

EFEITOS DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. SOBRE A FASE LARVAL E
CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS DE *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE)

por

JENNIFER GUIMARÃES

(Sob Orientação do Professor Edmilson Jacinto Marques)

RESUMO

Diatraea flavipennella (Box) é considerada uma das principais pragas de importância econômica para a cultura da cana-de-açúcar no nordeste brasileiro. O controle biológico com o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok., pode ser uma alternativa viável, considerando que esse entomopatógeno já é empregado para outras pragas nesta cultura. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos deste fungo, em diferentes concentrações, sobre lagartas do terceiro ínstar de *D. flavipennella* e investigar sua resposta imune, através da análise quantitativa dos tipos de hemócitos, da produção de fenoloxidase, proteína total e óxido nítrico, e possíveis diferenças no perfil bioquímico dos hemócitos. Foi observado o efeito de *M. anisopliae* sobre lagartas de *D. flavipennella*, pulverizado nas concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 conídios/mL, no qual apresentou diferenças com relação ao período larval, prolongando até 72,0 dias nos tratamentos e 25,0 dias na testemunha. Os resultados referentes aos hemócitos revelaram que as células mais frequentes quando pulverizado nas concentrações de 10^3 , 10^5 , 10^7 conídios/mL foram prohemócitos, esferulócitos, plasmócitos e granulócitos, em relação aos adipohemócitos e oenocitóides. O nível de óxido nítrico apresentou diferença entre a testemunha e a concentração 10^7 conídios/mL (24h), enquanto a atividade de fenoloxidase foi semelhante entre os tratamentos em 24h e superior na

concentração 10^7 conídios/mL em 60 h. A proteína total na concentração 10^7 conídios/mL (60h) foi maior diferindo da testemunha. No perfil bioquímico dos hemócitos, houve uma alteração em carboidratos, lipídeos e proteínas em reação ao fungo. Os resultados indicam que o fungo *M. anisopliae* pode ser utilizado no Manejo Integrado de *D. flavipennella* nos canaviais nordestinos, por apresentar patogenicidade e interferir no seu desenvolvimento mesmo quando expostas a pequenas concentrações.

PALAVRAS-CHAVE: Broca da cana-de-açúcar, entomopatógeno, fase imatura, hemócitos, óxido nítrico, fenoloxidase, histoquímica.

EFFECT OF *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. ON LARVAL STAGE
CHARACTERISTICS OF IMMUNOLOGICAL *Diatraea flavipennella* (BOX)
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

by

JENNIFER GUIMARÃES

(Under the Direction of Professor Edmilson Jacinto Marques)

ABSTRACT

Diatraea flavipennella (Box) is considered a major pest of economic importance to the culture of sugar cane in Northeast Brazil. Biological control with the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok., may be a viable alternative, as this pathogen is already used for other pests in this crop. This work aimed to evaluate the effects of this fungus at different concentrations, against the third instar larvae of *D. flavipennella* and to investigate the immune response, by analysing the types of hemocytes, and phenoloxidase, total protein and nitric oxide, titration as well as the possible differences in the biochemical profile of hemocytes. It was observed the effect of *M. anisopliae* against larvae of *D. flavipennella*, sprayed at concentrations of 10^3 , 10^4 , 10^5 conidia/mL, which showed differences regarding to the larval period, which extended up to 72.0 days and 25.0 days in treatment the control, respectively. The results for hemocytes revealed that the most common cells when sprayed at concentrations of 10^3 , 10^5 , 10^7 conidia/mL were prohemocytes, spherulocytes, plasma cells and granulocytes in relation to adipohemocytes and oenocytoids. The of nitric oxide titration was different between the control and the concentration 10^7 conidia/mL (24), while phenoloxidase activity was similar among treatments at 24h and was higher only at the concentration 10^7 conidia/mL after 60h. The total

protein concentration in 10^7 conidia/ml (60h) was higher relatively to the control. In the biochemical profile of hemocytes there was an alteration in carbohydrates, lipids and total proteins contents at rearing to the fungus. The results indicate that *M. anisopliae* may be used in Integrated Pest Management of *D. flavipennella* in northeastern sugar crops, because of the its pathogenicity and interfere with their development even when exposed to small concentrations.

KEY WORDS: Sugarcane borer, entomopatogenic, larval stage, hemocytes, nitric oxide, phenoloxidasas, histochemistry.

EFEITOS DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. SOBRE A FASE LARVAL E
CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS DE *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE)

Por

JENNIFER GUIMARÃES

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 – 2012

EFEITOS DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. SOBRE A FASE LARVAL E
CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS DE *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE)

Por

JENNIFER GUIMARÃES

Comitê de Orientação:

Edmilson Jacinto Marques - UFRPE

Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Auristela Correia de Albuquerque - UFRPE

EFEITOS DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. SOBRE A FASE LARVAL E
CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS DE *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE)

Por

JENNIFER GUIMARÃES

Orientador: _____
Edmilson Jacinto Marques – UFRPE

Examinadores: _____
Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Auristela Correia de Albuquerque – UFRPE

José Vargas de Oliveira – UFRPE

A meu pai e mãe Iraildes Almeida Guimarães, as minhas
irmãs Liliane e Taiane e a minha sobrinha Lívia,

DEDICO

Ao meu *amôlindo* Marcos Antônio Silva

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo Seu infinito amor e a Sua infinita misericórdia, louvo-o pelo dom da vida, pelas noites traiçoeiras, pelas manhãs de sol e pelos anjos de calças jeans que Ele colocou em meu caminho para dividir comigo as alegrias e tristezas e á Maria, Virgem Santíssima, a mãezinha que passa na frente intercedendo por mim diante de Deus.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (Reuni), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Edmilson Jacinto Marques, pela orientação e ensinamentos que muito contribuíram para a realização deste trabalho, além da amizade e carinho dedicado ao longo dessa jornada.

À Professora Valéria Wanderley-Teixeira pela contribuição para a realização deste trabalho.

À Professora Auristela Correia de Albuquerque pelas sugestões e colaboração no trabalho.

Ao Professor José Vargas de Oliveira, pela grande amizade e contribuição ao longo deste curso.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola da UFRPE pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Álvaro Teixeira pelo apoio e dedicação nos estudos histoquímicos.

À minha mãe, exemplo de honestidade e de perseverança, pelo apoio e orações, me ajudando a encarar as situações difíceis e tirar delas ensinamentos para alcançar meus objetivos.

As minhas irmãs Liliane e Taiane, pela torcida e carinho; Minha sobrinha Lívia, pela alegria gratuita, declarações de amor sincero e cantorias ao telefone me fazendo viajar mais de 1000 km em apenas um fechar de olhos.

À toda a minha família e amigos que sempre me apoiaram, sentimental ou financeiramente, me amparando nos momentos difíceis desta jornada.

Ao meu amor Marcos Antônio, pela confiança, força, compreensão, conselhos e amor, apoio crucial para superar a dor da distância e seguir em frente em busca do meu objetivo.

As minhas amigas Karine Nascimento, Larrisa Bittencourt, Marília Novaes, e Zita Kelle pela amizade, apoio orações e torcida constante.

