

EFEITOS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.

SOBRE PARÂMETROS BIOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DE *Diatraea saccharalis* F.

(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

MARCO AURÉLIO PAES DE OLIVEIRA

(Sob Orientação do Professor Edmilson Jacinto Marques)

RESUMO

A broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* F. é considerada uma das principais pragas nas Américas, sendo responsável por danos diretos e indiretos a esta cultura. A utilização de entomopatógenos para o controle de pragas tem se intensificado bastante nas últimas décadas, sendo os fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizim anisopliae* (Metch.) Sorok. os mais utilizados. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos destes fungos, em diferentes concentrações, sobre parâmetros biológicos de *D. saccharalis* e analisar morfológica e quantitativamente os tipos de hemócitos desse inseto, em lagartas do terceiro ínstar, desafiados imunologicamente pelos fungos estudados, em concentrações diferentes. Foram avaliados período e viabilidade larval e pupal, fecundidade, viabilidade de ovos e longevidade de machos e fêmeas de *D. saccharalis*, pulverizando-se concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 conídios mL⁻¹ sobre lagartas do inseto. Com relação a *B. bassiana*, os resultados mostraram que para o período larval e pupal e viabilidade pupal não houve diferença. A viabilidade larval foi reduzida na concentração de 10^5 conídios mL⁻¹ (56,67%). A fecundidade, a viabilidade de ovos e a longevidade de machos e fêmeas foram afetadas, principalmente na concentração 10^5 conídios mL⁻¹, onde apresentaram médias de 237 ovos, 48,60 %, 2,17 e 2,50 dias, respectivamente. Para *M. anisopliae* foram observadas diferenças

em relação viabilidade larval (56,67%), período pupal (7,86 dias), viabilidade pupal (53,33%), viabilidade de ovos (52,34%) e longevidade de machos e fêmeas (2,17 e 2,50 dias), na concentração 10^5 conídios mL^{-1} . Os resultados referentes à análise dos hemócitos revelaram que as células mais freqüentes foram os esferulócitos, plasmócitos e granulócitos, com percentuais de 34,75%, 29,66% e 22,16%, respectivamente, enquanto que os hemócitos menos freqüentes foram os pró-hemócitos (8,33%), adipohemócitos (2,58%) e oenocitóides (2,41%). Após inoculação com o fungo *B. bassiana* verificou-se que diferenças só ocorreram para os granulócitos na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} (24 e 36h) e para os plasmócitos nas concentrações 10^5 conídios mL^{-1} (60h) e 10^7 conídios mL^{-1} (24 e 36h), onde houve um aumento dos granulócitos e declínio dos plasmócitos na maior concentração, e aumento dos plasmócitos na concentração 10^5 conídios/ mL^{-1} . *M. anisopliae* não interferiu nos granulócitos e plasmócitos. No que se refere aos esferulócitos verificou-se uma maior tendência de redução dessas células no intervalo de 36h para ambos os fungos, porém diferença significativa só ocorreu na concentração de 10^5 conídios/ mL^{-1} no intervalo de 60h resultando na menor média para esse tipo de hemócito quando desafiados pelo *M. anisopliae*. Os resultados obtidos indicaram que *B. bassiana* e *M. anisopliae*, mesmo sendo utilizados em baixas concentrações, têm potencial para serem utilizados em programas de controle, visto que, os mesmos afetaram negativamente parâmetros biológicos imprescindíveis ao ciclo de *D. saccharalis*.

PALAVRAS-CHAVE: *Diatraea saccharalis*, biologia, fungos entomopatogênicos

EFFECTS OF *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. AND *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)

Sorok. ON BIOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF *Diatraea*

saccharalis F. (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

MARCO AURÉLIO PAES DE OLIVEIRA

(Sob Orientação do Professor Edmilson Jacinto Marques)

ABSTRACT

The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* F. is considered one of the main pests in America, being responsible for direct and indirect damages to this culture. The use of entomopathogenic fungi for the control of pests has been a lot intensified in the last decades, and the fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok were the most used. The objective of this research was to analyze the effects of these fungi, in different concentrations, on biological parameters of *D. saccharalis* and to analyze morphologically and quantitatively the types of hemocytes of that insect, on larvae of the 3th instar, challenged immunologically by the studied fungi, in different concentrations. It was analyzed period and viability larval and pupal, fecundity, viability of eggs and longevity of males and females of *D. saccharalis*, being sprayed concentrations of 10^3 , 10^4 , 10^5 conidia mL^{-1} on larvae. In relation to *B. bassiana*, the results showed that there was no difference for the larval and pupal period and pupal viability. The larval viability was reduced in the concentration of 10^5 conidia mL^{-1} (56.6%). the fecundity, the viability of eggs and the longevity of males and females were affected, mainly in the concentration 10^5 conidia mL^{-1} , where they presented averages of 237 eggs, 48.60%, 2.17 and 2.50 days, respectively. For *M. anisopliae* differences were observed in relation larval viability (56.67%), pupal period (7.86

days), pupal viability (53.33%), viability of eggs (52.34%) and longevity of males and females (2.17 and 2.50 days), in the concentration 10^5 conidia mL^{-1} . The results relating to the analysis of the hemocytes revealed that the most frequent cells were the spherulocytes, plasmatocytes and granulocytes, with rates of 34.75%, 29.66% and 22.16%, respectively, while the least frequent hemocytes were the prohemocytes (8.33%), adipohemocytes (2.58%) and oenocytoids (2.41%). After inoculation with the fungus *B. bassiana* it was verified that differences happened only to the granulocytes in the concentration of 10^7 conídios mL^{-1} (24 and 36h) and to the plasmatocytes in the concentrations 10^5 conidia mL^{-1} (60h) and 10^7 conidia mL^{-1} (24 and 36h), where there was an increase of the granulocytes and a decrease of the plamatocytes in the largest concentration, and an increase of the plasmatocytes in the concentration 10^5 conidia/ mL^{-1} . *M. anisopliae* didn't interfere in the granulocytes and plasmatocytes. Relating to the spherulocytes a larger tendency to reduction of those cells was verified at an interval of 36h for both fungi. However a significant difference only happened in the concentration of 10^5 conidia/ mL^{-1} at an interval of 60h resulting in the smallest average for that type of hemocyte when challenged by the *M. anisopliae*. The obtained results indicated that *B. bassiana* and *M. anisopliae*, even being used in low concentrations, they have potential to be used in programs of control, considering that the same ones affected negatively indispensable biological parameters to the cycle of *D. saccharalis*.

KEY WORD: *Diatraea saccharalis*, biology, entomopathogenic fungi

EFEITOS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.
SOBRE PARÂMETROS BIOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DE *Diatraea saccharalis* F.
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Por

MARCO AURÉLIO PAES DE OLIVEIRA

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

Julho - 2006

EFEITOS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.
SOBRE PARÂMETROS BIOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DE *Diatraea saccharalis* F.
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Por

MARCO AURÉLIO PAES DE OLIVEIRA

Orientador: _____
Edmilson Jacinto Marques (UFRPE)

Examinadores: _____
Antônio F. de Sousa Leão Veiga (UFRPE)

Maria Menezes (UFRPE)

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (UFRPE)

Aos meus pais Mário Alberto e Terezinha,
que sempre me incentivaram e apoiaram
em todos os momentos de minha vida.

DEDICO

À minha filha Camila, a minha esposa Auristela,
aos meus irmãos Marinho, Cristiana e Susana e aos
meus avós Firmino Oliveira e Beatriz (*in memoriam*).

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de renascer e pela energia que sempre me dispensou para vencer os obstáculos e olhar a vida de frente, para ver o quanto é bela.

Aos meus pais Mário Alberto e Terezinha, que sempre serviram de exemplo para minha vida e por terem me ensinado e mostrado o valor de uma família unida. Serei eternamente grato.

A minha filha Camila, por seu amor e pela compreensão nos momentos difíceis que enfrentei.

Aos meus irmãos Marinho, Cristiana e Susana, por sermos irmão na forma mais íntima que a palavra possa expressar.

A vovô Oliveira e a vovó Beatriz (*in memoriam*) por todo carinho que me deram e pelo significado de família que semearam em cada membro da família.

A minha esposa Auristela, que como o próprio nome sugere (estrela de ouro), está sempre ao meu lado com muita luz, com muita dedicação, cumplicidade, incentivo e amor.

A minha tia Teresa (mulher de fibra), por toda ajuda, pelo carinho e pelo amor que sempre demonstrou por mim.

A Amanda e Anderson pelo incentivo e compreensão nos momentos difíceis.

A toda minha família pelo prazer de estarmos sempre juntos e por terem me agüentado até hoje.

Ao meu amigo Ricardo Lopes, por toda força que me deu num dos momentos mais difíceis de minha vida e a quem hoje tenho como um irmão.

As minhas amigas Laurici Pires e Suêrda Jácome, que além da amizade, da boa convivência e da alegria de estarmos juntos, contribuíram bastante para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A Franklin Magliano, mais um amigo que surgiu em meu caminho e que sempre se mostrou disposto a colaborar profissionalmente e espiritualmente.

A Cinthia Matias por sua colaboração no transcorrer dessa pesquisa.

A todos os colegas de laboratório que de alguma forma participaram dos experimentos.

A todos os meus colegas de turma, pelos bons momentos que passamos juntos e pela interação que nos foi proporcionada pelo curso.

Ao professor Severino Mendes de Azevedo Júnior, por sua amizade, compreensão, visão profissional e pela oportunidade a mim conferida.

Ao professor José Espinhara (*in memoriam*), por todo o estímulo e oportunidade que me deu.

Aos professores Antônio F. de Souza Leão Veiga e Argus Vasconcelos de Almeida pela contribuição que ambos proporcionaram para o meu crescimento profissional.

Ao professor e Marcos Souto Alves pela amizade e por sempre ter me incentivado a buscar novos horizontes no âmbito profissional.

Aos colegas de trabalho Pedro Monteiro Correia e Luci Duarte da Rosa Borges Régis, pela amizade e pelas grandes jornadas que já vivemos juntos e por muitas que ainda vamos passar.

Ao professor Edmilson J. Marques, pela orientação e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

A professora Valéria Wanderley Teixeira e professor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira pela amizade construída, dedicação, simplicidade e valiosa orientação, que contribuirão para o meu desenvolvimento profissional.

Ao professor Reginaldo Barros, pela contribuição e ensinamentos para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao professor Jorge Braz Torres e Sami Jorge Michereffi, pela consultoria estatística.

Aos pesquisadores Fábio André Brayner dos Santos e Luiz Carlos Alves do Centro de Pesquisa Ageu Magalhães pela grande colaboração para a realização dessa pesquisa.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação pela realização deste curso.

A todos os professores do curso que deram sua contribuição para o nosso desenvolvimento com relação à pesquisa.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização dessa pesquisa.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	viii
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
LITERATURA CITADA.....	07
2 EFEITOS DE <i>Beauveria bassiana</i> (BALS.) VUILL. E <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCH.) SOROK. SOBRE PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE <i>Diatraea</i> <i>saccharalis</i> F. (LEPIDOPTERA:CRAMBIDAE)	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
LITERATURA CITADA.....	24
3 TIPOS E CONTAGEM DIFERENCIAL DOS HEMÓCITOS EM <i>Diatraea</i> <i>saccharalis</i> F. (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) DESAFIADOS IMUNOLOGICAMENTE PELOS FUNGOS <i>Beauveria bassiana</i> (BALS.) VUILL. E <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCH.) SOROK. EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	30
RESUMO	31

ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
AGRADECIMENTOS.....	39
LITERATURA CITADA.....	40

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar *Saccharum officinarum* L. é uma monocotiledônia perene, herbácea, da família Gramineae, própria de climas tropicais e subtropicais, originária do sudeste da Ásia. Esta cultura foi introduzida no Brasil em 1502, sendo, em nosso país, considerada de grande importância no âmbito sócio-econômico, devido à sua matéria prima na produção de alimento, ração animal, adubos orgânicos, além de favorecer a mão de obra e a geração de divisas como a exportação de açúcar e cachaça. É também uma alternativa para o consumo automotivo reduzindo, dessa forma, a importação de petróleo (Mendonça 1996, Cesnik & Miocque 2004).

