitóide** (D) caracterizado pelo seu tamanho volumoso com núcleo excêntrico (N). **Plasmatócito** (E) exibindo prolongamentos citoplasmáticos (seta). **Prohemócito** (F) apresentando núcleo volumoso (N) deixando o citoplasma restrito a uma pequena faixa periférica. Barras =10 μ m

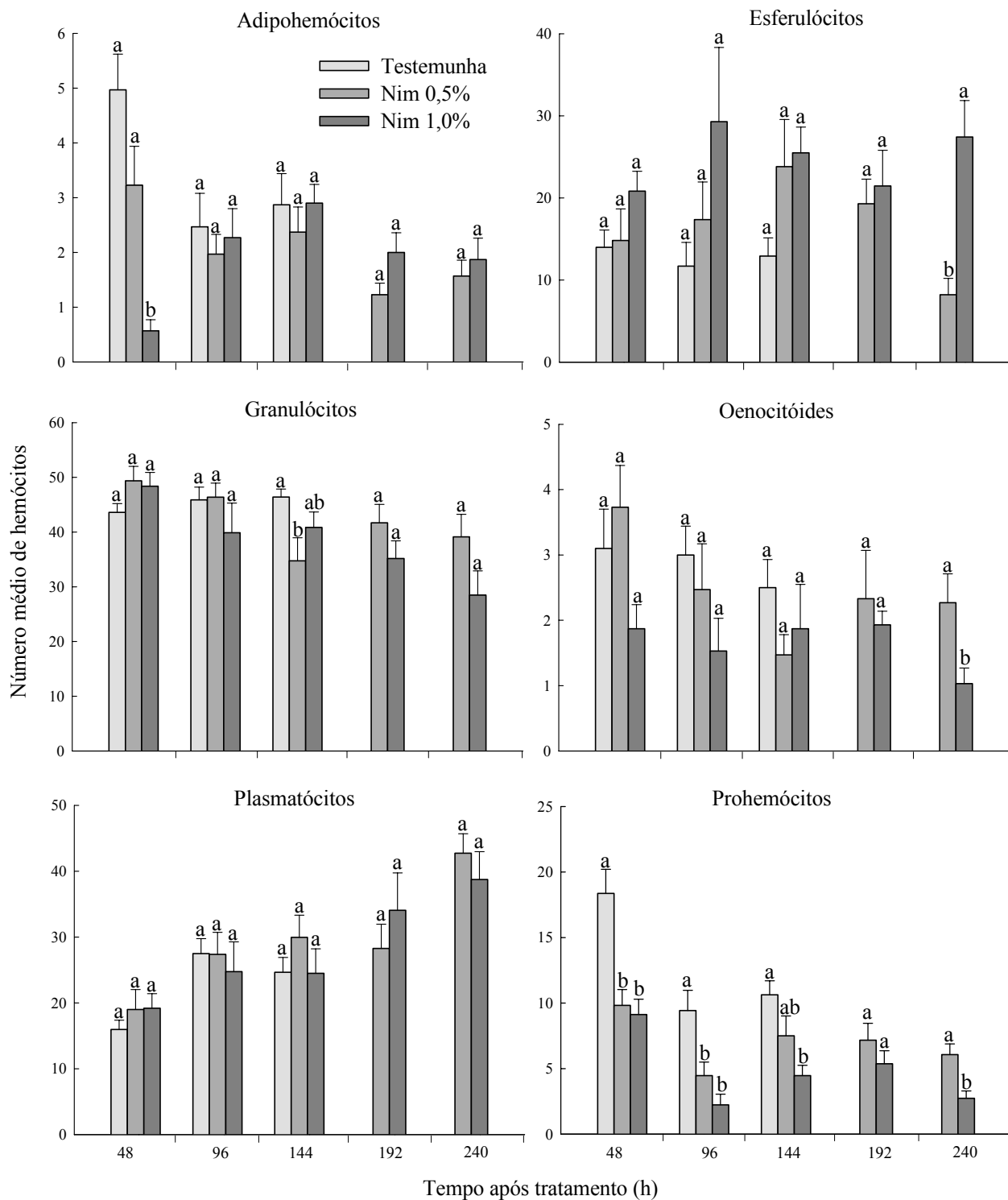


Figura 3. Média (+ EP) da contagem diferencial (%) dos hemócitos de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas e não tratadas com nim a 0,5 e 1,0% a partir do terceiro instar. Médias indicadas com diferentes letras ao longo do tempo diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Nota-se que os valores na escala do eixo y diferem entre os tipos de hemócitos.

CAPÍTULO 3

HISTOFISIOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR DE LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TRATADAS COM NIM
(*Azadirachta indica* A. JUSS)

ALICELY A. CORREIA¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA¹, ÁLVARO A.C. TEIXEIRA² E JOSÉ V.
OLIVEIRA¹

¹Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.
Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos , 52171-900, Recife, PE.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos , 52171-900, Recife, PE.

¹Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira & J.V. Oliveira. Histofisiologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Neotropical Entomology.

RESUMO – O canal alimentar dos insetos representa uma barreira química e física contra potenciais agentes tóxicos ingeridos com o alimento. Assim, a presente pesquisa teve os seguintes objetivos: descrever, histologicamente, o canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae); analisar o efeito das concentrações 0,5 e 1,0% de nim, *Azadirachta indica* A. Juss (Neemseto[®]) sobre a histofisiologia do mesêntero, nos intervalos de 48, 96, 144, 192 e 240h após tratamento; quantificar as células regenerativas; e analisar, histoquimicamente, o produto de secreção do mesêntero. Lagartas de *S. frugiperda* tratadas e não tratadas nesses intervalos foram imobilizadas à baixa temperatura (-4°C) para a retirada do canal alimentar, o qual foi fixado em Bouïn aquoso por seis horas, incluído em “paraplast”, e os cortes corados por Hematoxilina-Eosina, Ácido Periódico de Schiff e Tricrômico de Mallory. As características histológicas do canal alimentar de lagartas de *S. frugiperda*, de modo geral, foram semelhantes às observadas em outras espécies de lepidópteros. As alterações histofisiológicas variaram de intensidade de acordo com o tempo e as concentrações do nim estudadas, tais como: degeneração do epitélio e da musculatura do mesêntero, redução de células regenerativas e da atividade secretora desta região, comprovada pela histoquímica, em ambas as concentrações do nim. Estas alterações foram observadas nas lagartas tratadas com nim a 1,0% já a partir de 96h após o tratamento. Esses resultados demonstram a atividade inseticida da formulação comercial de nim (Neemseto[®]) na histofisiologia do mesêntero de lagartas de *S. frugiperda*.