À Willie Anderson, por estar comigo nesta jornada e ser referência de obstinação.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Insetos: Cíntia, Eliana, Ellen, Marco, Ricardo, Dávilla, Anderson e Bruno pela amizade, auxílio.

À minha “Girl” Cíntia Matias, pela acolhida, amizade e dedicação pessoal e profissional.

À minha “Coleguinha” Eliana Passos, pela amizade, apoio e dedicação para a realização deste trabalho.

À “Xuxu” Karla Fernanda, por dividir comigo alegrias, tristezas, preocupações e ser minha duplinha em todos os momentos.

À Felipe Colares, pela entrega, presteza e carinho mesmo sem me conhecer.

Aos amigos e colegas: Alice, Lílian, Cléo, Agna, Lily, Paulo, Dani, Kátia, Carla, Paula, Nane, Carol, Mariana, Alberto, Roberta, Nicolle, Vanessa, Bianca, Andresa, Tadeu, pela amizade através da acolhida e do companheirismo.

À Josy, que me acolheu no seio de sua família, me adotando e não me deixando esquecer que Deus está sempre ao meu lado.

À todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste sonho, meus sinceros agradecimentos.

"... que o caminho seja brando a teus pés, o vento sopra leve em teus ombros. Que o sol brilhe cálido sobre a tua face, as chuvas caiam serenas em teus campos. E até que eu de novo te veja, que Deus te guarde na palma de Sua mão."

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
LITERATURA CITADA.....	10
2 EFEITO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCH.) SOROK. SOBRE A FASE LARVAL E CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS DE <i>Diatraea</i> <i>flavipennella</i> (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	18
MATERIAL E MÉTODOS	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
LITERATURA CITADA.....	32

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, o que coloca o país na liderança mundial em tecnologia de produção de etanol. Além de matéria-prima para a produção de açúcar e álcool, seus subprodutos e resíduos são utilizados para co-geração de energia elétrica, fabricação de ração animal e fertilizante para as lavouras (EMBRAPA 2011).

Segundo a CONAB (2011), a área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira está estimada em aproximadamente 8,43 milhões de hectares. O estado de São Paulo continua sendo o maior produtor com 52,60% (4.436,53 mil hectares), seguido por Minas Gerais com 9,00% (759,21 mil hectares), Goiás com 7,97% (672,43 mil hectares), Paraná com 7,26% (612,25 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 5,70% (480,86 mil hectares), Alagoas com 5,39% (454,54 mil hectares), e Pernambuco com 3,85% (324,73 mil hectares).

Os problemas fitossanitários relacionados a essa cultura têm se constituído como um dos principais fatores limitantes para a produção e rendimento industrial, dentre eles destacam-se a incidência de insetos-praga. Nos canaviais de Pernambuco, entre as pragas de maior importância destacam-se a broca gigante *Telchin (Castnia) licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae), as brocas *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e *D. flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae) e a cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal.) (Hemiptera: Cercopidae) (Mendonça 1996, Marques *et al.* 2009).

Com relação às brocas do Gênero *Diatraea*, existem cerca de 21 espécies distribuídas nos canaviais do continente americano, no entanto, apenas algumas causam danos econômicos à

cultura. No Brasil, *D. saccharalis* e *D. flavipennella* infestam a cana-de-açúcar sendo a primeira de distribuição generalizada em todo o país, enquanto a segunda restringe-se apenas aos canaviais dos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, e no Norte e Nordeste do país (Mendonça *et al.* 1996, Pinto *et al.* 2006).

A broca da cabeça amarela da cana-de-açúcar, *D. flavipennella* causa danos diretos e indiretos. Os danos diretos decorrem da alimentação do inseto e caracterizam-se por: perda de peso, devido à abertura de galerias, morte da gema apical, encurtamento de entrenó, quebra da cana, enraizamento aéreo e produção das gemas laterais, reduzindo assim, a produção de cana e conseqüentemente, de seus produtos (Mendonça 1996; Gallo *et al.* 2002, Botelho & Macedo 2002). Os danos indiretos também são consideráveis, as galerias e orifícios deixados pelas lagartas servem como porta de entrada para microrganismos, predominantemente fungos que causam a podridão vermelha - *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium moniliforme* (Sheldon), estes invertem a sacarose, diminuindo a pureza do caldo e o rendimento em açúcar (Gallo *et al.* 2002).

Essa espécie possui características biológicas semelhantes a *D. saccharalis* em algumas fases, porém, podem ser facilmente distinguidas na fase de lagarta, na qual a *D. flavipennella* apresenta coloração amarelada com manchas castanhas dispostas de forma desuniforme, sem formação de linhas no dorso e sua cápsula cefálica possui cor amarelada ou marrom amarelada e a de *D. saccharalis* apresenta coloração branco leitoso com pontuações marrons dispostas uniformemente formando linhas no dorso e sua cápsula cefálica é marrom-escura (Mendonça 1996). Seu desenvolvimento é bastante irregular e o ciclo biológico em condições de laboratório, tem duração média de 65 dias, no qual o período de incubação dos ovos dura cerca de 8,35 dias, o período larval de 34,87 dias, pupa 12,75 e adultos 9,17 dias, sob temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $70 \pm$

10% de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h, para ovos, pupas e adultos, e para larvas $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h. (Freitas *et al.* 2007).

Em condições de campo, seus ovos são frequentemente depositados nas folhas ainda verdes, pelo menos 300 ovos/fêmea, tanto na face superior como inferior do limbo foliar e, ocasionalmente, na bainha. São de formato oval e achatado, sendo depositados em grupos de forma imbricada. Possuem forma elíptica e coloração amarelada, quando os embriões estão maduros, tornando-se escuros, quando são visíveis as cápsulas cefálicas das lagartas no interior dos mesmos (Botelho 2007, Freitas *et al.* 2007). Após a eclosão, as lagartas neonatas se deslocam de uma folha a outra, penduradas por fio de seda, alimentando-se inicialmente do parênquima foliar, fazendo galerias na nervura central. Depois de aproximadamente 15 dias, penetram no colmo, procurando as partes mais moles, na base do cartucho ou na região das gemas (Mendonça *et al.* 1996, Freitas *et al.* 2007).

O manejo fitossanitário de *D. flavipennella* é dificultado pelo comportamento da praga, a qual permanece a maior parte do seu desenvolvimento no interior do colmo (Pinto *et al.* 2006). O controle biológico natural da broca por meio da atuação dos artrópodes ocorre sobre todas as fases de desenvolvimento do inseto, sendo a participação mais significativa na fase de ovo. Além da ação dos inimigos naturais, o clima também atua sobre essa fase do ciclo, contribuindo para reduzir o número de ovos viáveis. Após a eclosão, a lagarta também está sujeita à ação desses controladores, que agem principalmente até a penetração desta no entrenó. O controle natural nesta fase fica em torno de 20% (Botelho & Macedo 2002), contudo as diversas fases de desenvolvimento da broca-da-cana também estão sujeitas a ação de diferentes inimigos naturais, tais como parasitoides, predadores e entomopatógenos (Nava *et al.* 2009).