Dentre os países produtores de cana-de-açúcar, o Brasil desponta como um dos maiores, com uma produção de aproximadamente 440.000.000 t para a safra 2005/2006 e um rendimento em torno de 74 t/ha (ÚNICA 2006). Ocupa uma área de 5,2 milhões de hectares, sendo São Paulo o detentor da maior parcela da produção nacional de álcool e açúcar, e na região Nordeste, Alagoas e Pernambuco os maiores produtores (Mendonça 1996).

Um dos grandes problemas enfrentados por essa cultura está no fato de ser vulnerável, durante todo o seu desenvolvimento, ao ataque da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* F., onde normalmente sua incidência é menor quando a cana é ainda jovem e não apresenta entrenós formados, aumentando consideravelmente a sua pressão com o desenvolvimento da planta (Macedo & Botelho 1988).

Considerada uma das principais pragas da cana-de-açúcar nas Américas, as lagartas de *D. saccharalis* provocam danos diretos devido ao hábito de perfurar a cana jovem, causando a

morte da gema apical, enquanto que na fase da cana adulta, provoca brotações laterais, enraizamento aéreo, além da atrofia de entrenós e canas quebradas, reduzindo-se, dessa forma, a produção de cana e, conseqüentemente, do açúcar (Mendonça 1996). Os danos indiretos são causados por microorganismos, geralmente fungos (*Fusarium moniliforme* Sheldon e *Colletotrichum falcatum* Went), que invadindo o entrenó, através do orifício aberto pela lagarta, provocam a inversão de sacarose, resultando em perdas, pelo consumo de energia no metabolismo de inversão e pelo fato de os açúcares, resultantes desse desdobramento, não se cristalizarem no processo industrial (Botelho & Macedo 2002).

O manejo integrado apresenta-se, pois, como método bastante utilizado e recomendado para o controle dessa broca, que se baseia principalmente no método biológico, com a preservação e multiplicação de inimigos naturais (Almeida *et al.* 1988).

Para Macedo & Botelho (1988), as lagartas de *D. saccharalis* logo após a sua eclosão, estão sujeitas à ação de parasitóides, predadores e entomopatógenos que agem principalmente até a penetração destas no entrenó, e mesmo após estarem no interior da cana, continuam susceptíveis e o controle natural nesta fase ocorre em torno de 20%.

Os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. são mundialmente conhecidos e utilizados como agentes de controle biológico para diversas pragas agrícolas de expressão econômica. Um exemplo de aplicabilidade desses entomopatógenos no Manejo Integrado de Pragas, foi o programa de controle biológico da cigarrinha da folha da cana-de-açúcar *Mahanarva posticata* (Stal.) através da utilização de *M. anisopliae* no Estado de Pernambuco, desde 1970. Segundo Marques (1992), foram produzidos pelo Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA)/PLANALSUCAR, 38.000 Kg de conídios desse fungo para aplicação em uma área de 474.000 ha de cana-de-açúcar infestada por *M. posticata*.

O potencial do uso de isolados de *M. anisopliae*, testado por Sosa-Gómez & Alves (1983) foi utilizado no controle microbiano de insetos, considerando-se como principais caracteres não só a produção de conídios em meio artificial, a sua virulência, e sua resistência à radiação ultravioleta, mas também a sua produção sobre cadáveres de *D. saccharalis*.

As lagartas da broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis*, quando submetidas a um elevado potencial de inóculo de *B. bassiana*, sob temperatura média de 25° C e UR 90% após 48 horas, reduzem a sua alimentação, parando o processo após 72 horas. Em geral, 96 horas depois da inoculação ocorre 100% de mortalidade e o fungo passa a crescer saprofiticamente (Alves 1998).

De acordo com Alves & Pereira (1998) esses fungos causam distúrbios fisiológicos que atingem o tegumento, os sistemas circulatório, reprodutor, respiratório, nervoso e digestivo dos insetos atacados. Por serem considerados de largo espectro, podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, desde o ovo até a fase adulta, uma característica desejável e muito peculiar desse grupo.

A infecção ocorre normalmente via tegumento, onde o fungo germina entre 12 e 18 horas, o que depende da presença de nutrientes, como glucose, quitina, nitrogênio, etc. A penetração tegumentar ocorre devido a uma ação mecânica e química, levando cerca de 12 horas. Decorridas 72 horas da inoculação, o inseto apresenta-se totalmente colonizado, pois o tecido gorduroso acha-se bastante atacado, passando, em seguida, ao tecido intestinal e os tubos de Malpighi, etc., advindo a morte em função da falta de nutrientes e do acúmulo de substâncias tóxicas. Sobre o cadáver ocorre a formação de grande quantidade de conidióforos e conídios característicos da espécie. Os insetos atacados por *M. anisopliae* tornam-se rígidos e cobertos por uma camada pulverulenta de conídios. No final da conidiogênese, o cadáver pode mostrar tons de verde que variam de claro a escuro, acinzentados ou ainda embranquecidos com pontos verdes. Essa

doença é conhecida como muscardine verde, contrastando com a muscardine branca provocada por *B. bassiana* (Alves 1998).

Sendo responsáveis por epizootias, os fungos quando estão no ambiente, apresentam alta taxa de crescimento, produção elevada e capacidade de sobrevivência de unidades infectivas. Já no hospedeiro, são capazes de resistir às barreiras físico-químicas impostas pelo tegumento e hemolinfa levando o inseto a morte (Fuxa 1987).

O uso desses fungos no controle de pragas é de grande viabilidade, uma vez que, mesmo sendo utilizados em altas concentrações não ocasionam desequilíbrios biológicos de importância nos ecossistemas, pois ao contrário dos inseticidas químicos de largo espectro, conseguem manter as populações de parasitóides, predadores e polinizadores presentes nesses ambientes, colocando-se como um importante fator no Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Pereira *et al.* 1998, Neves *et al.* 2001).

Noma & Strickler (2000) pesquisaram os efeitos da infecção de *B. bassiana* sobre *Lygus hesperus* (Knight) através de observações da oviposição. Foram testadas três concentrações, a saber: $1,34 \times 10^7$, $1,92 \times 10^6$ e $1,10 \times 10^5$ conídios mL^{-1} e duas condições de temperatura (25° e 35° C). Os percevejos inoculados com *B. bassiana*, independente da temperatura, tiveram redução média da oviposição de 19%.

Mulock & Chandler (2001) avaliaram os efeitos de *B. bassiana* na concentração 5×10^7 conídios/ mL^{-1} , sobre *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte, através de observações do potencial reprodutivo de fêmeas sobreviventes após a inoculação do fungo, viabilidade e produção de ovos. Observaram que as fêmeas sobreviventes, dez dias após a emergência, tiveram uma média de produção de ovos, 30% inferior quando comparadas àquelas não tratadas com o fungo. A capacidade reprodutiva total (média do número de ovos/fêmea) foi significativamente

mais baixa nos insetos submetidos ao tratamento fúngico. Os insetos tratados, cinco dias após a emergência apresentaram grande redução na produção total de ovos, quando comparados aos insetos tratados aos 10 e 15 dias após a emergência.

Hornbostel *et al.* (2004) analisaram os efeitos subletais de *M. anisopliae* sobre *Ixodes scapularis* Say e constataram que esse fungo aplicado na concentração 10^8 conídios mL⁻¹ reduziu a fecundidade e a massa corpórea de todos os estágios ativos do carrapato. Os autores discutem que esse impacto na fecundidade pode ser maior do que aquele sugerido pela mortalidade causada pelo fungo devido às conseqüências no potencial reprodutivo das gerações seguintes.

Os efeitos de *B. bassiana* e *M. anisopliae* na mortalidade, fecundidade e fertilidade de *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard foram avaliados por Wekesa *et al.* (2006). Os autores verificaram que adultos e deutoninfas foram mais suscetíveis aos fungos do que larvas e protoninfas. Observaram ainda que todas as concentrações testadas ($3,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ e 1×10^8 conídios mL⁻¹) interferiram na fecundidade das fêmeas, quando comparadas com a testemunha, mas os resultados entre as concentrações, não diferiram entre si, indicando que, mesmo na concentração mais baixa, a fecundidade foi afetada.

Falleiros & Gregório (1995) estudando as células sanguíneas de *D. saccharalis*, discutem que os hemócitos desempenham papéis de grande importância para a vida desses organismos. Tais células assemelham-se aos leucócitos dos vertebrados, são uma mistura de tipos de células apresentando diferentes morfologias e funções biológicas, como a capacidade de diferenciar e atuar sobre agentes estranhos através de fagocitose, citotoxinas, encapsulação, cicatrização de ferimentos e coagulação. Tais reações de defesa têm sido freqüentemente observadas contra corpos estranhos que invadem a hemocele, como os patógenos e parasitóides, dentre outros (Hung & Boucias 1996, Falleiros *et al.* 2003).

Através da microscopia eletrônica e de luz, Vestergaard *et al.* (1998) estudaram a infecção do tripses *Frankliniella occidentalis* (Pergande) por *M. anisopliae*, verificando a presença de corpos hifais desse fungo dentro do abdome e do tórax do inseto após 3 dias de inoculação. Alguns deles foram mortos neste estágio pela infecção, embora tenham apresentado poucas estruturas do fungo inoculado. Só após o 6º dia, numerosos corpos hifais foram observados na hemocele, indicando evidentes danos nos tecidos do inseto.

Já Quesada-Moranga & Vey (2004) em seu estudo sobre o efeito da proteína tóxica Bassiacridin, secretada por *B. bassiana*, em ninfas do 4º instar de *Locusta migratoria* L. observaram que essa proteína provoca, além da melanização, alterações das estruturas das células epiteliais da traquéia, dos sacos aéreos e também do tegumento.

A caracterização e a purificação de peptídios antimicrobianos produzidos em resposta a infecções causadas por fungos em várias espécies de insetos têm proporcionado novos conhecimentos a respeito da organização e da regulação do sistema imunológico dos insetos. Estudos mostram que os insetos possuem um sistema de reconhecimento de patógenos capaz de ativar um complexo de moléculas sinalizadoras e de coordenar a expressão de vários genes, sendo essas informações muito importantes para as perspectivas de controle biológico (Franc & White 2000).

Para se defender de seus inimigos naturais, os insetos desenvolveram uma série de mecanismos, tais como reações de reconhecimento, aglutinação, ativação de enzimas proteolíticas, que levam à coagulação da hemolinfa e à produção de melanina, reações celulares, síntese de peptídios antimicrobianos e inibidores de proteases (Wheeler *et al.* 1993, Wilson *et al.* 1999).

A partir desses estudos, a presente pesquisa teve como objetivos avaliar os efeitos dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre parâmetros biológicos e analisar morfológica e quantitativamente os tipos de hemócitos em lagartas do terceiro ínstar de *D. saccharalis*, antes e após a inoculação desses fungos em diferentes concentrações.