PALAVRAS-CHAVE: Fisiologia, histoquímica, inseticida botânico, lagarta-do-cartucho, mesêntero

HISTOPHYSIOLOGY OF *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) LARVAE FOOD CHANNEL TREATED WITH NEEM (*Azadirachta indica* A.
JUSS)

ABSTRACT – The food channel of insects offers chemical and physical barrier against toxic agents ingested with the food. Thus, this research had the following objectives: to describe, histologically, the food channel of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae; to analyze the effect of concentrations 0.5 and 1.0% of neem, *Azadirachta indica* A. Juss (Neemseto[®]) on the histophysiology of midgut throughout the intervals 48, 96, 144, 192 and 240h post-treatment; to quantify the regenerative cells and; to analyze, histochemically, the secretion product of midgut. Untreated and treated larvae of *S. frugiperda* from different post-treatment intervals were immobilized at low temperature (-4°C) to the extraction of the food channel, which was fixed in Bouin liquid for six hours, embedding in "paraplast", and the cuts stained by Hematoxylin-Eosin, Acid Periodic of Schiff and Trichrome of Mallory. The histological characteristics of *S. frugiperda* larvae food channel, in general, were similar to the other lepidopteran species. The histophysiological alterations such as degeneration of the musculature and epithelium of the midgut, reduction of regenerative cells and the secretory activity of this region, proven for the histochemical, varied as function of neem concentrations and intervals post-treatment. The alterations were observed in treated larvae with neem at 1.0% beginning at 96h post-treatment interval. These results demonstrate the insecticide activity of the commercial formulation neem (Neemseto[®]) on the histophysiology of midgut of *S. frugiperda* larvae.

KEY WORDS: Physiology, histochemical, botanical insecticide, fall armyworm, midgut

Introdução

A cultura do milho, *Zea mays* L., no Brasil, tem sido explorada praticamente durante o ano todo, seja na safra de verão, inverno ou na safrinha (outono), contribuindo para aumentar a infestação da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), praga-chave dessa cultura. Essa praga é cosmopolita, com grande capacidade de infestar várias culturas de importância econômica em vários países, e no Brasil, além do milho, ocorre em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) e outras gramíneas (Cruz 1995, Cruz *et al.* 1999).

De uma maneira geral o uso de inseticidas tem sido o método mais eficiente no controle a esses insetos. Entretanto, são caros e em alguns casos pouco eficazes e perigosos se usados de forma intensiva e incorreta. Assim, alguns avanços nos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) na cultura do milho têm sido realizados, entre eles destacam-se como promissores a utilização de diversos metabólitos secundários presentes nas raízes, folhas e sementes de algumas plantas, as quais são denominadas de “plantas inseticidas” (Schmutterer 1990, Roel *et al.* 2000, Roel 2001).

Entre estas plantas inseticidas destaca-se o nim, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae), cujo principal composto bioativo é a azadiractina que provoca efeito anti-alimentar, redução no crescimento, inibição da ecdise, anormalidades morfológicas, mortalidade e repelência, sobre uma diversa gama de espécies de insetos, principalmente da Ordem Lepidoptera. Sua ação, contudo, depende da espécie de inseto e da concentração aplicada (Roel 2001, Martinez & van Emden 2001, Costa *et al.* 2004).

O efeito de azadiractina como regulador de crescimento está supostamente associado com sua interferência no sistema neuroendócrino dos insetos, afetando diferentes funções fisiológicas controladas por ações neurohormonais, como processo de muda, síntese de proteínas, reprodução,

diapausa e comportamento [Mordue (Luntz) & Nisbet 2000, Martinez 2002, Neves *et al.* 2003]. Porém são escassos os relatos a respeito da interferência do nim sobre a histofisiologia do canal alimentar em insetos.

O canal alimentar dos insetos, geralmente, apresenta-se como um tubo reto que se estende da boca ao ânus, e está diferenciado em três regiões principais com diferentes origens embriológicas: intestino anterior ou estomodeu, intestino médio ou mesêntero e intestino posterior ou proctodeu. Esse canal representa uma área de contato entre os insetos e o meio ambiente e é o foco de grande parte das pesquisas para se controlar o ataque de pragas (Chapman 1998, Levy *et al.* 2004a).

Apesar de vários estudos a respeito dos efeitos morfológicos do nim sobre *S. frugiperda*, não existem trabalhos que abordem a ação desse composto sobre a histofisiologia do canal alimentar dessa lagarta. E, segundo Mordue (Luntz) & Blackwell (1993) e Mordue (Luntz) & Nisbet (2000), o crescimento e o desenvolvimento dos insetos, bem como todos os eventos fisiológicos, dependem da alimentação adequada, de sua absorção e transformação no canal alimentar. Assim, a presente pesquisa teve quatro objetivos principais: descrever, histologicamente, o canal alimentar de lagartas de *S. frugiperda* (i); caracterizar o efeito das concentrações 0,5 e 1,0% do nim (produto comercial Neemseto[®]), sobre a histofisiologia do mesêntero, nos intervalos de 48, 96, 144, 192 e 240h, após tratamento (ii); quantificar as células regenerativas (iii); e analisar, histoquimicamente, o produto de secreção do mesêntero (iv).

Material e Métodos

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e no Laboratório de Entomologia Agrícola do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Obtenção dos insetos. Lagartas de *S. frugiperda* foram obtidas da criação estoque do Laboratório de Entomologia Agrícola, mantidas à temperatura de $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12h, as quais foram alimentadas com folhas de milho híbrido duplo AG 1051. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, com duas plantas/vaso de 5L com solo + húmus de minhoca na proporção 2:1 + 12,13g de N-P-K (formulação 4-14-8). Eventualmente, foram semeadas plantas no campo experimental do Departamento de Agronomia da UFRPE.