Em relação ao controle biológico de *D. saccharalis* sabe-se que a utilização do parasitóide de larvas *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) é um sucesso, desde a sua

introdução até os dias atuais. O controle vem apresentando um aumento significativo, refletindo na redução dos danos (Botelho & Macedo 2002). No entanto, vem sendo observado maior predominância de *D. flavipennella*, nos canaviais de Alagoas e Pernambuco, apesar das constantes liberações de *C. flavipes* (Freitas *et al.* 2006).

Dentre os fungos mais utilizados em controle de pragas destacam-se *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, Alves & Lopes 2008).

Nas últimas décadas, em decorrência do uso indiscriminado e dos sérios danos que os inseticidas químicos têm causado aos ecossistemas o controle microbiano tem se intensificado principalmente na área agrícola, além disso, a utilização de agentes entomopatogênicos tem demonstrado vantagens em relação aos agrotóxicos, quando observados critérios como: 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 (Lacey *et al.* 2001).

O controle microbiano é um método importante utilizado no manejo de pragas da cana-de-açúcar, constituindo um dos programas de sucesso, destacando-se a participação do fungo *M. anisopliae* no controle das cigarrinhas, *M. posticata* e *M. fimbriolata* (Marques & Vilas Boas 1978, Lima & Marques 1985, Alves 1998a, Marques *et al.* 2008).

Mendonça *et al.* (1996), utilizaram cerca de 390 kg de conídios de *M. anisopliae* para o controle de ovos e larvas recém-eclodidas de *D. saccharalis* em canaviais com infestação elevada da praga na usina Agroserra no estado do Maranhão.

O fungo *Metarhizium* é descrito como um Ascomycota da família Clavicipitaceae que se caracteriza por infectar grande número de espécie de insetos, formando nestes uma camada

pulverulenta de conídios que os recobre com coloração variável, com tons que alternam do verde claro a escuro, acinzentados, ou ainda esbranquiçados com manchas verdes. Os conídios são normalmente uninucleados, hialinos ou fracamente coloridos e se formam sobre conidióforos simples, podendo se formar sobre ramificações compostas de um conjunto de micélio. As fiáldes clavadas ou cilíndricas são originárias do vértice de hifas e se colocam uma ao lado da outra. A massa estromática é composta de um agrupamento de conídios em cadeias que dão origem a estruturas prismáticas compostas (Alves 1998b).

Oliveira *et al.* (2008a), utilizando diferentes concentrações de *B. bassiana* em lagartas de *D. saccharalis*, observaram que a viabilidade larval foi reduzida significativamente na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} (56,67%). Outros parâmetros como a fecundidade, com média de 237 ovos, 48,60 %, de viabilidade de ovos e a longevidade de machos e fêmeas apresentando médias de 2,17 e 2,50 dias, respectivamente foram afetados, principalmente quando tratadas pela concentração 10^5 conídios mL^{-1} . E utilizando *M. anisopliae* na concentração 10^5 conídios mL^{-1} , verificaram diferenças significativas principalmente na viabilidade larval com média de 56,67 %, no período e viabilidade pupal com 7,86 dias e 53,33 %, na viabilidade de ovos de 52,34 % e na longevidade de machos e fêmeas apresentando 2,17 e 2,50 dias respectivamente.

Zappellini *et al.* (2010), selecionando isolados do fungo *M. anisopliae* e estudando sua interação com a broca *D. saccharalis*, observaram que dos 27 isolados de *M. anisopliae* testados todos foram patogênicos, pois a menor mortalidade foi de 49% referente ao isolado IBCB 158.

Valente *et al.* (2011) avaliaram a patogenicidade de isolados dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* na concentração 1×10^7 conídios mL^{-1} sobre ovos e lagartas de *D. flavipennella*. Os isolados de *M. anisopliae* testados causaram 100% de infecção sobre ovos de 24 e 48 horas de idade. Os isolados ESALQ 447 de *B. bassiana*, E9 e ESALQ 1189 de *M. anisopliae* causaram mortalidades médias de lagartas de 70,8, 72,2 e 61,2%, respectivamente. Em relação à

sobrevivência das lagartas, os isolados ESALQ 447 e ESALQ 1189 foram mais virulentos, com valores médios de 5,79 e 3,23 dias, respectivamente. A concentração letal (CL50) para estes isolados foi estimada em $1,2 \times 10^7$ conídios/mL. Em função desses resultados os autores concluíram que *B. bassiana* e *M. anisopliae* são patogênicos a ovos e lagartas da broca *D. flavipennella*.

Devido à grande variabilidade genética, um mesmo patógeno pode ter ação diferente sobre hospedeiros distintos, e os distúrbios fisiológicos causados podem depender da concentração utilizada. Fungos entomopatogênicos causam distúrbios fisiológicos, que refletem alterações no tegumento e nos sistemas circulatório, reprodutor, respiratório, digestivo e nervoso. Quando as hifas dos fungos atingem a hemocele do inseto, no processo de colonização, são formadas estruturas como protoplastos, blastósporos e outros corpos hifais visando uma possível proteção contra o sistema de defesa, e esses patógenos secretam ainda toxinas que podem afetar as células do hospedeiro (Alves 1998b, Alves & Pereira 1998).

Os insetos possuem um complexo e eficiente sistema de defesa contra patógenos, onde a primeira linha é constituída por barreiras físicas: tegumento e trato digestivo. Se essas barreiras forem rompidas serão desencadeadas respostas imunes celulares e humorais (Gillespie *et al.* 1997), sendo que os principais mecanismos de defesa são desempenhados pelos hemócitos, células livres circulantes na hemolinfa, cujo número e tipos de células 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 sua hemocele, participando ativamente dos mecanismos de defesa tais como: reconhecimento, fagocitose, encapsulação, coagulação, formação dos nódulos e citotoxicidade (Gupta 1985, Ratcliffe *et al.* 1985, Alves 1998b).

Os hemócitos reconhecem uma variedade de objetos 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 (proteínas que se fixam e transformam as propriedades da superfície dos patógenos) aglutinando os microorganismos e como receptores na membrana dos hemócitos (Lavine & Strand 2002).

O sucesso das respostas de defesa depende do número e dos tipos de hemócitos envolvidos nestes mecanismos (Russo *et al.* 2001). Essa variação nos hemócitos se dá em função de dois fatores: a) a produção de hemócitos de certos tipos para o combate aos organismos invasores; b) a imobilização de hemócitos em nódulos e cápsulas ao redor das células e tecidos invasores. Enquanto o primeiro fator tende a elevar o número de hemócitos tais como granulócitos responsáveis pela ação contra invasores, o segundo tende a diminuir o número de hemócitos como os plamatócitos envolvidos no processo de encapsulação (Alves & Pereira 1998).