Literatura Citada

- Almeida, L.C., A.T.C.M. Precetti, P.K. Júnior, C.R. Furtado, L.M. Pinegone & M.M.M. Zambonato. 1988.** Avanços na produção massal da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* e seus parasitóides. Boletim Técnico Copersucar. 44: 14-21.
- Alves, S.B. 1998.** Fungos entomopatogênicos, p. 289- 381. In S.B. Alves. (ed.) Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B. & R. M. Pereira. 1998.** Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos, p. 39-54. In S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos Piracicaba, FEALQ, 1163.
- Cesnik, R. & J. Miocque. 2004.** Histórico, p. 23-30. In R. Cesnik & J. Miocque. Melhoramento da cana-de-açúcar. Brasília, EMBRAPA. 307p.
- Botelho, P.S.M. & N. Macedo. 2002.** *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*, p. 409-447. In J.R.P. Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento (eds.), Controle biológico no Brasil. 609p.
- Falleiros, A.M.F. & E.A. Gregório. 1995.** Hemócitos fagocitários em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). Rev. Bras. Zool. 12: 751-758.
- Falleiros, A.M.F., M.T.S. Bombonato & E.A. Gregório. 2003.** Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Brazil. Arch Biol. Technol. 46: 287-294.

- Franc, N.C. & K. White. 2000.** Innate recognition em insect immunity and development: new approaches in *Drosophila*. Special issue: Innate reconition systems in host defense. Microbes and Infection. 30: 243-250.
- Fuxa, J.R. 1987.** Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. Annu. Rev. Entomol. 32: 225-251.
- Hornbostel,V.L., R.S. Ostfeld, E. Ziiioua & M.A. Benjamin. 2004.** Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes sacpularis* (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 41: 922-929.
- Hung, S.Y. & D.G. Boucias. 1996.** Phenoloxidase activity in hemolymph of naïve and *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae. J. Invertebr. Pathol. 67: 35-40.
- Macedo, N. & P.S.M. Botelho. 1988.** Controle integrado da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Pyralidae), Brasil Açucareiro. 106: 1-12.
- Marques, E.J. 1992.** Controle microbiano de cigarrinhas (Homoptera: Cercopidae) com *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.: Eficiência e limitações. In Simpósio de Controle Biológico. Anais. 73-78.
- Mendonça, A.F. 1996.** Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, p. 3-48. In Mendonça, A.F. Pragas da cana-de-açúcar. 239p.
- Mulock, B.S. & L.D. Chandler. 2001.** Effect of *Beauveria bassiana* on the fecundity of western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). Biol. Control. 22: 16-21.
- Neves, P. M. O. J., E. Hirose, P.T. Tchujo & A. Moino Jr. 2001.** Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid inseticides. Neotrop. Entomol. 30: 263-268.

- Noma, T. & K. Strickler. 2000.** Effects of *Beauveria bassiana* on *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding and oviposition. *Environ. Entomol.* 29: 394-402.
- Pereira, R.M., S.B. Alves, D.R. Sosa-Gómez & N. Macedo. 1998.** Utilização de entomopatógenos no manejo integrado de pragas, p. 1097-1118. In S.B. Alves (ed.) Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Quesada-Moranga, E. & A. Vey. 2004.** Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.* 108:441-452.
- Sosa-Gómez, D.R. & S.B. Alves. 1983.** Caracterización do once aislamiento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. I. Estandarización, virulência y actividad enzimática. *CIRPON-Rev. Invest.* 1: 83-101.
- ÚNICA. 2006.** União da agroindústria canavieira de São Paulo. Disponível em: <http://www.Unica.com.br>. Acesso em: 07/05/2006.
- Vestergaard, S., T.M. Butt, J. Bresciani, A. T. Gillespie & J. Eilenberg. 1998.** Light and electron microscopy studies of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 25-33.
- Wekesa, V.W., M. Knapp, N.K. Maniana & H.I. Boga. 2006.** Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. *J. Appl. Entomol.* 130: 155-159.
- Wheeler, M.B., G. Stuart & K.D. Hapner. 1993.** Agglutinin mediated opsonization of fungal blastospores in *Melanoplus differentialis* (Insecta). *J. Insect Physiol.* 39: 477-483.

Wilson, R., C. Chen & N.A. Ratcliffe. 1999. Innate immunity in insects – the role of multiple endogenous serum lectin in the recognition of foreign invaders in the cockroach *Blaberus discoidalis*. *J. Immunol.* 162: 1590-1596.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.
SOBRE PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *Diatraea saccharalis* F. (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE)

MARCO A.P. OLIVEIRA¹, EDMILSON J. MARQUES¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA² E
REGINALDO BARROS¹

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

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

¹Oliveira, M.A.P., E.J. Marques, V. Wanderley-Teixeira, R. Barros. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre parâmetros biológicos de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae) Neotropical Entomology.

RESUMO - A broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* F. é considerada uma das principais pragas nas Américas. A utilização de entomopatógenos para o controle de pragas tem se intensificado, sendo os fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. os mais utilizados. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos destes fungos, em diferentes concentrações, sobre parâmetros biológicos da broca da cana-de-açúcar. Foram avaliados período e viabilidade larval e pupal, fecundidade, viabilidade de ovos e longevidade de machos e fêmeas de *D. saccharalis*, após a pulverização dos fungos nas concentrações de 10^3 , 10^4 e 10^5 conídios mL^{-1} sobre lagartas do terceiro ínstar do inseto. Com relação a *B. bassiana*, a viabilidade larval foi reduzida significativamente na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} (56,67%). A fecundidade, a viabilidade de ovos e a longevidade de machos e fêmeas foram afetadas, principalmente quando tratadas pela concentração 10^5 conídios mL^{-1} , onde apresentaram médias de 237 ovos, 48,60 %, 2,17 e 2,50 dias, respectivamente. Para *M. anisopliae* não foram observadas diferenças significativas no período larval e na fecundidade. Em relação à viabilidade larval, período e viabilidade pupal, viabilidade de ovos e longevidade de machos e fêmeas, verificaram-se diferenças significativas, principalmente na concentração 10^5 conídios mL^{-1} , com médias de 56,67 %, 7,86 dias e 53,33 %, 52,34 %, 2,17 e 2,50 dias, respectivamente. Esses resultados indicam que *B. bassiana* e *M. anisopliae*, mesmo sendo usados em baixas concentrações, têm potencial para serem utilizados em programas de controle de *D. saccharalis*.

PALAVRAS-CHAVE: *Diatraea saccharalis*, biologia, fungos entomopatogênicos

EFFECTS OF *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. AND *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.
ON BIOLOGICAL PARAMETERS OF *Diatraea saccharalis* F. (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE)

ABSTRACT - The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* F. is considered one of the main pests in America, being responsible for the direct and indirect damages. The use of entomopathogenic fungi for the control of pests has been intensified in the last decades, and the fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. were the most used. This work analyzed the effects of these fungi, in different concentrations, on biological parameters of the sugarcane borer. Larval and pupal periods and viability, fecundity, viability of eggs and longevity of males and females of *D. saccharalis* were investigated. Third instar larvae were treated with 10^3 , 10^4 and 10^5 conidia mL⁻¹. Treated larvae with *B. bassiana* showed no differences for larval and pupal periods and pupal viability. The larval viability, however, was reduced in the concentration of 10^5 conidia mL⁻¹ (56.7%). The fecundity, the viability of eggs and the longevity of males and females were affected, mainly when treated with 10^5 conidia mL⁻¹, where they presented averages of 237 eggs, 48.6%, 2.17 and 2.50 days, respectively. For *M. anisopliae* significant differences were not observed in the larval period and in the fecundity. In relation to the larval viability, period and pupal viability, viability of eggs and longevity of males and females, significant differences were verified, mainly in the concentration 10^5 conidia mL⁻¹, with averages of 56.67%, 7.86 days and 53.33%, 52.34%, 2.17 and 2.50 days, respectively. The obtained results indicate that *B. bassiana* and *M. anisopliae*, even being used in low concentrations, they have potential to be used in programs of control, considering that the same ones affected negatively indispensable biological parameters to the cycle of *D. saccharalis*.

KEY WORDS: *Diatraea saccharalis*, biology, entomopathogenic fungi

Introdução

A cana-de-açúcar *Saccharum officinarum* L. é uma gramínea própria de climas tropicais e subtropicais, originária do sudeste da Ásia. Introduzida no Brasil em 1502, é considerada de grande importância no âmbito sócio-econômico, devido à sua matéria prima para produção de alimento e ração animal, bem como uma das alternativas para o consumo automotivo, propiciando redução na importação de petróleo. (Mendonça 1996).

Com uma produção de aproximadamente 440.000.000 t para a safra 2005/2006, São Paulo destaca-se com a maior produção nacional de álcool e açúcar, sendo no Nordeste, Alagoas e Pernambuco os maiores produtores (ÚNICA 2006). Entretanto, os problemas fitossanitários têm se constituído como um dos principais fatores limitantes para a redução da produção agrícola e do rendimento industrial, sendo a broca *Diatraea saccharalis* F. uma das principais pragas responsáveis por essas perdas econômicas (Almeida *et al.* 1988).

Considerada uma das principais pragas da cana-de-açúcar nas Américas, as lagartas de *D. saccharalis* provocam danos diretos devido ao hábito de perfurar a cana nova, causando a morte da gema apical, já na cana adulta, provoca brotação lateral, enraizamento aéreo, atrofia de entrenós e canas quebradas, reduzindo a quantidade de cana e açúcar (Mendonça 1996). Os danos indiretos são causados pela penetração de microorganismos, geralmente fungos (*Fusarium moniliforme* Sheldon e *Colletotrichum falcatum* Went) através dos orifícios deixados pelas lagartas (Botelho & Macedo 2002).

Nas últimas décadas o controle microbiano tem se intensificado principalmente na área agrícola, em decorrência do uso indiscriminado e dos sérios danos que os inseticidas químicos têm causado aos ecossistemas. Além disso, a utilização de agentes entomopatogênicos tem demonstrado vantagens com relação aos pesticidas químicos, quando observados critérios como:

eficácia, baixo custo, redução de resíduos químicos nos alimentos e no meio ambiente, preservação dos inimigos naturais e aumento da biodiversidade nos ecossistemas, bem como na segurança do homem e de outros organismos (Alves 1998a, Lacey *et al.* 2001).

Dentre os fungos entomopatogênicos mais utilizados em controle de pragas estão *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., devido à ampla distribuição geográfica, à variedade de hospedeiros e ocorrências de ambos em condições naturais, enzoóticas ou epizoóticas (Alves 1998b).

A suscetibilidade dos estágios de desenvolvimento de *Megalurothrips sjostedti* (Trybom) a *M. anisopliae*, bem como os efeitos da infecção causada pelo fungo na alimentação, fecundidade do adulto, fertilidade dos ovos e longevidade foram estudadas em condições de laboratório por Ekesi & Maniania (2000). Foram testadas as concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios mL⁻¹ e foi verificado que todas elas afetaram a fecundidade, a fertilidade dos ovos e a longevidade dos adultos sobreviventes da infecção, com reduções significativas. A fertilidade foi de 48%, 46% e 30% para as três concentrações, respectivamente, enquanto que a testemunha teve um percentual de 72%, diferindo dos três tratamentos, sendo a concentração 10^8 conídios mL⁻¹, a que mais afetou esse parâmetro biológico.