Instalação dos bioensaios. Lagartas de *S. frugiperda* no oitavo dia de idade (3^o instar) foram alimentadas durante 48h com pedaços de folhas de milho (6,0 x 4,5cm) com 20 a 40 dias de idade, tratados com nim (formulação comercial Neemseto[®]) nas concentrações de 0,5% (5mL/L) e 1,0% (10mL/L) e água destilada (testemunha), através da técnica de imersão. Esses pedaços de folhas de milho foram imersos por cinco segundos e postos para secar a temperatura ambiente por 30 minutos. As lagartas foram individualizadas em placas de Petri com dimensões de 10cm de diâmetro e forradas com papel de filtro umedecido. Após o período inicial de alimentação de 48h, as folhas foram substituídas, diariamente, por novas folhas não tratadas até as lagartas atingirem a fase de pupa.

Coleta do canal alimentar. As lagartas submetidas aos tratamentos com nim a 0,5 e 1,0% foram avaliadas nos intervalos de 48, 96, 144, 192 e 240h, e a testemunha nos intervalos de 48, 96 e 144h, em virtude das lagartas terem atingido a fase de pupa após este último intervalo de tempo. As lagartas foram imobilizadas à temperatura de -4°C , dissecadas sob estereomicroscópio para retirada do canal alimentar, que foi clivado em três regiões (anterior, média e posterior) e fixado em Bouin aquoso por seis horas, a 4°C . Após desidratação em banhos crescentes de etanol e diafanização em xilol, o material foi impregnado em “paraplast”. Secções de cortes de $7\mu\text{m}$ de espessura foram coradas por Hematoxilina – Eosina (H-E), Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) e

Tricrômico de Mallory, empregando-se a metodologia descrita por Michalany (1990). A análise histológica foi realizada utilizando-se um microscópio de luz OLYMPUS BX-49, e fotografado em fotomicroscópio OLYMPUS BX-51.

Quantificação das células regenerativas do mesêntero. A quantificação foi realizada utilizando cinco secções de cortes obtidas da região mediana do mesêntero de cinco lagartas. Cada lagarta correspondeu a uma repetição, sendo utilizadas cinco repetições/intervalo de tempo/tratamento. A captura de imagem foi efetuada por meio de câmera de vídeo Sony[®], acoplada ao microscópio Olympus[®] Bx50. A morfometria foi realizada através do aplicativo de pontos, associado ao programa ImageLab 2000 para Windows 3x. Em cada repetição (lâmina com a secção do corte) foram contadas células regenerativas em dez campos aleatórios. O número médio de células regenerativas obtido nas amostras (repetições) de lagartas de *S. frugiperda* foi submetido à análise de variância em esquema fatorial 3x5 considerando os três tratamentos (testemunha, nim a 0,5 e 1,0%) e cinco intervalos de avaliação após tratamento (48, 96, 144, 192 e 240h) como fatores principais. No caso de resposta significativa na quantidade de células regenerativas em função dos intervalos de avaliação após tratamento, os resultados foram submetidos à análise de regressão para a sua interpretação e selecionadas as equações com base na sua significância (F e P) e maior coeficiente de determinação (R^2). Todas as análises foram conduzidas utilizando o Programa Estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

Resultados e Discussão

Histologicamente, o estomodeu e o proctodeu de lagartas de *S. frugiperda* apresentaram-se revestidos por tecido epitelial simples, variando de pavimentoso a cúbico no estomodeu e cúbico no proctodeu. Em ambas as regiões foram evidenciadas projeções do epitélio para o lúmen e presença de uma espessa íntima (Fig. 1A e 1C). Duas camadas de tecido muscular, a mais interna

longitudinal e a externa circular foram observadas revestindo externamente o estomodeu, enquanto que no proctodeu evidenciou-se também duas camadas de músculos, porém sendo a interna circular com fibras contínuas e bem desenvolvidas e a externa longitudinal com feixes espaçados (Fig. 1B e 1D). O mesêntero apresentou um lúmen amplo, onde foi possível observar a presença da membrana peritrófica envolvendo o material digerido (Fig. 2A). Revestindo externamente esse órgão observaram-se duas camadas de músculos que seguiam a mesma disposição da região do proctodeu, no entanto a camada de músculo circular mostrou-se delgada e a longitudinal apresentava numerosos feixes menos espaçados (Fig. 2B). O mesêntero apresentou-se, ainda, revestido por epitélio simples colunar, onde foram evidenciados três tipos de células: as basais ou regenerativas situadas na base da lâmina epitelial, com citoplasma basófilo e núcleo esférico e central; células globosas com um citoplasma claro e núcleo basal e células colunares altas localizadas próximas à luz do órgão, apresentando microvilos (Fig. 2C). Foi possível observar também, intensa atividade de secreção de natureza mucosa, no lúmen do mesêntero, comprovada pela reação com os corantes Tricrômico de Mallory e P.A.S. (Figs. 2B e 2D).

A lâmina epitelial do canal alimentar de lagartas de *S. frugiperda* seguiu o padrão descrito na literatura, o qual relata que todas as regiões são revestidas por uma única camada de células (Chapman 1998). Segundo Cavalcante & Cruz-Landim (1999) e Pinheiro *et al.* (2003), no epitélio do mesêntero dos insetos há predominância de quatro tipos de células: colunares, globosas, regenerativas e células endócrinas. As células colunares podem apresentar várias denominações tais como: células digestivas, células principais, células absorptivas e enterócitos. Essas células predominaram ao longo do epitélio do mesêntero das lagartas de *S. frugiperda*, as quais são consideradas responsáveis pela absorção do alimento digerido, mostrando aspectos morfológicos similares a outras espécies de lepidópteros, como descrito por Cavalcante & Cruz-Landim (1999) e Levy *et al.* (2004a). Essas células epiteliais, conforme estudos de Harper & Hopkins (1997) e

Harper & Granados (1999), também são responsáveis pela secreção da membrana peritrófica, cuja função é evitar o contato dessas células com o alimento.