Outros hemócitos também tem função na defesa, pois segundo Sass *et al.* (1994), os esferulócitos estão envolvidos no transporte de componentes cuticulares, o que pode explicar o seu maior percentual entre os hemócitos, pois as lagartas encontravam-se próximas à ecdise. Já os oenocitóides contêm precursores da fenoloxidase que, provavelmente, desempenha uma função na melanização (Jiang *et al.* 1997). Os prohemócitos são relatados como células-tronco que se diferenciam em um ou mais tipos de hemócitos e os adipohemócitos são conhecidos por serem responsáveis pela reserva energética e não têm função específica na defesa celular (Lavine & Strand 2002).

Falleiros & Gregório (1995), estudando os hemócitos de *D. saccharalis*, discutem que os hemócitos desempenham papel de grande importância para a vida desses organismos. Tais células assemelham-se aos leucócitos dos vertebrados, é 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, Alves 1998b, Falleiros *et al.* 2003).

Oliveira *et al.* (2008b), após inoculação de lagartas de *D. saccharalis* com o fungo *B. bassiana* verificaram que diferenças significativas 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} . E utilizando *M. anisopliae*, observaram que o fungo não interferiu quantitativamente nos granulócitos e plasmócitos e 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 por *M. anisopliae*.

As respostas humorais são realizadas por proteínas solúveis existentes na hemolinfa e normalmente levam algumas horas ou dias para sua completa expressão. Muitas dessas proteínas são inibidoras de fungos e bactérias. Em lepidópteros, dípteros e alguns coleópteros, ferimentos ou injeções de bactérias induzem a síntese de peptídios antibacterianos (Cociancich *et al.* 1994).

A forma ativa da enzima fenoxidase (PO) é responsável por essa atividade, constituindo um dos mais importantes componentes do sistema de defesa. A fenoxidase faz parte de uma cascata enzimática ativada pelos granulócitos através da liberação de fatores sinalizadores, acarretando a síntese de proteínas que aumentam a aderência dos plasmatócitos ao invasor e intensificam a liberação por outros granulócitos. Por meio da ativação de proteólise pela serina proteinases, a PO catalisa a oxigenação dos monofenóis e a oxidação de *o*-difenois a *o*-quinonas nas etapas iniciais da via de formação da melanina (Söderhäll 1982, Cerenius & Söderhäll 2004).

Ainda com relação às formas de defesa dos hospedeiros na presença dos parasitóides, foi detectado aumento da produção de óxido nítrico (NO) em hospedeiros imuno-reativos, fornecendo evidências que o NO seria a molécula efetora na interação com reativos intermediários para iniciar a atividade citotóxica empregada na defesa contra invasores (Nappi *et al.* 2000).

Estudos histoquímicos são baseados na determinação de conteúdos químicos presente nas células, através de reações químicas específicas ou moléculas de alta afinidade. A caracterização histoquímica dos hemócitos pode permitir a identificação dos diferentes tipos celulares, bem como a distinção de comportamento fisiológico entre eles.

Considerando a predominância de *D. flavipennella* nos canaviais pernambucanos, sua suscetibilidade ao fungo *M. anisopliae*, e a escassez de trabalhos a respeito desta broca, torna-se oportuno estudar sua interação com o fungo, analisando seus efeitos em diferentes concentrações sobre a fase larval da praga e possíveis interferências em parâmetros imunológicos como: dinâmica hemocitária, produção da fenoloxidase, proteínas totais e óxido nítrico, e no perfil histoquímico dos hemócitos.

Literatura Citada

- Alves, S.B. 1998a.** Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens, p. 21-37. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos, 2ª ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B. 1998b.** Fungos entomopatogênicos, p. 289-381. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos, 2ª ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B. & R.M. Pereira. 1998.** Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos, p. 39-52. In S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos, 2ª ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.A. & R.B. Lopes. 2008.** Controle microbiano de pragas na America Latina: Avanços e Desafios. Piracicaba, FEALQ, 414p.

- Botelho, P.S.M. & N. Macedo. 2002.** *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*, p. 477-494. In J.R.P Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento (eds.), Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo, Manole, 635p.
- Botelho, P.S.M. 2007.** Controle biológico e controle químico de pragas em cana-de-açúcar. Workshop tecnológico sobre pragas da cana-de-açúcar. Piracicaba, UFSC, 52p.
- Cerenius, L. & K. Soderhall. 2004.** The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunol. Rev. 198:116–126.
- Cociancich, S., P. Bulet, C. Hetru & J.A. Hoffmann. 1994.** The inducible antibacterial peptides of insects. Parasitol. Tod. 10: 132-139.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). 2011.** Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar. Safra 2011/2012, segundo levantamento. Fonte consultada: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_boletim_cana_portugues_-_agosto_2011_2o_lev.pdf> Acesso dia 15/11/2011.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2011.** Agencia de Informação Embrapa: Cana-de-açúcar. Fonte consultada: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/Abertura.html>> Acesso dia 01/10/2011.
- 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). Braz. Arch. Technol. 46: 287-294.
- Freitas, M.R.T., A.P.P. Fonseca, E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.L. Mendonça, R.R. Nascimento & A.E.G. Sant'Ana. 2006.** The predominance of *Diatraea flavipennella*

- (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane fields in the State of Alagoas, Brazil. Fl. Entomol. 89: 539-540.
- Freitas, M.R.T., E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.P. Fonseca, A.L. Mendonça, J.S. Santos, R.R. Nascimento & A.E.G. Sant'ana. 2007.** The biology of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) reared under laboratory conditions. Fl. Entomol. 90: 309-313.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Gillespie, J.P., M.R. Kanost, & T. Trenczek. 1997.** Biological mediators of insect immunity. Annu. Rev. Entomol. 42:611-643.
- 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, Oxford, Pergamon Press, 625p.
- 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.
- Jiang, H., C. MA, Y. Wang & M.R. Kanost. 1997.** Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit PPO-pl. Ins. Bio. Mol. Biol. 27: 835-850
- 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.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. Ins. Bio. Mol. Biol. 32: 1295-1309
- Lima, R.O.R. & E.J. Marques. 1985.** Controle biológico das pragas da cana-de-açúcar no Nordeste. Piracicaba, MIC- Instituto do açúcar e do álcool, p.5-8 (Boletim técnico)

- Marques, E.J., R.O.R. Lima, R.M. Andrade & J.M. Araújo Jr. 2008.** Controle biológico das brocas. *Diatraea* spp, *Telchin licus licus* e cigarrinhas *Mahanarva* spp em cana-de-açúcar, p. 95-111. In: M. Vezon, T.J. Paula Jr. & A. Pallini (orgs.), Avanços no controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa, EPAMIG, 283p.
- Marques, E.J., R.O.R. Lima & J.V. Oliveira. 2009.** Pragas da cana-de-açúcar: nordeste do Brasil. Recife, EDUFRPE, 54p.
- Marques, E.J. & A.M. Vilas Boas. 1978.** Avaliação de danos de *Mahanarva posticata* (Stal, 1855) (Hemíptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. An. Soc. Entomol. Brasil 7:99-104.
- Mendonça, A.F. 1996.** Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, p. 3-48. In A.F. Mendonça (ed.), Pragas da cana-de-açúcar. Maceió, Insetos & Cia, 239p.
- Mendonça, A.F., A.S. Seregatte, F.A. Moraes, W.H. Oliveira. 1996.** Manejo Integrado da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lep. Pyralidae) na Agroserra, Maranhão Brasil, p. 219-225. In A.F. Mendonça (ed.), Pragas da Cana-de-açúcar. Maceió, Insetos & Cia 239p.
- Nappi, A.J., E. Vass, F. Frey & Y. Carton. 2000.** Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. Nitric Oxide Biol. Chem. 4: 423-430.
- Nava, D.E., A.S Pinto & S.D.A. Silva. 2009.** Controle biológico da broca da cana-de-açúcar. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 28p. (Documentos 287)
- Oliveira, M.A.P., E.J. Marques, V. Wanderley-Teixeira & R. Barros, 2008a.** Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). Acta Sci. Biol. 30: 220-224.
- Oliveira, M.A.P., V. Wanderley-Teixeira, E.J. Marques, A.C. Albuquerque, F.A.B. Santos, R. Barros & A.A.C. Teixeira. 2008b.** Dinâmica hemocitária em *Diatraea saccharalis* F.