Pesquisas realizadas por Alves *et al.* (2002) sobre os efeitos da fase leveduriforme de *B. bassiana* e sua patogenicidade contra *D. saccharalis* e *Tetranychus urticae* mostraram que, para *Tetranychus urticae* não ocorreu uma maior virulência das estruturas leveduriformes como observado para *D. saccharalis*, mas indicaram que essas células podem ser efetivas como inóculo para aplicações de *B. bassiana* contra diferentes artrópodos. A mais alta atividade das células leveduriformes contra *D. saccharalis* deve ter sido devido à melhor adesão e penetração dessas células através da cutícula da lagarta.

N'Doye (1976) observou que a fertilidade de fêmeas de *Chilo suppressalis* Walker sobreviventes de infecção por *B. bassiana* foi reduzida. Nnakumusana (1985) relatou que infecções por *Aspergillus* reduziram acentuadamente a longevidade, fecundidade e fertilidade dos ovos de *Anopheles gambiae*, *Culex fatigans* e *Aedes aegypti* em graus que dependem do instar larval em que estes foram infectados.

Noma & Strickler (2000) pesquisaram os efeitos da infecção de *B. bassiana* sobre *Lygus hesperus* (Knight) através de observações da oviposição. Foram testadas três concentrações, a saber: $1,34 \times 10^7$, $1,92 \times 10^6$ e $1,10 \times 10^5$ conídios mL⁻¹ e duas condições de temperatura (25° e 35° C). Os percevejos inoculados com *B. bassiana*, independente da temperatura, tiveram redução média da oviposição de 19%.

Mulock & Chandler (2001) avaliaram os efeitos de *B. bassiana* na concentração de 5×10^7 conídios mL⁻¹, sobre *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, no potencial reprodutivo, viabilidade de fêmeas sobreviventes e produção de ovos. Observaram que as fêmeas, dez dias após a emergência, tiveram uma média de produção de ovos, 30% inferior quando comparadas àquelas não tratadas. A capacidade reprodutiva total (média do número de ovos/fêmea) foi significativamente mais baixa nos insetos submetidos ao tratamento fúngico. Os insetos tratados com o fungo, cinco dias após a emergência apresentaram grande redução na produção total de ovos, quando comparados aos insetos tratados aos 10 e 15 dias após a emergência.

França (2004) analisando a reprodução do percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas), alimentados com lagartas do 3° instar de *Alabama argillacea* (Hueb.) contaminadas com *B. bassiana* e *M. anisopliae*, observou que houve uma redução significativa com relação à sua fertilidade, com médias de 196,5 e 191,8 ovos por/fêmea, respectivamente, comparadas à testemunha que foi de 427,0 ovos/fêmea.

Hornbostel *et al.* (2004) analisaram os efeitos subletais de *M. anisopliae* sobre *Ixodes scapularis* Say e constataram que o fungo aplicado na concentração 10^8 conídios mL^{-1} reduziu a fecundidade e a massa corpórea de todos os estágios ativos do carrapato. Os autores discutem que, além da mortalidade causada pelo fungo, o impacto na fecundidade pode ser igualmente importante devido às conseqüências negativas no potencial reprodutivo das gerações futuras.

Estudos foram realizados para avaliar os efeitos letais e subletais de *Brevibacillus laterosporus* (Laubach) em *Musca domestica* (L.). Foram observados o aumento do tempo de desenvolvimento das larvas e a redução do peso das pupas. Adultos sobreviventes que foram alimentados com dieta subletal (contendo baixas concentrações de esporos) mostraram redução significativa na fecundidade e longevidade. A maior taxa de fecundidade foi observada no controle (280 ovos) e a menor no tratamento ($1,7 \times 10^8$ esporos) que foi de 11 ovos. Verificou-se que larvas alimentadas com dietas contendo concentrações subletais de *B. laterosporus*, tiveram o ciclo alongado e produziram moscas de tamanhos menores e com baixa fecundidade (Ruiu *et al.* 2006).

Os efeitos de *B. bassiana* e *M. anisopliae* na mortalidade, fecundidade e fertilidade de *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard foram avaliados por Wekesa *et al.* (2006). Os autores verificaram que adultos e deutoninfas foram mais suscetíveis aos fungos do que larvas e protoninfas. Observaram ainda que todas as concentrações testadas ($3,0 \times 10^6$; $1,0 \times 10^7$ e 1×10^8 conídios mL^{-1}) interferiram na fecundidade das fêmeas, quando comparadas com a testemunha, mas os resultados entre as concentrações, não diferiram entre si.

Os patógenos geralmente induzem reduções notáveis na fecundidade e/ou fertilidade dos adultos sobreviventes, contudo, muitos dos trabalhos referem-se a viroses, sendo limitadas as

informações sobre efeitos secundários ou subletais de infecções por fungos (Bullock *et al.* 1970, Simmons & Sikorowski 1973, Perelle & Harper 1986, Santiago-Alvarez & Vargas Osuna 1988).

Dessa forma, a presente pesquisa objetivou avaliar os efeitos dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em diferentes concentrações sobre o período e viabilidade larval e pupal, fecundidade, viabilidade de ovos e longevidade de machos e fêmeas de *D. saccharalis*.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Patologia de Insetos da Área de Fitossanidade, do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em Recife, PE.

Obtenção dos Insetos: As lagartas do 3º instar de *D. saccharalis* foram obtidas da criação do laboratório de Controle Biológico da Área de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da UFRPE, e mantidas sob dieta artificial modificada de Hansley & Hammond (1968), que consiste basicamente de solução vitaminada, sais de Wesson, açúcar, farelo de soja, germe de trigo, ácido ascórbico e água.

Obtenção dos Isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*: Foram utilizados os isolados ESALQ 447 de *B. bassiana* e E9 de *M. anisopliae*, provenientes da micoteca do referido laboratório, onde são mantidos a uma temperatura de $6 \pm 2^\circ\text{C}$ em tubos de vidro com meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar mais o antibiótico sulfato de estreptomicina (BDA+A) e óleo Nujol. As suspensões foram preparadas a partir de placas Petri contendo meio de cultura com os fungos entomopatogênicos, adicionando-se 20 mL de água destilada esterilizada para *B. bassiana* e 15mL para *M. anisopliae* acrescido de espalhante adesivo Tween 80 a 0,01% (ADE+E), sendo

filtradas em gaze esterilizada e as concentrações para ambos os isolados foram ajustadas em 10^3 , 10^4 e 10^5 conídios mL^{-1} , mediante o uso da câmara de Neubauer. A viabilidade de conídios foi determinada por meio de plaqueamento em BDA + A, após 24h, em estufa incubadora B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase, fazendo-se a contagem de conídios germinados e não germinados em microscópios ópticos de luz, segundo metodologia descrita por Alves & Moraes (1998).

Avaliação de Parâmetros Biológicos de *D. saccharalis*: Foram avaliados período e viabilidade larval e pupal, fecundidade, viabilidade de ovos e longevidade de machos e fêmeas.

Lagartas: Nesse experimento, em delineamento inteiramente casualizado, foram utilizados quatro tratamentos com cinco repetições com 10 lagartas cada, as quais foram pulverizadas com as concentrações fúngicas de 10^3 , 10^4 e 10^5 conídios mL^{-1} e a testemunha com água destilada esterilizada acrescido de espalhante adesivo Tween 80 a 0,01%. Em seguida, as lagartas foram acondicionadas em uma bandeja plástica com compartimentos, contendo colmo de milho como substrato alimentar, totalizando 50 insetos por tratamento. A inoculação deu-se através da pulverização com o auxílio de um microatomizador de marca Paasche “VL”, sendo utilizado 1 mL da suspensão por tratamento. As observações foram realizadas diariamente, colocando-se as lagartas mortas em placas Petri para confirmação do agente causal.

Pupas: Estas foram acondicionadas em caixas plásticas com algodão hidrófilo umedecido, forradas com papel filtro, protegidas com tampa telada, para o devido acompanhamento desta fase e verificação do percentual de emergência.

O experimento para observações de lagartas e pupas foi mantido em condições de laboratório e a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e $70 \pm 5\%$ UR e 12 horas de fotofase.

Adultos: Foram utilizados 48 casais de *D. saccharalis*, provenientes dos tratamentos anteriores, sendo 6 para cada tratamento, a saber: testemunha, 10^3 , 10^4 e 10^5 conídios mL^{-1} totalizando 24

casais para *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Esses foram individualizados em gaiolas, contendo um chumaço de algodão embebido com solução de mel a 10%, para sua alimentação, sendo, este, renovado a cada dois dias. As gaiolas foram confeccionadas com tubos de PVC medindo 20cm de diâmetro e 22cm de altura; a parte inferior foi vedada por uma placa de plástico transparente e na parte superior foi utilizado um tecido do tipo voil, preso por uma liga. A parte interna foi revestida com papel sulfite umedecido para obtenção dos ovos, os quais foram recolhidos diariamente a fim de verificar-se a quantidade de ovos. A análise da longevidade dos adultos foi realizada através de observações diárias até o final do ciclo da população experimental. Nesta fase do experimento os indivíduos foram mantidos a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 5\%$ de UR e 12 horas de fotofase.

Ovos: As massas de ovos obtidas no papel sulfite foram retiradas diariamente das gaiolas, a fim de passarem por processo de esterilização externa. Após esse procedimento, as posturas foram recortadas e acondicionadas em placas Petri revestidas internamente com papel filtro umedecido. Para determinação da fecundidade e da viabilidade de ovos de *D. saccharalis*, foram efetuadas, respectivamente, a contagem do número de ovos e de lagartas eclodidas diariamente em todas as posturas. O material foi acondicionado em BOD sob temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 5\%$ UR e 12 horas de fotofase.

Análise Estatística dos Dados Biológicos: os dados biológicos de *D. saccharalis* obtidos em condições de laboratório, foram analisados através da estatística não-paramétrica, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, sendo as médias comparadas pelo teste não-paramétrico de Comparações Múltiplas, ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

A ação patogênica de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em diferentes concentrações foi analisada sobre o período e viabilidade larval e pupal, fecundidade, viabilidade de ovos e longevidade de machos e fêmeas de *D. saccharalis*. Os fungos utilizados foram testados quanto à viabilidade e apresentaram percentual de germinação acima de 95%.

Conforme observado na Tabela 1, não houve interferência do fungo *B. bassiana* sobre o período larval e pupal, nem sobre a viabilidade pupal de *D. saccharalis*. Com relação à viabilidade larval, verificou-se que a média decresceu com o aumento da concentração do fungo apresentando diferença significativa ($p < 0,05$), sendo a menor média observada na concentração 10^5 conídios mL^{-1} , que foi de 56,67% de viabilidade, diferindo da testemunha e da concentração de 10^3 conídios mL^{-1} , que apresentaram percentuais de 90% e 86,67%, respectivamente. Analisando-se esses resultados, verifica-se que a concentração de 10^5 conídios mL^{-1} de *B. bassiana* reduziu a viabilidade larval de *D. saccharalis*, o que leva conseqüentemente, a uma diminuição na população de insetos adultos, reduzindo assim, a população da geração seguinte.