As células globosas observadas nessa espécie, também, são similares às encontradas em outros lepidópteros, apresentando uma típica cavidade, chamada câmara globosa. Essas células estavam espalhadas por todo epitélio do mesêntero cuja função é realizar o transporte de potássio da hemolinfa para o lúmen, cooperando com as células colunares na homeostase iônica e absorção de metabólitos (Cavalcante & Cruz-Landim 1999, Klowden 2002). Através da análise histoquímica pelo Tricrômico de Mallory e P.A.S. foi possível constatar a intensa atividade secretora de natureza mucosa dessas células. Segundo Cavalcante & Cruz-Landim (1999), as células regenerativas têm a função de renovar as células velhas, possibilitando o crescimento do canal alimentar a cada ecdise, e substituir as células danificadas. Podem ser encontradas sozinhas, pareadas ou em grupos.

As lagartas de *S. frugiperda* tratadas com nim não apresentaram alterações morfológicas nas regiões do estomodeu e proctodeu. Este fato é perfeitamente aceitável uma vez que essas regiões são revestidas internamente por uma espessa íntima, atuando como uma barreira à entrada de organismos ou substâncias estranhas (Chapman 1998, Levy *et al.* 2004b). No entanto, na região do mesêntero, evidenciaram-se alterações histofisiológicas que variaram de intensidade de acordo com o tempo de exposição e concentrações. Após 48 e 96h nas lagartas tratadas, não foram visualizadas modificações teciduais no tratamento com nim a 0,5%, porém foi bastante nítida a redução significativa da atividade secretora dessa região nas duas concentrações (Figs. 3A e 3B). Essa redução observada no tratamento com nim a 1,0%, parece ter afetado o processo de digestão devido à presença de alimento intacto no lúmen, o que não ocorreu no tratamento com nim a 0,5% (Fig. 3C). A partir do intervalo de 96h, as lagartas tratadas com nim a 1,0% mostraram alteração da lâmina epitelial com projeções para o lúmen e liberação de algumas células juntamente com o

produto de secreção (Figs. 4A e 4B). Evidenciou-se, ainda, uma degeneração da musculatura do mesêntero (Fig. 3D). Essas mesmas alterações só foram evidenciadas no tratamento com nim a 0,5%, a partir de 144h após tratamento (Figs. 4C e 4D).

Como o mesêntero é o principal local de digestão e absorção de alimentos, constitui assim a região mais vulnerável à ação de elementos estranhos. Entretanto, antes da interação com as células epiteliais, os agentes invasores encontram como barreiras: a membrana peritrófica e o suco digestivo (Barbehenn & Martin 1995, Matos *et al.* 1999, Mohan *et al.* 2006). Contudo, mesmo evidenciando a presença da membrana peritrófica íntegra em todos os intervalos/tratamentos, não foi suficiente para impedir a ação do nim sobre o epitélio e evitar os danos ocasionados. No entanto, foi notória a redução do produto de secreção no lúmen do mesêntero.

Estudos histológicos realizados por Nasiruddin & Mordue (Luntz) (1993) em *Schistocerca gregaria* (Forsk.) e *Locusta migratoria* (Fab.) (tratados com 5, 10 e 15µg/g de azadiractina por peso do corpo), e por Schmidt *et al.* (1997), em larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) e *Agrotis ipsilon* (Hufn.) (tratadas com 100ppm do extrato de *Melia azedarach* L., Meliaceae), observaram redução na utilização dos nutrientes ingeridos e na atividade das enzimas do mesêntero, perda de células regenerativas, além de ter afetado diretamente a musculatura e causado necrose celular.

Os tratamentos com nim (0,5 e 1,0%) afetaram o número de células regenerativas da região mediana do mesêntero em relação à testemunha ($F_{2, 52} = 29,22$; $P < 0,0001$), igualmente ao longo dos tempos de avaliação ($F_{4, 52} = 6,17$; $P = 0,0004$). Entretanto, não foi observado interação tratamentos e tempo de avaliação ($F_{6, 52} = 0,71$; $P = 0,6417$). A contagem ao longo do tempo demonstrou que no tratamento testemunha, o número de células se manteve constante ($P > 0,05$), embora apresentasse queda na quantidade de células no intervalo de 144h o que pode estar relacionado ao fato das lagartas estarem próximas à fase de pupa (Fig. 5). Esses resultados

corroboram com os estudos de Cavalcante & Cruz-Landim (2004), que afirmaram que durante a pupação novas células originam-se da proliferação das células regenerativas e cada uma dessas novas células sofrem vários tipos de modificações que envolvem a eliminação de partes das células para o lúmen. Por outro lado, em ambos os tratamentos com o nim, a contagem das células regenerativas demonstrou queda significativa do seu número em todos os intervalos de tempo após tratamento (Fig. 5). Este fato deve estar relacionado ao dano ocasionado pela ação do nim, provocando degeneração do epitélio, e conseqüentemente, a perda dessas células. Nasiruddin & Mordue (Luntz) (1993) afirmaram que, juntamente com os efeitos histológicos nas células epiteliais do mesêntero de *S. gregaria* e *L. migratoria*, ocorreu à redução das células regenerativas e um aumento da camada de tecido conectivo, concomitante com a invasão de muitos hemócitos e células para o lúmen desta região. É provável que as alterações dos tecidos levem à função anormal destes e que a secreção de enzimas e a absorção dos nutrientes também sejam alterados.

De acordo com os resultados encontrados, conclui-se que as características histológicas do canal alimentar de lagartas de *S. frugiperda*, de modo geral, foram semelhantes às observadas em outras espécies de lepidópteros. Alterações histofisiológicas, como degeneração do epitélio e da musculatura do mesêntero, redução do número de células regenerativas e da atividade secretora desta região, foram evidenciadas em ambas as concentrações de nim. Contudo, estas alterações foram observadas em lagartas tratadas com nim a 0,5%, a partir do intervalo de tempo de 144h, enquanto que a 1,0%, essas alterações ocorreram já a partir de 96h após o tratamento.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsa ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho e a Jorge B. Torres (PPGEA-UFRPE) pelas sugestões.