(Lepidoptera: Crambidae) desafiada imunologicamente pelos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Arq. Inst. Biol. 75: 173-179.

Pinto, A.S., J.F. Garcia & P.S.M. Botelho. 2006. Controle biológico de pragas da cana-de-açúcar, p. 65-74. In A.S. Pinto, D.E. Nava, M.M. Rossi & D.T. Malerbo-Souza (orgs.), Controle biológico de pragas: na prática. Piracicaba, FEALQ, 287p.

Ratcliffe, N.A., A.F. Rowley, S.W. Fitzgerald & C.P. Rhodes. 1985. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol. 97: 183-349.

Russo, J., M. Brehèlin & Y. Carton. 2001. Hemocyte changes in resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster* caused by virulent and a virulent 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.

Söderhäll, K. 1982. The prophenoloxidase activating system and melanization a recognition mechanism of arthropods: a review. Devel. Com. Immunol. 6: 601-611.

Valente, E.C.N. 2011. Efeito de fungos entomopatogênicos sobre formas imaturas de *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae). Dissertação de Mestrado, UFRPE, Recife, 44p.

Zappelini, L.O., J.E.M. Almeida, A. Batista Filho & F.H.C. Giometti. 2010. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). Arq. Inst. Biol. 77:75-82.

CAPÍTULO 2

EFEITO DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. SOBRE A FASE LARVAL E CARACTERÍSTICAS IMUNOLOGICAS DE *Diatraea flavipennella* F. (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)¹

JENNIFER GUIMARÃES¹, EDMILSON J. MARQUES¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA²,
AURISTELA C. ALBUQUERQUE³, ELIANA M. PASSOS¹, CÍNTIA C. M. SILVA¹

¹Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural do Pernambuco,
Rua Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 521171-900 Recife, PE

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

³Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de
Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

¹Guimarães, J., E.J. Marques, V. Wanderley-Teixeira, A.C. Albuquerque, E. M. Passos, C.C.M. Silva. Efeito de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre a fase larval e características imunológicas de *Diatraea flavipennella* Box. (Lepidoptera: Crambidae). A ser submetido.

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos deste fungo, em diferentes concentrações, sobre lagartas do terceiro instar de *Diatraea flavipennella* e investigar sua resposta imune, através da análise quantitativa dos tipos de hemócitos, da produção de fenoloxidase, proteína total e óxido nítrico, e possíveis diferenças no perfil bioquímico dos hemócitos. Foi observado o efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre lagartas de *D. flavipennella*, pulverizado nas concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 conídios/mL, no qual apresentou diferenças com relação ao período larval, prolongando até 72,0 dias nos tratamentos e 25,0 dias na testemunha. Os resultados referentes aos hemócitos revelaram que as células mais freqüentes quando pulverizado nas concentrações de 10^3 , 10^5 , 10^7 conídios/mL foram prohemócitos, esferulócitos, plasmócitos e granulócitos, em relação aos adipohemócitos e oenocitóides. O nível de oxido nítrico apresentou diferença entre a testemunha e a concentração 10^7 conídios/mL (24h), enquanto a atividade de fenoloxidase foi semelhante entre os tratamentos em 24h e superior na concentração 10^7 conídios/mL em 60 h.. A proteína total na concentração 10^7 conídios/mL (60h) foi maior diferindo da testemunha. No perfil bioquímico dos hemócitos, houve uma alteração em carboidratos, lipídios e proteínas em reação ao fungo. Os resultados indicam que o fungo *M. anisopliae* pode ser utilizado no Manejo Integrado de *D. flavipennella* nos canaviais nordestinos, por apresentar patogenicidade e interferir no seu desenvolvimento mesmo quando expostas a pequenas concentrações.

PALAVRAS-CHAVE: Broca da cana-de-açúcar, entomopatógeno, fase imatura, hemócitos, óxido nítrico, fenoloxidase, histoquímica

EFFECT OF *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. ON LARVAL STAGE
CHARACTERISTICS OF IMMUNOLOGICAL *Diatraea flavipennella* (BOX)
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

ABSTRACT –This work aimed to evaluate the effects of this fungus in different concentrations, on the third instar larvae of *Diatraea flavipennella* and to investigate the immune response, by analysing the types of hemocytes, phenoloxidase total protein and nitric oxide titration,, and possible differences in the biochemical profile of hemocytes. It was observed the effect of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *D. flavipennella*, sprayed at concentrations of 10^3 , 10^4 , 10^5 conidia/mL, which showed differences regarding to the larval period, which extended up to 72.0 days and 25.0 days in treatment the control, respectively. The results for hemocytes revealed that the most common cells when sprayed at concentrations of 10^3 , 10^5 , 10^7 conidia/mL were prohemocytes, spherulocytes, plasma cells and granulocytes in relation to adipohemocytes and oenocytoids. The nitric oxide titration was different between the control and the concentration 10^7 conidia/mL (24), while phenoloxidase activity was similar among treatments at 24h and was higher only after 60h at the concentration 10^7 conidia/mL. The total protein concentration in 10^7 conidia/ml (60h) was higher relatively to the control. In the biochemical profile of hemocytes there was an alteration of carbohydrates, lipids and total proteins in reaction to the fungus. The results indicate that *M. anisopliae* may be used in Integrated Pest Management of *D. flavipennella* in northeastern sugar crops, because of the its pathogenicity and interfere with their development even when exposed to small concentrations.

KEY WORDS: Sugarcane borer, entomopatogenic, larval stage, hemocytes, nitric oxide, phenoloxidases, histochemistry

Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) constitui uma das principais culturas no Brasil, sendo considerada de grande importância socioeconômica, devido à sua matéria prima na produção de açúcar, álcool, co-geração de energia, ração animal, adubos orgânicos, além de favorecer a mão de obra e a geração de divisas com a exportação de açúcar, bem como de etanol, reduzindo a importação de petróleo (Mendonça 1996, Cesnik & Miocque 2004, EMBRAPA 2011, MAPA 2011). No entanto, problemas fitossanitários ocasionados por pragas do gênero *Diatraea* como a broca da cabeça amarela da cana-de-açúcar, *Diatraea flavipennella* Fabr. (Lepidoptera: Crambidae) causam danos diretos e indiretos a essa cultura, resultando em perdas significativas de receita (Mendonça 1996, Freitas *et al.* 2007).