Os resultados referentes à fecundidade, viabilidade de ovos e longevidade de machos e fêmeas de *D. saccharalis* inoculada com *B. bassiana* estão apresentados na Tabela 2. Os dados obtidos demonstram que houve redução na fecundidade de *D. saccharalis* tratadas com a concentração de 10^5 conídios mL^{-1} que resultou num total de 237,00 ovos/fêmea, quando comparados à testemunha e às concentrações de 10^3 e 10^4 conídios mL^{-1} que apresentaram os totais de 357,17, 337,33 e 323,00 ovos/fêmea, respectivamente. Com relação à viabilidade de ovos, observou-se que esta foi reduzida nos tratamentos onde se utilizaram as concentrações de 10^4 e 10^5 conídios mL^{-1} , obtendo-se os percentuais de 63,43 e 48,60 %, respectivamente. Os valores referentes à longevidade de machos de *D. saccharalis* provenientes de lagartas tratadas

com 10^5 conídios mL^{-1} , foram de 2,17 dias e de 2,50 dias para fêmeas, diferindo da testemunha que foi de 3,50 dias para machos e 4,83 dias para fêmeas, indicando que esta concentração reduziu a longevidade do inseto. Em relação a esse parâmetro, as fêmeas já apresentaram diferença significativa na concentração 10^3 conídios mL^{-1} , sugerindo que baixas concentrações podem produzir efeitos importantes no controle de populações de insetos.

Noma & Strickler (2000) relataram que os efeitos patogênicos de *B. bassiana* sobre a fecundidade de *L. hesperus*, podem afetar o crescimento da população, se esses insetos não forem mortos pela infecção. Os autores verificaram que *L. hesperus* teve uma redução média de 19% na taxa de oviposição devido à infecção por *B. bassiana* na concentração de $1,34 \times 10^7$ conídios mL^{-1} . Com relação à fecundidade de *D. saccharalis*, verificou-se no presente trabalho uma redução de 33,65% no percentual de oviposição para a concentração 10^5 conídios/ mL^{-1} , expresso em valores absolutos na Tabela 2. A viabilidade dos ovos também foi afetada a partir da concentração 10^4 conídios/ mL^{-1} , indicando redução da população seguinte. Fargues *et al.* (1991) demonstraram que a fecundidade do besouro *Leptinotarsa decemlineata* Say que sobreviveram ao tratamento com *B. bassiana* na dosagem 3×10^4 conídios/ cm^2 foi muito menor ($12 \pm 9,1$ ovos/fêmea/dia) do que aquela dos besouros não tratados. Constatou-se, ainda, que machos e fêmeas viveram menos, com reduções de 38 e 48,2%, respectivamente, em relação a maior concentração.

Com relação a *M. anisopliae* verifica-se que não houve diferenças relacionadas ao período larval (Tabela 3). A média da viabilidade larval, submetida a concentração 10^5 conídios mL^{-1} , apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada às demais concentrações e em relação à testemunha, indicando que este parâmetro biológico foi afetado pela ação do patógeno,

reduzindo a população em 34,2%, uma vez que muitas lagartas não conseguiram atingir o estágio de pupa.

Em relação à duração do período pupal observou-se um aumento da média na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} (7,86 dias), diferindo da testemunha e da concentração 10^3 conídios mL^{-1} , onde foram obtidos 6,80 e 7,10 dias, respectivamente. A viabilidade pupal foi mais elevada no controle e decresceu com as aplicações do fungo. Esta foi afetada apresentando percentual de 53,33% na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} que diferiu do resultado da testemunha que foi de 88,33% (Tabela 3), com uma redução de 39,6%.

Na Tabela 4, observa-se que, com exceção da fecundidade, ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos para cada uma das outras variáveis analisadas ($p < 0,05$).

Apesar da fecundidade de *D. saccharalis* não apresentar diferenças estatísticas, constatou-se uma média de 265,50 ovos/fêmea para o tratamento de 10^5 conídios mL^{-1} e 344,33 ovos/fêmea para a testemunha. Os percentuais referentes a este parâmetro indicam uma redução de 22,89% de ovos para a concentração 10^5 conídios mL^{-1} em relação à testemunha, o que do ponto de vista biológico deve ser considerado. A viabilidade de ovos foi afetada, havendo redução em todos os tratamentos com relação à testemunha, sendo esse fato comprovado já na concentração 10^3 conídios mL^{-1} . Na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} , o percentual de viabilidade dos ovos foi de 52,34%, muito abaixo da testemunha que foi de 87,58%, sugerindo ser um aspecto importante no controle da população.

A longevidade de machos e fêmeas de *D. saccharalis* apresentou diferença estatística apenas na concentração 10^5 conídios mL^{-1} em relação à testemunha. Estudos realizados com carrapatos *I. scapularis* também demonstraram efeitos subletais de *M. anisopliae* tendo sido observado que apenas 30% das fêmeas tratadas com o fungo conseguiram ovipositar (Hornbostel

et al. 2004). Wekesa *et al.* (2006) comprovaram os efeitos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre *T. evansi* verificando efeito dos fungos reduzindo a oviposição.

Resultados semelhantes relacionados a efeitos subletais têm sido relatados por diversos autores em insetos de diferentes ordens. Segundo Noma & Strickler (2000), o conceito de dose subletal implica na infecção do inseto pelo patógeno, com conseqüências no seu desenvolvimento e fertilidade.

No presente trabalho foi evidenciado que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* causam efeitos secundários que comprometem parâmetros biológicos determinantes para o sucesso de *D. saccharalis* como praga, afetando a fecundidade e a viabilidade de ovos das fêmeas sobreviventes da infecção fúngica, conseqüentemente alterando o ritmo de crescimento da população, originando gerações com menos indivíduos e com o potencial da praga reduzido.

Esses resultados indicam que *B. bassiana* e *M. anisopliae*, mesmo sendo usados em baixas concentrações, têm potencial para serem utilizados em programas de controle de *D. saccharalis*.

Literatura Citada

Almeida, L.C., A.T.C.M. Precetti, P.K. Junior, C.R. Furtado, L.M. Pinegone & M.M.M.

Zambonato. 1988. Avanços na produção massal da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, e seus parasitóides. Boletim Técnico Copersucar 44: 14-21.

Alves, S.B. 1998a. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens, p. 21-37. In S.B.

Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

Alves, S.B. 1998b. Fungos entomopatogênicos, p. 289- 381. In S.B. Alves. (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

- Alves, S.B. & S.A. Moraes. 1998.** Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. p. 765-777.
In S.B. Alves. (ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B., L.S. Rossi, R.B. Lopes, M.A. Tamae & R.M. Pereira. 2002.** *Beauveria bassiana* yeast phase on Agar médium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). J. Invertebr. Pathol. 81:70-77.
- Araújo, J.R. 1987.** Guia prático para criação da broca da cana-de-açúcar e de seus parasitóides em laboratório. PLANALSUCAR, Piracicaba, 36p.
- Botelho, P.S.M. & N. Macedo. 2002.** *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*, p. 409-447. In J.R.P. Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento (eds.), Controle biológico no Brasil. 609p.
- Bullock, H.R., E. Martinez & C.W. Stuermer. 1970.** Cytoplasmic polyhedrosis virus and the development and the fecundity of the pink bollworm. J. Invertebr. Pathol. 15: 109-112.
- Ekesi, S. & N.K. Maniania. 2000.** Susceptibilidade of *Megalurothrips sjostedti* developmental stages to *Metarhizium anisopliae* and the effects of infection on feeding, adult fecundity, egg fertility and longevity. Entomol. Exp. Appl. 94: 229-236.
- Fargues, J., J.C. Delmas, J. Auge & R.A. Lebrun. 1991.** Fecundity and egg fertility in the adult Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) surviving larval infection by the fungus *Beauveria bassiana*. Entomol. Exp. Appl. 61: 45-51
- França, I.W.B. 2004.** Efeitos dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo predador *Posesus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae). Dissertação. UFRPE, Recife, 43p.

- Hensley, S.D. & A.H. Hammond. 1968.** Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *J. Econ. Entomol.* 61: 1742-1743.
- Hornbostel, V.L., R.S. Ostfeld, E. Ziioua & M.A. Benjamin. 2004.** Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 41: 922-929.
- Lacey, L.A., R. Frutos, K.H. Kaya & P. Vail. 2001.** Insects pathogens as biological control agents: do they have a future. *Biol. Control.* 21: 230-248.
- Mendonça, A.F. 1996.** Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, p. 3-48. In Mendonça, A.F. Pragas da cana-de-açúcar. 239p.
- Mulock, B.S. & L.D. Chandler. 2001.** Effect of *Beauveria bassiana* on the fecundity of western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biol. Control.* 22: 16-21.
- N'Doye, M. 1976.** Influence d'une infection à *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin sur les survivants et la descendance de *Chilo suppressalis* Walker (Lep. Pyralidae). *Entomophaga.* 21: 371-376.
- Nnakumusana, E.S. 1985.** Laboratory infection of mosquito larvae by entomopathogenic fungi with particular reference to *Aspergillus parasiticus* and its effects on fecundity and longevity of mosquitoes exposed to conidial infection in larval stages. *Curr. Sci.* 54: 1221-1228.
- Noma, T. & K. Strickler. 2000.** Effects of *Beauveria bassiana* on *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding and oviposition. *Environ. Entomol.* 29: 394-402.
- Perelle, A.H. & J.D. Harper. 1986.** An evaluation of the impact of sublethal dosages of nuclear polyhedrosis virus in larvae on pupae, adult progeny of the armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *J. Invertebr. Pathol.* 47: 42-47.

- Ruiu, L., G. Delrio, D.J. Ellar, I. Floris, B. Paglietti, S. Rubino & A.Satta. 2006.** Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the house fly (*Musca domestica*). Entomol. Exp. Appl. 118: 137-144.
- Santiago-Alvarez, C. & E. Vargas Osuna. 1988.** Reducion of. Reproductive capacity of *Spodoptera littoralis* males by a nuclear polyhedrosis virus (NPV). J. Invertbr. Pathol. 52: 142-146.
- Simmons, C.L. & P.P. Sikorowski. 1973.** A laboratory study of the effect of cytoplasmic polyhedrosis virus on *Heliothis virescens*. J. Invertebr. Pathol. 22: 369-371.
- ÚNICA. 2006.** União da agroindústria canavieira de São Paulo. Disponível em: <http://www.Unica.com.br>. Acesso em: 07/05/2006.
- Wekesa, V.W., M. Knapp, N.K. Maniana & H.I. Boga. 2006.** Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. J. Appl. Entomol. 130: 155-159.

Tabela 1 – Efeito de *Beauveria bassiana* em diferentes concentrações sobre período e viabilidade (Média ± DP) larval e pupal de *Diatraea saccharalis* em laboratório. Temp.: 27 ± 2°C; UR: 70 ± 5% e fotofase de 12h.

Tratamento	Período larval (dias)	Viabilidade larval (%)	Período pupal (dias)	Viabilidade pupal (%)
Testemunha	28,04 ± 2,25a	90,00 ± 9,13a	7,53 ± 0,31a	84,33 ± 20,53a
10 ³	24,62 ± 1,73a	86,67 ± 13,94a	7,47 ± 0,15a	76,67 ± 9,13a
10 ⁴	25,47 ± 3,04a	76,67 ± 19,00ab	7,63 ± 0,57a	75,33 ± 23,29a
10 ⁵	26,30 ± 2,50a	56,67 ± 19,00b	7,97 ± 0,60a	60,00 ± 25,28a
Valor de p	p ⁽¹⁾ = 0,1430	p ⁽¹⁾ = 0,0475*	p ⁽¹⁾ = 0,2713	p ⁽¹⁾ = 0,3404

(*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – Através do teste de Kruskal-Wallis.

Obs: Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si através de comparações pareadas do teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 2 – Efeito de *Beauveria bassiana* em diferentes concentrações sobre fecundidade, viabilidade de ovos e longevidade de machos e fêmeas (Média ± DP) de *Diatraea saccharalis* em laboratório. Temp.: 27 ± 2°C; UR: 70 ± 5% e fotofase de 12h.