Literatura Citada

- Barbehenn, R.V. & M.M. Martin. 1995.** Peritrophic envelop permeability in herbivorous insects. *J. Insect Physiol.* 41: 303-311.
- Cavalcante, V.M. & C. Cruz-Landim. 1999.** Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia* 24: 19-39.
- Cavalcante, V.M. & C. Cruz-Landim. 2004.** Eletrophoretic protein pattern and acid phosphatase activity in the midgut extracts of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) during metamorphosis. *Neotrop. Entomol.* 33: 169-171.
- Chapman, R.F. 1998.** The Insects: structure and function, 4th ed. Cambridge, Cambridge University Press, 788p.
- Costa, E.L.N., R.F.P. Silva & L.M. Fiuza. 2004.** Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biol. Leop.* 26: 173-185.
- Cruz, I. 1995.** A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 45p. (Circular Técnica, no. 21).
- Cruz, I., P.A. Viana & J.M. Waquil. 1999.** Manejo das pragas iniciais de milho mediante o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 39p. (Circular Técnica, no. 31).
- Harper, M.S. & T.L. Hopkins. 1997.** Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). *Tissue Cell* 29: 463-475.
- Harper, M.S. & R.R. Granados. 1999.** Peritrophic membrane structure and formation of larval *Trichoplusia ni* with an investigation on the secretion patterns of a PM mucin. *Tissue Cell* 31: 202-211.
- Klowden, M.J. 2002.** Physiological systems in insects. New York, Academic Press, 415p.

- Levy, S.M., A.M.F. Falleiros, E.A. Gregório, N.R. Arrebola & L.A. Toledo. 2004a.** The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Braz. J. Biol.* 64: 633-638.
- Levy, S.M., A.M.F. Falleiros, F. Moscardi, E.A. Gregório & L.A. Toledo. 2004b.** Morphological study of the hindgut in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 33: 427-431.
- Martinez, S.S. 2002.** O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina, Instituto Agronômico do Paraná, 142p.
- Martinez, S.S. & H. F. van Emden. 2001.** Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotrop. Entomol.* 30: 113-125.
- Matos, T.G.T., L.G. Giugliano, B.M. Ribeiro & S.N. Bão. 1999.** Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatalis* midgut cells infected with the baculovirus *A. gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 28: 195-201.
- Michalany, J. 1990.** Técnica histológica em anatomia patológica. São Paulo, Editora Michalany, 247p.
- Mohan, S., P.W.K. Ma, T. Pechan, E.R. Bassford, W.P. Williams & D.S. Luthe. 2006.** Degradation of the *S. frugiperda* peritrophic matrix by an inducible maize cysteine protease. *J. Insect Physiol.* 52: 21-28.
- Mordue (Luntz), A.J. & A. Blackwell. 1993.** Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 39: 903-924.
- Mordue (Luntz), A.J. & A.J. Nisbet. 2000.** Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An. Soc. Entomol. Bras.* 29: 615-632.

- Nasiruddin, M. & A.J. Mordue (Luntz). 1993.** The effect of azadirachtin on the midgut histology of the locusts, *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. *Tissue Cell* 25: 875-884.
- Neves, B.P., I.P. Oliveira & J.C.M. Nogueira. 2003.** Cultivo e utilização do nim indiano. Goiânia, Embrapa Arroz e Feijão, 12p. (Circular Técnica, no. 62).
- Pinheiro, D.O., J.S. Reinaldo, I. Quagio-Grassiotto & E.A. Gregório. 2003.** Morphometric study of the midgut epithelium in larvae of *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). *Neotrop. Entomol.* 32: 453-459.
- Roel, A.R. 2001.** Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. *Rev. Int. Desenv. Local* 1: 43-50.
- Roel, A.R., J.D. Vendramim, R.T.S. Frighetto & N. Frighetto. 2000.** Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *An. Soc. Entomol. Bras.* 29: 799-808.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schmidt, G.H., A.A.I. Ahmed & M. Breuer. 1997.** Effect of *Melia azedarach* extract on larval development and reproduction parameters of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hufn.) (Lep. Notuidae). *Az. Schädlingskd.* 70: 4-12.
- Schmutterer, H. 1990.** Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 271-297.