O controle de *D. flavipennella* é dificultado uma vez que, a fase larval permanece a maior parte do seu desenvolvimento no interior do colmo. Segundo Mendonça *et al.* (1996), há um complexo de parasitóides, predadores e agentes entomopatógenos que ocorrem naturalmente no agroecossistema da cana-de-açúcar controlando as diversas espécies de *Diatraea* na América Latina. Dentre os fungos entomopatogênicos, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., são utilizados como potentes agentes no controle biológico de insetos (Hegedus & Khachatourians 1996).

Oliveira *et al.* (2008a), utilizando diferentes concentrações de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em larvas de *D. saccharalis*, observaram que a viabilidade larval foi reduzida, significativamente, na concentração de 10^5 conídios mL⁻¹, e Zappellini *et al.* (2010), selecionando isolados do fungo *M. anisopliae* e estudando sua interação com a broca *D. saccharalis*, observaram que dos 27 isolados de *M. anisopliae* testados todos foram patogênicos a broca, pois a menor mortalidade foi de 49% referente ao isolado IBCB 158.

Por outro lado, os insetos possuem um complexo e eficiente sistema de defesa contra patógenos, na qual, a primeira linha é constituída por barreiras físicas: tegumento e trato digestivo, que se forem rompidas, desencadeiam respostas imunes celulares e humorais (Gillespie *et al.* 1997). As respostas celulares ocorrem com a participação de hemócitos onde o sucesso da defesa depende do número e dos tipos dessas células envolvidas nestes mecanismos (Russo *et al.* 2001)

Alterações na quantidade de hemócitos em insetos ocasionadas por fungos entomopatogênicos têm sido relatadas por alguns pesquisadores. Oliveira *et al.* (2008b), relatou uma variação na dinâmica hemocitária após inoculação em lagartas de *D. saccharalis* com o fungo *M. anisopliae* e *B. bassiana*, enquanto Cunha *et al.* (2009) a dos operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) inoculados também com *M. anisopliae*.

A defesa humoral dos insetos inclui melanização, fenoloxidase, aumento na produção de proteases e enzimas, bem como a síntese de potentes peptídeos antimicrobianos (Boman 1991, Brey *et al.* 1993, Gillespie *et al.* 1997, Löwenberger 2001). Muitos estudos têm relacionado ainda à produção de óxido nítrico (NO) com os efeitos citotóxicos contra patógenos (Nappi & Ottaviani 2000, Gourdon *et al.* 2001, Foley & O`Farel 2003).

Pech & Strand (1996) relataram que funções imunes exercidas por um tipo de hemócito em uma determinada espécie podem ser desempenhadas por um tipo celular diferente em outra espécie. Os autores advogam que o estudo da função no processo de defesa pode ser usado na caracterização de um tipo celular desde que seja correlacionada com a ultra-estrutura, morfologia e principalmente com o seu conteúdo bioquímico.

Assim, este trabalho objetivou analisar os efeitos de *M. anisopliae* em diferentes concentrações sobre a fase larval de *D. flavipennella*, a interferência sobre parâmetros

imunológicos, como dinâmica hemocitária, produção da fenoloxidase, óxido nítrico, proteínas totais e possíveis diferenças no perfil histoquímico dos hemócitos.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Patologia de Insetos e de Interação Inseto-tóxico 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.

Criação de *Diatraea flavipennella*. A criação das lagartas para os bioensaios foi realizada em condições de laboratório (27 ± 1 °C, UR de 70% e fotofase de 12h) e mantidas sob dieta artificial de Hansley & Hammond (1968) modificada por Araújo *et al.* (1985) a qual é constituída de farelo de soja, germe de trigo, açúcar, sais de Wesson, ácido ascórbico, solução vitamínica, água e anticontaminantes. Ao formarem pupas essas, foram transferidas para câmara úmida até a emergência dos adultos. Os adultos foram confinados em gaiolas de PVC, medindo 15x22cm (diâmetro e altura). O interior da gaiola foi revestido com papel sulfite como substrato para as posturas e como substrato alimentar, foi oferecido solução de mel a 5% e água. Os ovos coletados foram esterilizados com formol (3%) e sulfato de cobre (1%), colocados para secar e em seguida armazenados em câmara úmida até seu escurecimento e posterior eclosão quando então, realizou-se a distribuição das lagartas neonatas para tubos de fundo chato contendo dieta de alimentação. Após trinta dias, as lagartas foram transferidas para caixas plásticas contendo dieta de realimentação, onde foram revisadas, periodicamente, para retirada de pupas. Estas, quando formadas, foram selecionadas e acondicionadas em câmara úmida para a emergência dos adultos.

Obtenção e Multiplicação do Isolado. Para a realização deste estudo, foi utilizado o isolado ESALQ 1189 do fungo *M. anisopliae*, proveniente da Micoteca do Laboratório de Patologia de

Insetos (UFRPE), originado de Piracicaba-São Paulo e obtido do solo. O isolado foi conservado a $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ em tubos com meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar mais o antibiótico sulfato de streptomicina (BDA+A) e óleo Nujol[®] esterilizado e repicado em placas de Petri, com auxílio de uma pinça, contendo BDA+A (antibiótico). Após sete dias, foi novamente repicado para placas contendo meio completo (MC), constituído de extrato de levedura, glucose, sais minerais, ágar, e água destilada, sendo uniformemente espalhado por toda a extensão da placa, com o auxílio de alça de Drigalsky. As placas permaneceram em estufa incubadora B.O.D. a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotofase de 12h para a germinação e crescimento do isolado.

Preparo e Viabilidade das Suspensões. As suspensões fúngicas foram obtidas mediante adição de 10 mL de água destilada esterilizada mais espalhante adesivo Tween[®] 80 a 0,01% (ADE + E), em placas contendo meio de cultura e o fungo, que foram aferidas mediante quantificação em câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio óptico de luz, sendo posteriormente ajustadas para a concentração 10^7 conídios mL^{-1} . A avaliação da viabilidade dos conídios foi determinada através da contagem dos germinados e não germinados, em microscópio óptico de luz, em até 24 horas após o plaqueamento em BDA + A, sendo tomados 100 conídios por placa para obtenção da porcentagem de germinação (Alves & Moraes 1998).