Tratamento	Fecundidade	Viabilidade de ovos (%)	Longevidade de ♂ (dias)	Longevidade de ♀ (dias)
Testemunha	357,17 ± 19,24a	88,41 ± 2,04a	3,50 ± 0,55a	4,83 ± 0,75a
10 ³	337,33 ± 37,22a	83,28 ± 3,60a	3,17 ± 0,98ac	4,00 ± 0,63b
10 ⁴	323,00 ± 58,80a	63,43 ± 8,30b	2,50 ± 0,55bc	3,33 ± 0,52c
10 ⁵	237,00 ± 35,23b	48,60 ± 3,22c	2,17 ± 0,41b	2,50 ± 0,55d
Valor de p	p ⁽¹⁾ = 0,0074*	p ⁽¹⁾ < 0,0001*	p ⁽¹⁾ = 0,0008*	p ⁽¹⁾ = 0,0186*

(*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – Através do teste de Kruskal-Wallis.

Obs: Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si através de comparações pareadas do teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 3 – Efeito de *Metarhizium anisopliae* em diferentes concentrações sobre período e viabilidade (Média ± DP) larval e pupal de *Diatraea saccharalis* em laboratório. Temp.: 27 ± 2°C; UR: 70 ± 5% e fotofase de 12h.

Tratamento	Período larval (dias)	Viabilidade larval (%)	Período pupal (dias)	Viabilidade pupal (%)
Testemunha	33,20 ± 2,64a	86,67 ± 13,94a	6,80 ± 0,60a	88,33 ± 11,18a
10 ³	33,92 ± 1,57a	86,67 ± 18,26a	7,10 ± 0,22a	73,33 ± 13,69ac
10 ⁴	34,42 ± 1,34a	86,67 ± 13,94a	7,27 ± 0,55ab	65,33 ± 18,35bc
10 ⁵	34,85 ± 2,56a	56,67 ± 9,13b	7,86 ± 0,54b	53,33 ± 13,95b
Valor de p	p ⁽¹⁾ = 0,6730	p ⁽¹⁾ = 0,0257*	p ⁽¹⁾ = 0,0366*	p ⁽¹⁾ = 0,0252*

(*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – Através do teste de Kruskal-Wallis.

Obs: Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si através de comparações pareadas do teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 4 – Efeito de *Metarhizium anisopliae* em diferentes concentrações sobre fecundidade, viabilidade de ovos e longevidade de machos e fêmeas (Média ± DP) de *Diatraea saccharalis* em laboratório. Temp.: 27 ± 2°C; UR: 70 ± 5% e fotofase de 12h.

Tratamento	Fecundidade	Viabilidade de ovos (%)	Longevidade de ♂ (dias)	Longevidade de ♀ (dias)
Testemunha	344,33 ± 27,02a	87,58 ± 1,72a	3,50 ± 0,55a	4,67 ± 1,03a
10 ³	336,33 ± 51,28a	82,54 ± 4,59b	3,50 ± 0,84a	4,17 ± 1,17ab
10 ⁴	333,00 ± 65,76a	67,74 ± 9,04c	2,67 ± 0,82a	3,33 ± 0,82ab
10 ⁵	265,50 ± 175,16a	52,34 ± 8,64d	2,17 ± 0,75b	2,50 ± 0,55b
Valor de p	P ⁽¹⁾ = 0,2245	p ⁽¹⁾ = 0,0002*	p ⁽¹⁾ = 0,0055*	P ⁽¹⁾ = 0,0195*

(*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – Através do teste de Kruskal-Wallis.

Obs: Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si através de comparações pareadas do teste de Kruskal-Wallis.

CAPÍTULO 3

TIPOS E CONTAGEM DIFERENCIAL DOS HEMÓCITOS EM *Diatraea saccharalis* F.
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) DESAFIADOS IMUNOLOGICAMENTE PELOS FUNGOS
Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.

MARCO A.P. OLIVEIRA¹, EDMILSON J. MARQUES¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA² E
REGINALDO BARROS¹

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

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

¹Oliveira, M.A.P., E.J Marques, V. Wanderley-Teixeira, R. Barros. Tipos e contagem diferencial dos hemócitos em *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae) desafiados imunologicamente pelos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em diferentes concentrações. Arquivos do Instituto Biológico.

RESUMO - Este trabalho teve o objetivo de analisar morfológica e quantitativamente os tipos de hemócitos em lagartas do terceiro ínstar de *Diatraea saccharalis* F., desafiados imunologicamente pelos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., nas concentrações 10^3 , 10^5 e 10^7 conídios mL^{-1} . Os resultados revelaram que as células mais freqüentes foram os esferulócitos, plasmócitos e granulócitos, com percentuais de 34,75%, 29,66% e 22,16%, respectivamente, enquanto que os hemócitos menos freqüentes foram os pró-hemócitos (8,33%), adipohemócitos (2,58%) e oenocitóides (2,41%). Após inoculação com o fungo *B. bassiana* verificou-se que diferenças significativas só ocorreram para os granulócitos na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} (24 e 36h) e para os plasmócitos nas concentrações 10^3 conídios mL^{-1} (60h) e 10^7 conídios mL^{-1} (24 e 36h), onde houve um aumento dos granulócitos e declínio dos plasmócitos na maior concentração, e aumento dos plasmócitos na concentração 10^3 conídios mL^{-1} . No entanto, o fungo *M. anisopliae* não interferiu quantitativamente nos granulócitos e plasmócitos. No que se refere aos esferulócitos verificou-se uma maior tendência de redução dessas células no intervalo de 36h para ambos os fungos, porém diferença significativa só ocorreu na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} no intervalo de 60h, resultando na menor média para esse tipo de hemócito quando desafiados pelo *M. anisopliae*.

PALAVRAS-CHAVE: *Diatraea saccharalis*, fungos entomopatogênicos, hemócitos, morfologia

TYPES AND DIFFERENTIAL COUNT OF HEMOCYTES IN *Diatraea saccharalis* F.
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) CHALLENGED IMMUNOLOGICALLY BY THE FUNGI
Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. AND *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. IN
DIFFERENT CONCENTRATIONS.

ABSTRACT - This research analyzed morphological and quantitatively the types of hemocytes in 3th instar of *Diatraea saccharalis* F., challenged immunologically by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in the concentrations 10^3 , 10^5 and 10^7 conidia mL⁻¹. The results revealed that the most frequent cells were the spherulocytes, plamocytes and granulocytes, with rates of 34,75%, 29,66% and 22,16%, respectively, while the least frequent hemocytes were the prohemocytes (8,33%), adipohemocytes (2,58%) and eonocytoids (2,41%). After inoculation with the fungus *B. bassiana* it was verified that significant differences only happened to the granulocytes in the concentration of 10^7 conidia mL⁻¹ (24 and 36h) and for the plamocytes in the concentrations 10^3 conidia mL⁻¹ (60h) and 10^7 conidia mL⁻¹ (24 and 36h), where there was an increase of the granulocytes and a decrease of the plamocytes in the largest concentration, and an increase of the plamocytes in the concentration 10^3 conidia mL⁻¹. However, the fungus *M. anisopliae* no interfered in the granulocytes and plamocytes. Relating to the spherulocytes a larger tendency to reduction of those cells was verified at the interval of 36h for both fungi. However, a significant difference only happened in the concentration of 10^5 conidia mL⁻¹ at the interval of 60h resulting in the smallest average for this kind of hemocyte when challenged by *M. anisopliae*.

KEY WORDS: *Diatraea saccharalis*, entomopathogenic fungi, hemocytes, morphology

Introdução

A *Diatraea saccharalis* F. é considerada uma das principais pragas da cana-de-açúcar, e constitui-se num dos fatores limitantes para a sua exploração. Apesar de sua incidência ser menor quando a planta é jovem, esta ocorre durante todo o seu desenvolvimento, provocando danos diretos, pois, devido à abertura de galerias ocasiona perda de peso, morte das gemas laterais, secamento dos ponteiros e até tombamento das plantas; e indiretos, devido à penetração de fungos fitopatogênicos, a exemplo de *Fusarium moniliforme* Sheldon e *Colletotrichum falcatum* Went, que são responsáveis pela inversão de sacarose, diminuindo, dessa forma a pureza do caldo e proporcionando menor rendimento em açúcar e álcool (Botelho & Macedo 2002, Gallo *et al.* 2002).

Os fungos entomopatogênicos são bastante conhecidos mundialmente por seu alto potencial no controle de diversas Ordens de insetos. De acordo com Alves & Pereira (1998) esses fungos causam distúrbios fisiológicos que atingem o tegumento, sistema circulatório, sistema reprodutor, sistema respiratório, sistema nervoso e sistema digestivo dos insetos atacados.

Dentre os fungos entomopatogênicos, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, são utilizados como potentes agentes no controle biológico de insetos (Hajek & St. Leger 1994, Hegedus & Khachatourians 1996). Segundo Griesch & Vilcinskas (1998), as proteases extracelulares produzidas por esses fungos parecem participar na supressão da resposta imunológica celular na hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella* L.

Nos insetos, os principais mecanismos de defesa são desempenhados pelos hemócitos, células livres circulantes na hemolinfa, cujo número e tipos diferem não só com a espécie estudada como também com a idade e desenvolvimento do indivíduo. Essas células fornecem

uma resposta ágil e eficiente contra os patógenos que atingem a hemocele, participando ativamente dos mecanismos de defesa tais como: reconhecimento, fagocitose, encapsulação, coagulação, formação dos nódulos e citotoxicidade (Gupta 1985, Ratcliffe *et al.* 1985). Os hemócitos reconhecem uma variedade de corpos estranhos, pela interação direta de receptores de superfície celular com moléculas do organismo invasor, ou indiretamente pelo reconhecimento de receptores da resposta humoral que opsonizam a superfície do invasor (Lavine & Strand 2002). O sucesso das respostas de defesa depende do número e dos tipos de hemócitos envolvidos nestes mecanismos (Russo *et al.* 2001).

Nos últimos anos tem havido um enorme progresso no conhecimento das defesas imunológicas dos insetos (Sewify & Hashem 2001, Serebrov *et al.* 2001, Hoch *et al.* 2004, Lee *et al.* 2005). A biodiversidade desses organismos tem proporcionado modelos importantes para estudar as suas estratégias antimicrobianas, as quais podem fornecer informações relevantes para o desenvolvimento de metodologias de controle biológico por patógeno. Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar morfológica e quantitativamente os tipos de hemócitos em lagartas do terceiro ínstar de *D. saccharalis*, antes e após a inoculação dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* em diferentes concentrações.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Insetos da Área de Fitossanidade, do Departamento de Agronomia e no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em Recife, PE.

Obtenção dos Insetos. As lagartas de *D. saccharalis* foram obtidas da criação existente no laboratório de Controle Biológico de insetos da UFRPE.

Obtenção dos Isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*: Os isolados utilizados foram *B. bassiana* (447) isolado de *Selenopsis invicta* (Buren) e *M. anisopliae* (E9) isolado de *Deois flavopicta* (Stal.), provenientes da micoteca do laboratório de Patologia de Insetos, onde são conservados na temperatura de $6 \pm 2^\circ\text{C}$ em tubos de vidro com meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar mais o antibiótico sulfato de estreptomicina (BDA+A) e óleo Nujol. As suspensões dos fungos foram preparadas a partir de placas Petri contendo meio de cultura com os fungos entomopatogênicos, adicionando-se 20mL de água destilada esterilizada para *B. bassiana* e 15mL para *M. anisopliae* acrescido de espalhante adesivo Tween 80 a 0,01% (ADE+E), sendo filtradas em gaze esterilizada e as concentrações para ambos os isolados foram aferidas em 10^3 , 10^5 , e 10^7 conídios/mL⁻¹, mediante o uso da câmara de Neubauer. A viabilidade de conídios foi avaliada por meio de plaqueamento em BDA +A, após 24h, em estufa incubadora B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase, fazendo-se a contagem de conídios germinados e não germinados em microscópio óptico de luz.