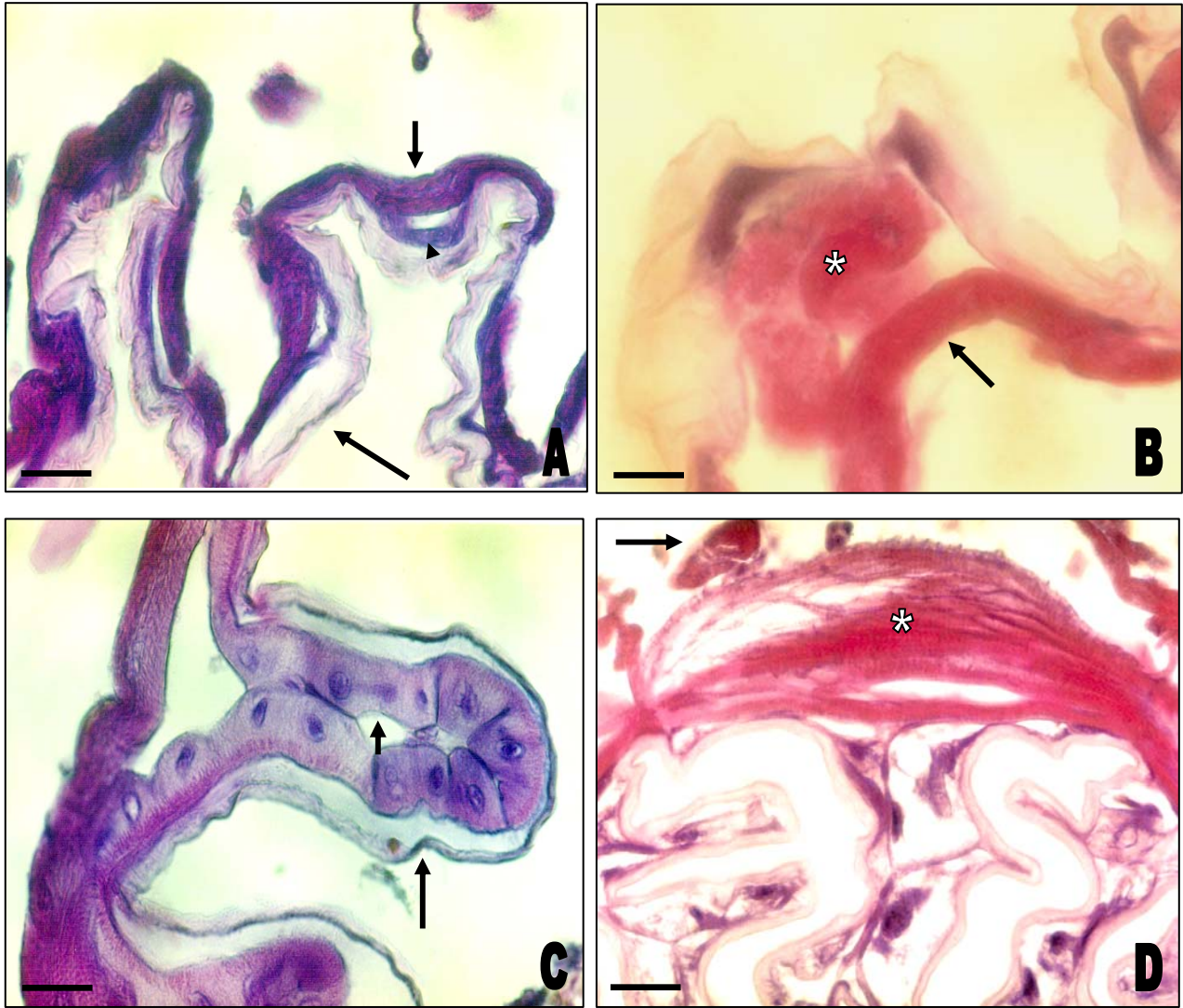


Figura 1. Cortes histológicos caracterizando o canal alimentar de lagartas de *S. frugiperda* nos diferentes intervalos de tempo. (A) Estomodeu: tecido muscular (seta curta), tecido epitelial simples cúbico (ponta de seta) e íntima (seta longa). Barra 25 μ m. (B) Estomodeu: camada muscular interna longitudinal (asterisco) e externa circular (seta). Barra 10 μ m. (C) Proctodeu: tecido epitelial simples cúbico (seta curta) e íntima (seta longa). Barra 25 μ m. (D) Proctodeu: camadas de músculo, a interna circular (asterisco) e a externa longitudinal com feixes espaçados (seta). Barra 25 μ m. Coloração H-E.

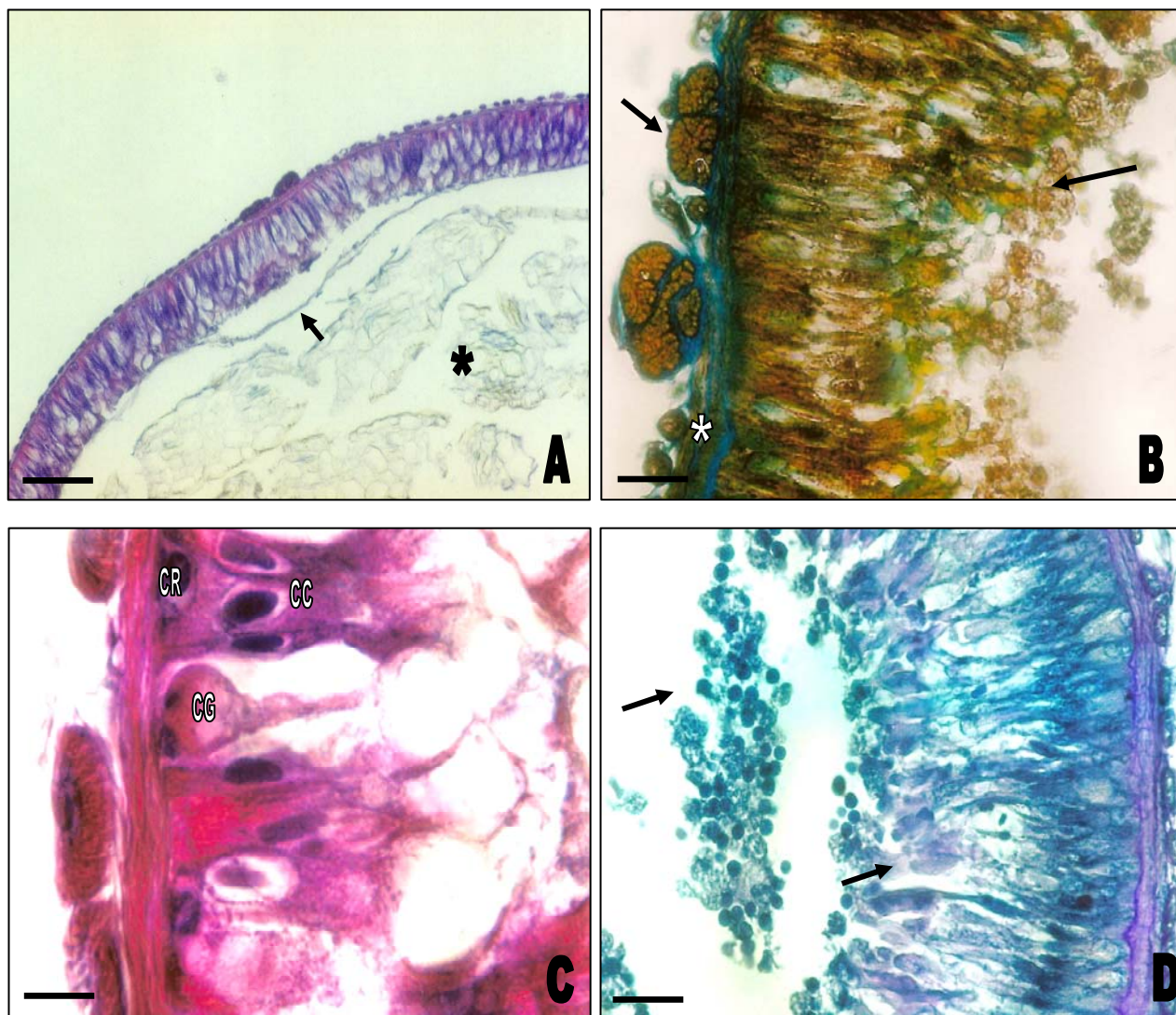


Figura 2. Cortes histológicos do mesêntero de lagartas de *S. frugiperda* nos diferentes intervalos de tempo. (A) Mesêntero: lúmen (asterisco) com material digerido e membrana peritrófica (ponta de seta). Barra 50 μ m. H-E. (B) Mesêntero: tecido muscular disposto em duas camadas: uma longitudinal externamente (seta curta) e outra mais interna circular (asterisco). Observa-se também atividade de secreção de natureza mucosa (seta longa), no lúmen do mesêntero. Barra 25 μ m. Tricrômico de Mallory. (C) Mesêntero: tecido epitelial simples colunar apresentando células regenerativas (CR), colunares (CC) e globosas (CG). Barra 10 μ m. H-E. (D) Observa-se ainda, intensa atividade de secreção (setas). Barra 25 μ m. P.A.S.