Efeito de *M. anisopliae* sobre Lagartas de *Diatraea flavipennella*. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos com oito repetições com cinco lagartas de terceiro ínstar, as quais foram pulverizadas com as concentrações fúngicas de 10^3 , 10^4 , 10^5 conídios mL^{-1} e a testemunha com água destilada esterilizada acrescida de espalhante adesivo Tween[®] 80 a 0,01% (Oliveira *et al.* 2008a). A pulverização das suspensões sobre as lagartas foram feitas com o auxílio de um microatomizador de marca Paasche “VL”, utilizando-se 2 mL da suspensão por tratamento. Após a aplicação do fungo, as lagartas foram transferidas com auxílio de uma pinça para recipientes plásticos individuais, medindo 4x2cm (diâmetro e altura), e

acomodadas em estufa incubadora B.O.D. a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $70 \pm 10\%$. Cada recipiente continha um pedaço de colmo de cana, objetivando evitar os anticontaminantes de dietas artificiais, que poderiam prejudicar o efeito do fungo sobre as larvas. As observações foram realizadas diariamente, e as lagartas mortas colocadas em placas Petri para confirmação do agente causal. O experimento foi mantido a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e $70 \pm 5\%$ UR e fotofase de 12h. A partir dos dados de mortalidade confirmada foram estimados as curvas de sobrevivência através do método de Kaplan-Meier, as quais foram comparadas pelo teste de Log-Rank por pares de tratamentos usando o Proc Lifetest do SAS (SAS Institute 1999-2001).

Contagem Total e Diferencial de Hemócitos. Na análise do número total e diferencial dos hemócitos, utilizaram-se as concentrações 10^3 , 10^5 e 10^7 conídios por mL do fungo *M. anisopliae* mais a testemunha com água destilada esterilizada acrescida de espalhante adesivo Tween® 80 a 0,01% (Oliveira *et al.* 2008b). Dez microlitros de hemolinfa foram coletadas de 10 lagartas, nos intervalos de 24, 36, 48, e 60 horas pós-inoculação, separadas 40 lagartas por concentração. Para a retirada dessas amostras, foi realizada uma incisão com o auxílio de uma tesoura, na região mesopleural da lagarta, e com uma micropipeta coletou-se a hemolinfa. Em seguida o material foi colocado em tubo Eppendorf de 1 mL contendo 20 μL de tampão fosfato salino pH 7 (PBS), caracterizado como uma repetição. Logo após, com o auxílio de uma micropipeta (Kacil), 10 μL foram transferidas para câmara de Neubauer e o número total de hemócitos por microlitro de hemolinfa foi determinado. Para contagem diferencial também utilizou-se 10 μL de hemolinfa para confecção dos esfregaços, que foram mantidos por aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente, para permitir uma melhor adesão dos hemócitos à lâmina. Após este tempo, o material foi fixado em metanol por cinco minutos, sendo em seguida submetido à coloração pelo Giemsa, também por cinco minutos, e posteriormente observado ao microscópio de luz OLYMPUS® BX-49, utilizando-se a objetiva de 100X. O percentual dos tipos de células

presentes na hemolinfa de cada tratamento foi determinado, a partir de 10 repetições, nas quais 300 células foram contadas para cada indivíduo, seguindo os métodos de Falleiros *et al.* (2003), Oliveira *et al.* (2008b) e Cunha *et al.* (2009). Os resultados da contagem total e diferencial foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial. No caso de resposta significativa, de hemócitos em função dos intervalos de tempo de avaliação, os resultados foram submetidos a análise de regressão. As médias foram comparadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo os dados de plasmatócitos transformados em $\sqrt{(x + 0,5)}$ e os de granulócitos, prohemócitos, oenocitóides, adipohemócitos e esferulócitos transformados em arcoseno da $\sqrt{(x / 100)}$. Todas as análises foram conduzidas empregando o programa estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

Análise dos Níveis de Óxido Nítrico, Fenoloxidase e Proteínas Totais na Hemolinfa. Foram realizadas comparações das concentrações do íon nitrito (NO₂⁻) nas amostras de hemolinfa coletadas nos intervalos de 24 e 60 horas após tratamento com as suspensões de *M. anisopliae* nas concentrações de 10³ e 10⁷ conídios por mL mais a testemunha com água destilada esterilizada acrescida de espalhante adesivo Tween® 80 a 0,01%. Dois intervalos de tempo (36 e 48h) e uma concentração do fungo (10⁵ conídios por mL) não foram utilizados para avaliação desses parâmetros, pois não apresentaram diferenças com relação ao número total e diferencial dos hemócitos. A produção de óxido nítrico foi determinada com base no reagente de Griess (Green *et al.* 1981), conforme metodologia descrita em Faraldo *et al.* (2005). Para constituir a amostra, foram coletados 20 µL de hemolinfa de lagartas de terceiro ínstar, depositadas em tubo Eppendorf contendo 90 µL de sulfanilamida (1%) em H₃PO₄ (5%). Após coleta, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da utilização. Para determinar as concentrações de NO₂⁻, uma alíquota de 30 µL de cada amostra/intervalo/tratamento (10 amostras no total) foi depositada em placa de fundo chato de 96 poços em triplicata, depois foi adicionado 30µL de sulfanilamida

(1%) em H₃PO₄ (5%). Após 10 minutos ao abrigo da luz, foi adicionado 30µL de naphthylenediamine dihydrochloride (NEED, Sigma, St. Louis, MO). Após 10 minutos, também ao abrigo da luz, a absorbância foi medida com um leitor de microplacas (Biotek®) com filtro de 562 nm. A quantidade de nitrito (NO₂⁻) nas amostras foram correlacionadas com valores de absorbância obtidos a partir da curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) como referência. Para as análises dos níveis de fenoxidase, uma alíquota de 10µL de hemolinfa foi coletada e depositada em tubo Eppendorf contendo 100µL de tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,0) resultando na amostra. Esta por sua vez foi depositada em placa de fundo chato de 96 poços em triplicata, contendo Ldihidroxifenilalanina (L-DOPA) e tampão PBS (pH 7,0). As medidas de absorbância da atividade da PO foi lida, durante 30 minutos com intervalos de um minuto, em filtro de 490 nm em leitora (Biotek®) utilizando o software Gen 5. A concentração de proteína total das amostras foi determinada, utilizando-se kit comercial baseado no teste de Bradford (Bradford 1976) e albumina de soro bovino (BSA) para a curva padrão. Os dados de óxido nítrico e proteína total foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, empregando o programa estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

Histoquímica. Para a marcação das substâncias nos hemócitos foram utilizadas diferentes técnicas de coloração. O carboidrato foi marcado com a técnica de coloração P.A.S – Ácido Periódico de Schiff, os lipídios e a mucina com os corantes Sudan Black e Tricrômico de Mallory respectivamente (Junqueira & Junqueira 1983). A captura de imagens foi feita por meio de uma câmera de vídeo Sony®, acoplada a um microscópio Olympus® BX50.

Resultados e Discussão

Efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre Lagartas de *Diatraea flavipennella*. A viabilidade de *M. anisopliae* testado sobre lagartas de *D. flavipennella* foi superior a 95% e apresentou atividade patogênica.

Com a exposição das lagartas as diferentes concentrações de *M. anisopliae*, verificou-se um prolongamento no período larval além de ocasionar a morte das lagartas, diferindo da testemunha, indicando que este parâmetro biológico foi afetado pela ação do patógeno (Fig. 1). Assim a média da sobrevivência das lagartas na testemunha foi de 22,4 dias, pois a partir do 25º dia todas as lagartas passaram para a fase de pupa. Os tratamentos 10^3 e 10^4 conídios/mL demonstraram efeito subletal prolongando o período larval das que sobreviveram em média por 45,4 e 52,1 dias, respectivamente. Na maior concentração, 10^5 conídios/mL, a sobrevivência média foi reduzida para 28,1 dias apresentando efeito direto na mortalidade das lagartas (Tabela 1).