Tratamento Tópico de *D. saccharalis*. As lagartas de terceiro ínstar de *D. saccharalis* foram distribuídas em sete tratamentos, onde a testemunha foi pulverizada com água destilada esterilizada mais espalhante adesivo Tween 80 e os demais tratamentos receberam concentrações fúngicas de 10^3 , 10^5 e 10^7 conídios mL⁻¹ de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Cada tratamento constou de 20 lagartas, que foram divididas em grupos de cinco, a fim de permitir a coleta de hemolinfa, em diferentes intervalos de tempo (24, 36, 48 e 60 horas). Essas foram acondicionadas em bandeja plástica com compartimentos, contendo colmo de milho como substrato alimentar. A inoculação foi realizada através de pulverização com o auxílio de um microatomizador de marca Paasche “VL”, sendo utilizado 1 mL da suspensão por tratamento. Os

tratamentos foram mantidos em condição de laboratório a uma temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ de UR e 12 horas de fotofase.

Coleta da Hemolinfa para Análise Morfológica e Contagem Diferencial dos Hemócitos.

Foram utilizadas 140 lagartas do terceiro instar de *D. saccharalis*, sendo 20 para a testemunha e 120 inoculadas com os fungos acima citados, referentes aos demais tratamentos. Amostras de $10\mu\text{l}$ de hemolinfa foram coletadas de cinco lagartas por tratamento, nos intervalos de 24, 36, 48, e 60 horas pós-inoculação. Para isso realizou-se uma incisão na região meso-pleural da lagarta, e com o auxílio de uma micropipeta colheu-se a hemolinfa. Em seguida, o material foi colocado sobre uma lâmina contendo $10\mu\text{l}$ de solução salina para evitar a coagulação. Posteriormente, realizou-se o esfregaço. Os esfregaços foram mantidos por aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente para permitir uma melhor adesão dos hemócitos à lâmina. Após este procedimento, o material foi fixado em metanol, por cinco minutos, sendo em seguida submetido à coloração pelo Giemsa, também por cinco minutos. A análise morfológica foi realizada utilizando microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49, e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-51. Para contagem diferencial dos hemócitos empregou-se metodologia modificada de Falleiros *et al.* (2003), onde foram contadas 300 células em campos aleatórios da lâmina, utilizando-se a objetiva de imersão.

Resultados e Discussão

Nos esfregaços da hemolinfa de lagartas do terceiro instar de *D. saccharalis* corados pelo Giemsa, foram observados seis tipos de hemócitos: Pró-hemócitos (PR), Plasmócitos (PL), Granulócitos (GR), Adipohemócitos (AD), Oenocitóides (OE) e Esferulócitos (SP) (Fig 1). Esses resultados estão de acordo com Barduco *et al.* (1988), os quais relataram a presença dessas

células durante todo o período larval nessa espécie. Esses mesmos autores citaram que ocorre uma variação na população celular ao longo do período larval, onde as células mais frequentes foram os plasmócitos, seguidos pelos: adipohemócitos, esferulócitos, granulócitos, oenocitóides e pró-hemócitos. Porém os resultados da presente pesquisa revelaram que as células mais frequentes foram os esferulócitos, plasmócitos e granulócitos, com percentuais de 34,75%, 29,66% e 22,16%, respectivamente, enquanto que os hemócitos menos frequentes foram os pró-hemócitos (8,33%), adipohemócitos (2,58%) e oenocitóides (2,41%), que corroboram com os dados descritos por Lackie (1988), Ratcliffe (1993), Strand & Pech (1995), os quais relataram que nos estágios larvais em lepidópteros normalmente as células granulares e os plasmócitos compreendem mais de 50% dos hemócitos circulantes, tendo a capacidade de adesão na superfície de corpos estranhos. Os outros hemócitos descritos em lepidópteros são células não adesivas, correspondendo aos esferulócitos, oenocitóides e pró-hemócitos. Falleiros *et al.* (2003) trabalhando com microscopia de Transmissão e Varredura, também observaram maior frequência de plasmócitos, granulócitos e esferulócitos na hemolinfa de larvas de *D. saccharalis*. Segundo Sass *et al.* (1994) os esferulócitos estão envolvidos no transporte de componentes cuticular, o que pode explicar o seu maior percentual entre os hemócitos, pois as lagartas encontravam-se próxima à mudança de fase de ínstar. Já os oenocitóides contêm precursores da fenoloxidase que provavelmente desempenha uma função na melanização (Ashida & Dohke 1980, Iwama & Ashida 1986, Jiang *et al* 1997). Os pró-hemócitos são relatados como células tronco que se diferenciam em um ou mais tipos de hemócitos.

A Tabela 1 mostra que após inoculação com o fungo *B. bassiana* diferenças significativas só ocorreram para os granulócitos na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} (24 e 36h) e para os plasmócitos nas concentrações 10^3 conídios mL^{-1} (60h) e 10^7 conídios mL^{-1} (24 e 36h), onde

houve um aumento dos granulócitos e declínio dos plasmócitos na maior concentração, e aumento dos plasmócitos na concentração 10^3 conídios mL^{-1} . No entanto, o fungo *M. anisopliae* não interferiu significativamente nos granulócitos e plasmócitos. No que se refere aos esferulócitos verificou-se uma maior tendência de redução dessas células no intervalo de 36h para ambos os fungos, porém diferença significativa só ocorreu na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} no intervalo de 60h, resultando na menor média para esse tipo de hemócito quando desafiados pelo *M. anisopliae*. Não foram observadas alterações morfológicas nessas células após inoculação com os fungos entomopatogênicos em relação à testemunha.

De acordo com Han & Gupta (1989), Eslin & Prevost (1998) e Han *et al.* (1998) os hemócitos podem ser capazes de responder rapidamente a mudanças ambientais, devido às várias funções fisiológicas desempenhadas por essas células na hemolinfa, onde o número e proporção de cada tipo de hemócito liberado de órgãos hematopoéticos pode mudar rapidamente em respostas as várias reações imunes contra patógenos.

Os dados desta pesquisa mostraram uma flutuação populacional dos hemócitos em respostas as diferentes concentrações dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* nos intervalos de 24, 36, 48 e 60h. No entanto, apenas o fungo *B. bassiana* na concentração 10^7 conídios mL^{-1} nos intervalos de 24 e 36h, demonstrou uma interferência mais efetiva na população dos granulócitos e plasmócitos de *D. saccharalis*. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Hung *et al.* (1993), Hegedus & Khachatourians (1996) e Hung & Boucias (1996), os quais relataram um aumento de granulócitos em *Spodoptera exigua* (Hb.) e no gafanhoto *Melanoplus sanguinipes* F. quando inoculados com esse fungo, enquanto que Lee *et al.* (2005) observaram uma diminuição dos plasmócitos em *Mamestra brassicae*, quando inoculadas com *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e *B. bassiana*. Segundo Chain & Anderson (1983), Gunnarsson (1988), Pech & Strand

(1996) e Fuguet & Vey (2004) a redução dos plasmócitos pode está relacionada ao envolvimento dessas células no processo inicial de nodulação, enquanto que os granulócitos só participam dos estágios finais desse processo, o que justificaria o seu aumento. Esses mesmos autores sugerem ainda que o declínio dos plasmócitos, em infecções com fungos, pode estar relacionada à sua suscetibilidade aos metabólicos secundários tóxicos produzidos por estes.

A menor interferência do fungo *M. anisopliae*, na população dos granulócitos e plasmócitos pode estar relacionado ao isolado e/ou concentração, pois segundo Sewify & Hashem (2001) quando *Galleria mellonella* L. foi inoculada com *M. anisopliae*, isolado de solo Egípcio, na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} , ocorreu um aumento significativo dos granulócitos. No entanto, Gillespie *et al.* (2000) observaram no gafanhoto *Schistocerca gregaria*, uma redução significativa dos granulócitos e plasmócitos quando inoculados por *M. anisopliae* var. *acridum*, na concentração $7,5 \times 10^4$ conídios mL^{-1} .

Apesar de *B. bassiana* ter mostrado uma ação mais efetiva sobre a dinâmica populacional dos granulócitos e plasmócitos de lagartas de *D. saccharalis* em relação ao *M. anisopliae*, estudos mais detalhados sobre o processo de defesa imunológico desse inseto devem ser realizados, no que se refere a fatores humorais e metabólicos tóxicos secundários produzidos por esses fungos.

Agradecimentos

Aos pesquisadores Drs. Fábio André Brayner dos Santos e Luiz Carlos Alves pela contribuição científica para realização deste trabalho e ao prof. Jorge Bráz Torres pela consultoria nas análises estatísticas.

Literatura Citada

- Alves, S.B., R.M. Pereira. 1998.** Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos, p. 39-54. In S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Ashida, M. & K. Dohke. 1980.** Activation of prophenoloxidase by the activating enzyme of the silkworm *Bombyx mori*. Insect Biochem. 10: 37-47.
- 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.
- Botelho, P.S.M. & N. Macedo. 2002.** *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*, p. 409-447. In J.R.P. Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento (eds.), Controle biológico no Brasil. 609p.
- Chain, B.M. & R.S. Anderson. 1983.** Inflammation in insects: the release of a plasmatocyte depletion factor following interaction between bacteria and haemocytes. J. Insect Physiol. 29: 1-4.
- Eslin, P. & G. Prevost. 1998.** Hemocyte load and immune resistance to *Asobara tabida* are correlated in species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. J. Insect Physiol. 44: 807-816.
- Falleiros, A.M.F., M.T.S. Bombonato & E.A. Gregório. 2003.** Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Brazilian Arch. Biol. Technol. 46: 287-294.
- Fuguet, R. & A. Vey. 2004.** Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp.: in vivo studies. J. Invertebr. Pathol. 85: 152-167.

- Gallo, D., O. Nakano, S.S. Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. de Baptista, E.B. Filho, F.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia Agrícola, 920p.
- Gillespie, J.P., C. Burnett & A.K. Charnley. 2000.** The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. J. Insect Physiol. 46: 429-437.
- Griesch, J. & A. Vilcinskas. 1998.** Proteases released by entomopathogenic fungi impair phagocytic activity, attachment and spreading of plasmatocytes isolated from haemolymph of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Biocontr. Sci. Technol. 8: 517-531.
- Gupta, A.P. 1985.** Cellular elements in hemolymph, p. 401-451. In G.A. Kerkut & L.I. Gilbert, (eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, v. 3. Pergamon Press, Oxford, 614p.
- Gunnarsson, S.G.S. 1988.** Infection of *Schistocerca gregaria* by the fungus *Metarhizium anisopliae*: Cellular reactions in the integument studied by scanning electron and light microscopy. J. Invertebr. Pathol. 46: 312-319.
- Hajek, A.E. & R.J. St Leger. 1994.** Interaction between fungal pathogens and insect hosts. Annu. Rev. Entomol. 39: 293-322.
- Han, S.S. & A.P. Gupta. 1989.** Arthropod immune system. II. Encapsulation of implanted nerve cord and plain gut surgical suture by granulocytes of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). Zool. Sci. 6: 303-306.
- Han, S.S., M.H. Lee & W.K. Kim. 1998.** Hemocytic differentiation in hemopoietic organ of *Bombix mori* larvae. Zool. Sci. 15: 371-379.