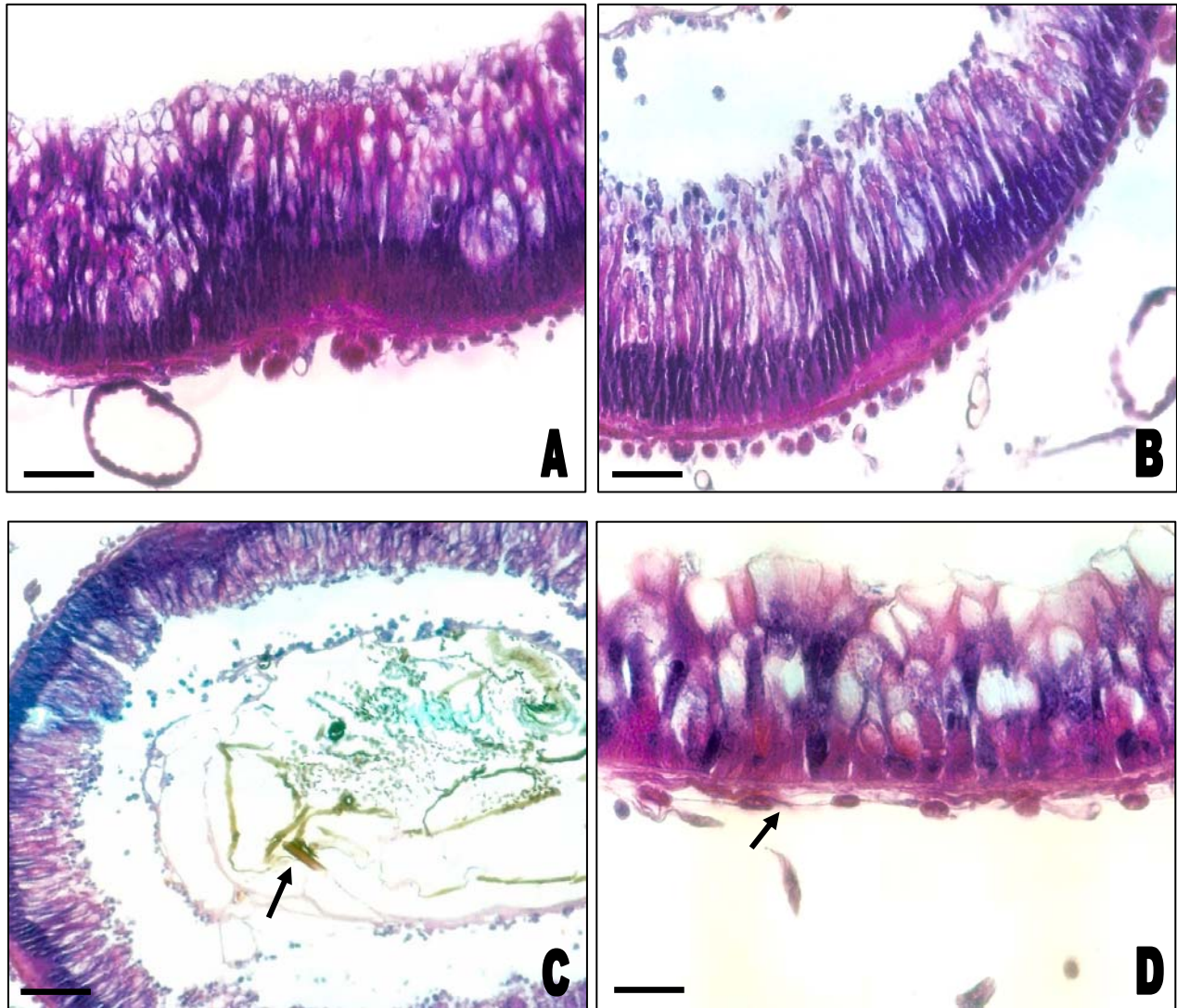


Figura 3. Cortes histológicos do mesêntero de lagartas de *S. frugiperda*: (A) e (B) Mesêntero de lagartas tratadas com nim a 0,5% e 1,0%, respectivamente, no intervalo de tempo de 48h: observar redução na atividade secretora. Barra 50 μ m. (C) Mesêntero de lagarta tratada com nim a 1,0% no intervalo de tempo de 48h: observar alimento não digerido no lúmen (seta). Barra 100 μ m. (D) Mesêntero de lagarta tratada com nim a 1,0% no intervalo de tempo de 96h: observar a degeneração da musculatura (seta). Barra 25 μ m. Coloração H-E.

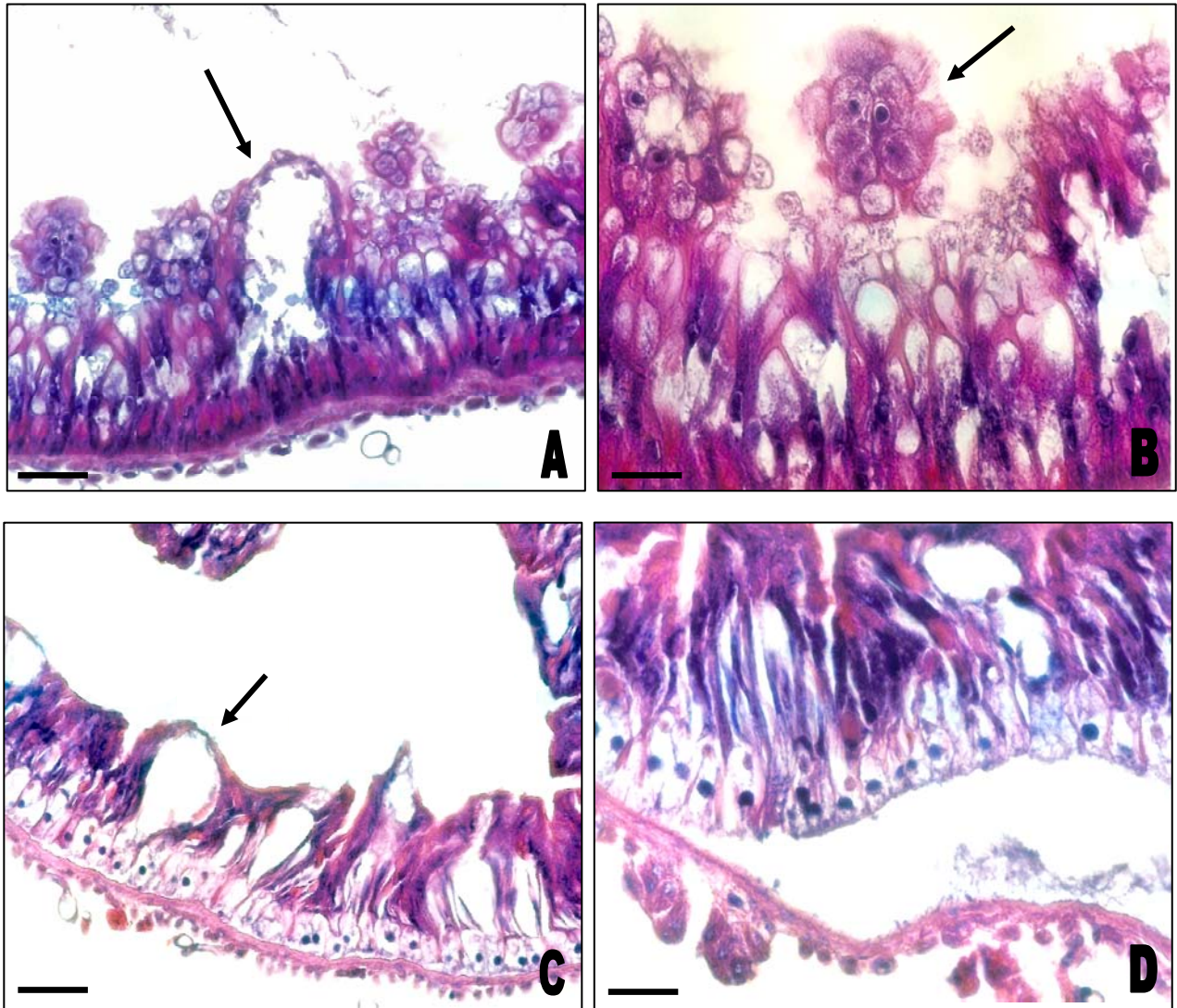


Figura 4. Cortes histológicos do mesêntero de lagartas de *S. frugiperda*: (A) Observar projeção do epitélio (seta) para o lúmen na concentração de nim a 1,0% no intervalo de tempo de 96h. Barra 50 μ m. (B) Observar, ainda, liberação das células epiteliais junto com o produto de secreção (seta). Barra 25 μ m. (C) Projeção do tecido epitelial (seta) em lagarta tratada com nim na concentração 0,5%, intervalo de tempo de 144h. Barra 50 μ m. (D) Observar afastamento do tecido epitelial da camada muscular em lagarta tratada com nim a 0,5% no intervalo de tempo de 144h. Barra 25 μ m. Coloração H-E.

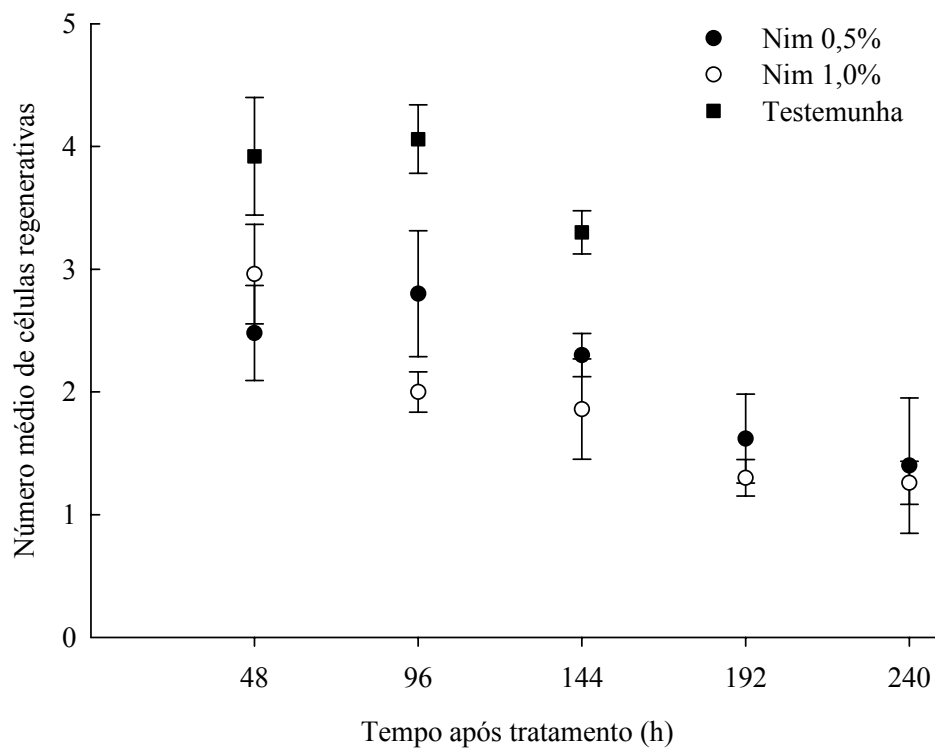


Figura 5. Número médio (\pm EP) de células regenerativas da região mediana do mesêntero de lagartas de *S. frugiperda*, a partir do terceiro ínstar, não tratadas (\hat{y} = média = $3,76 \pm 0,31$) e tratadas com nim a 0,5% ($\hat{y} = 3,122 - 0,007x$; $F = 6,77$; $P = 0,0160$; $R^2 = 0,23$) e nim a 1,0% ($\hat{y} = 3,106 - 0,008x$; $F = 20,79$; $P < 0,0001$; $R^2 = 0,47$).