- Hegedus, D.D. & G.G. Khachatourians. 1996.** Analysis of cellular defense reactions of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*, infected with heat-sensitive mutants of *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 68: 166-169.
- Hoch, G., L.F Solter. & A. Schopf. 2004.** Hemolymph melanization and alterations in hemocyte numbers in *Lymantria dispar* larvae following infections with different entomopathogenic microsporidia. Entomol. Exp. Appl. 113: 77-86.
- Hung, S.H. & D.G. Boucias. 1996.** Phenoloxidase activity in hemolymph of naïve and *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae. J. Invertebr. Pathol. 67: 35-40.
- Hung, S. H., D.G. Boucias & A. Vey. 1993.** Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense response of *Spodoptera exigua*. J. Invertebr. Pathol. 61: 179-187.
- Iwana, R. & M. Ashida. 1986.** Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombix mori*. Insect Biochem. 16: 547-555.
- Jiang, H., Y. Wang, C. Ma & M.R. Kanost. 1997.** Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit PPO-pl. Insect Biochem. Mol. Biol. 27: 835-850.
- Lackie, A.M. 1988.** Haemocyte behaviour. Adv. Insect Physiol. 21: 85-178
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Molecular Biol., Oxford. 32: 1295-1309.
- Lee, M., C.S.I.K. Yoon, J.I. Yi, J.R. Cho, & H.S. Kim. 2005.** Cellular immune responses and FAD-glucose dehydrogenase activity of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) challenged with three species of entomopathogenic fungi. Physiol. Entomol. 30: 287-292.

- Pech, L.L. & M.R. Strand. 1996.** Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J. Cell Sci.* 109: 2053-2060.
- Ratcliffe, N.A., A.F. Rowley & S.W Fitzgerald. 1985.** Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Internat. Rev. Citol.* 97: 183-349.
- Ratcliffe, N.A. 1993.** Cellular defense responses of insects: unresolved problems. 267-303 In N.E. Beckage, S.N. Thompson & B.A. Federici. (eds.). *Parasites and Pathogens of Insects*, vol. 1. Academic Press. San Diego. 515p.
- Russo, J., M. Brehèlin & 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.
- Sass, M., A. Kiss & M. Locke. 1994.** Integument and hemocyte peptides. *J. Insect Physiol.* 40: 407-421.
- Serebrov, V.V., A.A. Alekseev & V.V. Glupov. 2001.** Changes in the activity and pattern of hemolymph esterases in the larvae of greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) during mycosis. *Biol. Bulletin.* 28: 499-503.
- Sewify, G.H. & M.Y. Hashem. 2001.** Effect of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on cellular defence response and oxygen uptake of the wax moth *Galleria mellonella* L. (Lep., Pyralidae). *J. Appl. Entomol.* 125: 533-536.
- Strand, M.R. & L.L. Pech. 1995.** Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 31-56.

Tabela 1. Médias (\pm erro padrão) dos números de granulócitos (GR), plasmócitos (PL) e esferulócitos (SP) da hemolinfa de lagartas do terceiro instar de *D. saccharalis*, desafiados imunologicamente pelos fungos *B. bassiana* (B.b.) e *M. anisopliae* (M.a.).

Tratamento Granulócitos	Tempo após tratamento (horas)				Estatística ¹ F _{3,8} ; P
	24	36	48	60	
Testemunha	15,0 \pm 2,52 b	19,7 \pm 4,05 b	24,3 \pm 9,95	30,7 \pm 2,73 ab	- ²
B.b. - 10 ³	28,3 \pm 3,33 ab	34,7 \pm 2,33 b	37,7 \pm 6,36	32,7 \pm 3,76 ab	-
B.b. - 10 ⁵	29,3 \pm 2,90 ab	34,3 \pm 4,98 b	34,3 \pm 8,35	39,0 \pm 4,58 a	-
B.b. - 10 ⁷	44,3 \pm 8,68 aAB	61,7 \pm 9,17 aA	27,3 \pm 1,45 B	31,3 \pm 4,10 abB	5,37; 0,0256
M.a. - 10 ³	23,7 \pm 2,96 bAB	33,0 \pm 2,00 bA	30,7 \pm 0,33 B	20,7 \pm 2,73 bB	4,93; 0,0316
M.a. - 10 ⁵	31,7 \pm 0,88 ab	42,3 \pm 5,81 ab	29,7 \pm 4,63	43,7 \pm 1,85 a	-
M.a. - 10 ⁷	26,0 \pm 0,58 abB	34,3 \pm 1,85 bAB	35,7 \pm 2,90 A	39,7 \pm 1,45 aA	9,21; 0,0057
F _{6,14} ; P	4,96; 0,0064	6,60; 0,0018	- ²	5,62; 0,0037	
Plasmócitos					
Testemunha	36,0 \pm 3,46 a	33,7 \pm 3,20 a	27,7 \pm 5,36	21,7 \pm 4,25 b	- ²
B.b. - 10 ³	32,7 \pm 6,12 a	29,0 \pm 4,58 ab	33,0 \pm 3,51	38,3 \pm 3,18 a	-
B.b. - 10 ⁵	35,3 \pm 3,48 a	26,0 \pm 0,58 ab	30,7 \pm 2,60	26,0 \pm 1,53 ab	-
B.b. - 10 ⁷	13,3 \pm 3,18 bB	13,7 \pm 3,84 bB	31,7 \pm 4,41 A	27,0 \pm 4,58ab AB	4,92; 0,0318
M.a. - 10 ³	36,3 \pm 0,33 a	28,0 \pm 6,24 ab	28,7 \pm 4,48	31,7 \pm 1,45 ab	-
M.a. - 10 ⁵	38,7 \pm 1,45 aA	27,7 \pm 1,67 abB	40,3 \pm 3,38 A	35,0 \pm 3,21 abAB	5,23; 0,0273
M.a. - 10 ⁷	27,0 \pm 1,15 aB	33,0 \pm 1,00 aAB	32,7 \pm 1,76AB	35,3 \pm 1,67 ab A	6,40; 0,0161
F _{6,14} ; P	8,23; 0,0006	3,84; 0,0179	-	3,80; 0,0185	
Esferulócitos					
Testemunha	40,0 \pm 2,08	34,7 \pm 8,76	30,0 \pm 6,68	34,3 \pm 6,43 a	- ²
B.b. - 10 ³	31,0 \pm 4,58	24,7 \pm 5,60	24,3 \pm 2,18	23,0 \pm 1,53 ab	-
B.b. - 10 ⁵	27,3 \pm 6,56	29,0 \pm 3,00	27,7 \pm 6,89	27,0 \pm 5,13 ab	-
B.b. - 10 ⁷	23,3 \pm 10,90	14,7 \pm 4,05	30,3 \pm 4,84	24,7 \pm 5,90 ab	-
M.a. - 10 ³	33,0 \pm 3,51	24,7 \pm 4,33	30,3 \pm 7,36	33,0 \pm 1,53 a	-
M.a. - 10 ⁵	23,7 \pm 2,33	12,3 \pm 5,49	20,0 \pm 1,53	10,7 \pm 3,18 b	-
M.a. - 10 ⁷	33,3 \pm 2,03	27,7 \pm 1,20	29,7 \pm 4,63	21,0 \pm 2,52 ab	-
F _{6,14} ; P	-	-	-	4,22; 0,0124	-

¹Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

²Resultados não significativos pela ANOVA.

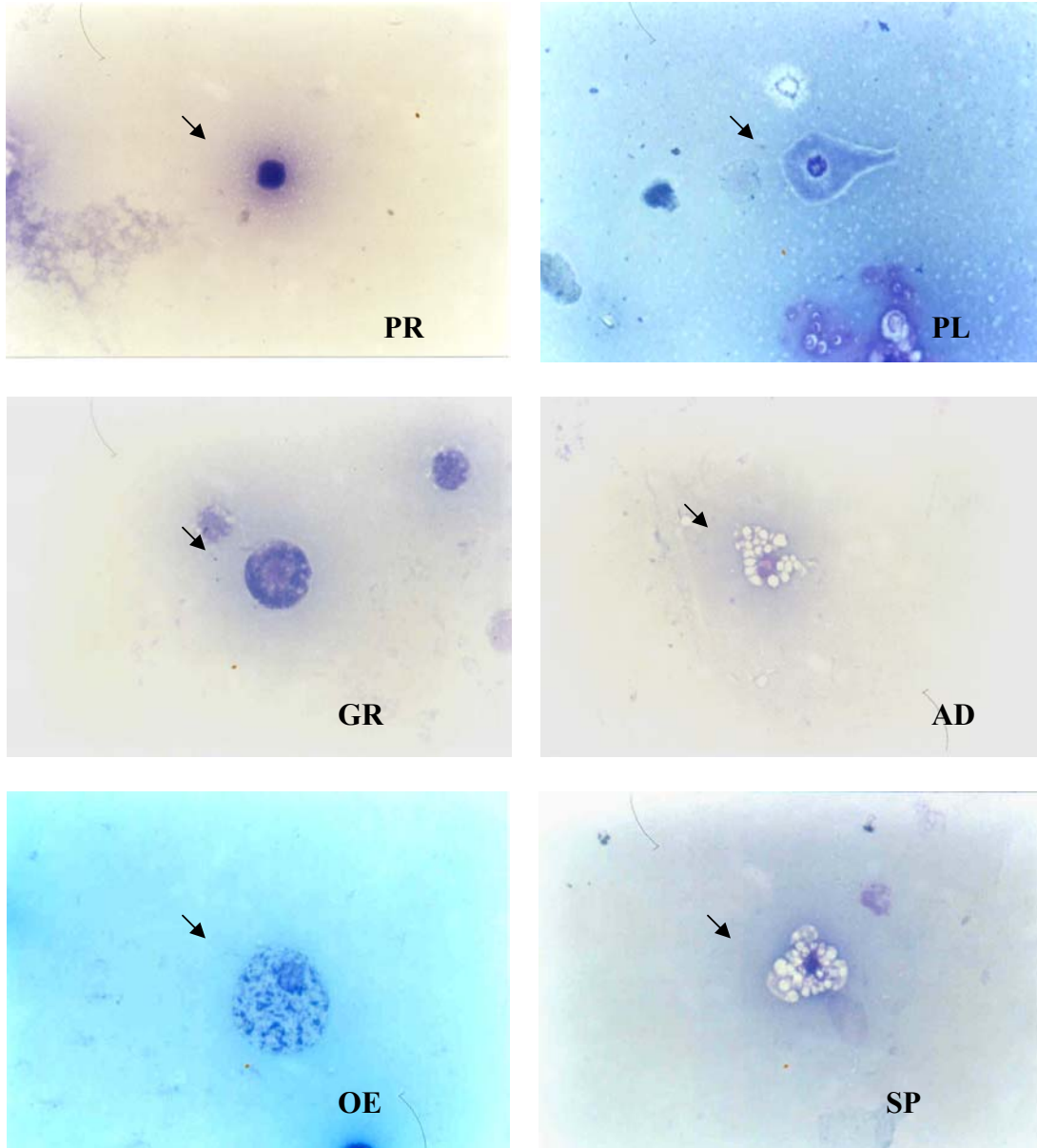


Figura 1. Tipos de hemócitos observados na hemolinfa de lagartas do terceiro ínstar de *D. saccharalis*: Pró-hemócito (PR), Plasmócito (PL), Granulócitos (GR), Adipohemócito (AD), Oenocitóide (OE) e Esferulócito (SP). Coloração Giemsa. Aumento 1071x.