De acordo com Oliveira *et al.* (2008a), utilizando o isolado E9 do fungo *M. anisopliae*, foi observado que a viabilidade larval em *D. saccharalis* foi afetada em 34,2% pela concentração de 10^5 conídios mL⁻¹. Os autores verificaram ainda que mais de 50% das larvas restantes atingiram a fase de pupa. De acordo com os resultados desse trabalho, *D. flavipennella* parece ser mais suscetível ao *M. anisopliae* que *D. saccharalis*, por promover o alongamento do período larval e os insetos não conseguem atingir a fase de pupa. O alongamento em uma das fases de desenvolvimento do inseto após tratamento com concentrações 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios mL⁻¹ de *M. anisopliae* também foram observados por Zimmer *et al.* (2010), em relação ao desenvolvimento pupal de *Muscina stabulans* (F.) (Diptera: Muscidae) o autor explicou que em situações adversas, os dípteros tendem a prolongar o tempo de desenvolvimento para completar seu ciclo, o que pode também ocorrer com os lepidópteros.

Contagem Total e Diferencial dos Hemócitos. As análises de variância para as interações imunológicas celulares das lagartas de *D. flavipennella* pulverizadas com *M. anisopliae* mostraram efeitos sobre a média do total de hemócitos nos diferentes tempos de avaliação. A Figura 2 mostra que com 24 horas após a pulverização, o tratamento 10^3 conídios mL^{-1} apresentou a maior média de hemócitos diferindo apenas do tratamento 10^7 conídios mL^{-1} , o qual reduziu significativamente o número dessas células. Para a avaliação com 36 horas, os tratamentos 10^3 e 10^5 conídios mL^{-1} apresentaram as maiores médias de hemócitos, diferindo apenas da testemunha. Nas 48 horas após a pulverização, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Por fim, com 60 horas, o tratamento 10^7 conídios mL^{-1} , apresentou a maior média, diferindo apenas do tratamento 10^3 conídios mL^{-1} . A redução imediata (24h) dos hemócitos na concentração 10^7 conídios mL^{-1} pode está relacionada à maior quantidade de substância liberada pelo fungo, pois, de acordo com Griesch & Vilcinskas (1998) ao estudarem o efeito do *M. anisopliae* sobre os hemócitos de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) concluíram que o fungo pode produzir proteases extracelulares que parecem participar na supressão da resposta imunológica celular. Como a não diferiu estatisticamente da concentração de 10^5 conídios mL^{-1} na avaliação do número total de hemócitos no intervalo de 24h, pode ter refletido na menor sobrevivência larval. O aumento significativo do número de hemócitos na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} no intervalo de 60h pode está relacionado ao aumento do número de prohemócitos que teve sua produção aumentada afim de originar células que atuassem na defesa. Variação no número de hemócitos ocasionadas por fungos entomopatogênicos também foi observada por Balavenkatasubbaiah & Nataraju (2005), sugerindo que esse fato se deve ao progresso da infecção.

A partir da contagem diferencial, os tipos de hemócitos identificados em todos os tratamentos foram plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, prohemócitos, adipohemócitos e

oenocitóides, seguindo um mesmo padrão morfológico observado por outros autores para a ordem Lepidoptera (Falleiros *et al* 2003, Negreiro *et al.* 2004, Correia 2008, Oliveira *et al.* 2008).

Utilizando análise de regressão foram obtidas equações, de acordo com a significância ($P \leq 0,05$), para os esferulócitos, granulócito e prohemócito, que explicam a dinâmica hemocitária ao longo do tempo/tratamento (Tabela 2). Os adipohemócitos, plamatócitos e oenocitoides não apresentam equações de regressão, pois os percentuais da contagem diferencial destas células não se ajustaram ao modelo estatístico.

A dinâmica hemocitária dentro dos tratamentos de avaliação se manteve constante, apresentando variação ao longo do tempo para os adipohemócitos e esferulócitos. Os adipohemócitos apresentaram porcentagens menores no decorrer do tempo. Nos esferulócitos houve variação ao longo do tempo, exceto para o tratamento 10^5 que não apresentou diferença (Tabela 3).

Para os plasmatócitos, prohemócitos, granulócitos e oenocitóides a dinâmica hemocitária nos tratamentos foi variável ao longo do tempo. Os plasmatócitos diminuíram significativamente em relação à testemunha no intervalo de 36h para as maiores concentrações, e nos intervalos 48 e 60h para as concentrações de 10^7 conídios mL^{-1} e 10^5 conídios mL^{-1} , respectivamente. Os prohemócitos aumentaram significativamente em relação à testemunha nos intervalos de 24h, na concentração 10^5 conídios mL^{-1} , 36h, nas maiores concentrações, 48h na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} e com 60h na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} . Os granulócitos apresentaram um comportamento similar ao da testemunha no período de 24h, no entanto nos intervalos de 36 e 60h aumentaram consideravelmente na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} , enquanto que com 48h houve redução nas duas maiores concentrações. Para os oenocitóides houve um aumento apenas no intervalo de 48 horas para a concentração 10^3 conídios mL^{-1} diferindo da testemunha e da concentração 10^5 conídios mL^{-1} (Fig. 3).

Os prohemócitos, por serem considerados células-tronco, não participariam diretamente dos processos de defesa (Andrade *et al.* 2004), contudo o comportamento relatado mostra que ao longo do tempo de infecção e na maior concentração há uma maior produção dessa célula, sugerindo a sua atuação na defesa direta ou indiretamente através da diferenciação em um ou mais tipos de hemócitos. E ainda, de acordo com Ribeiro & Brehélin (2006), o mesmo tipo celular pode exibir diferentes funções e a mesma função pode ser desempenhada por diferentes tipos celulares.

O sucesso das respostas de defesa depende do número e dos tipos de hemócitos envolvidos nestes mecanismos (Russo *et al.* 2001). Essa variação nos hemócitos se dá em função de dois fatores: a) a produção de hemócitos de certos tipos para o combate aos organismos invasores; b) a imobilização de hemócitos em nódulos e cápsulas ao redor das células e tecidos invasores. Enquanto o primeiro fator tende a elevar o número de hemócitos tais como granulócitos responsáveis pela ação contra invasores, o segundo tende a diminuir o número de hemócitos como os plasmatócitos envolvidos no processo de encapsulação (Alves & Pereira 1998). Essas informações confirmam os resultados obtidos no presente estudo para os plasmatócitos e granulócitos, visto que os plasmatócitos foram reduziram nas maiores concentrações, a partir de 24h, enquanto que os granulócito aumentaram nos intervalos de 36 e 60h. Negreiro *et al.* (2004) comentaram que a função dos granulócitos e plasmatócitos está relacionada, principalmente, à fagocitose e formação da cápsula e nódulo, neste caso pode-se relacionar com o comportamento observado neste estudo, no momento que as estruturas do fungo atingem a hemocele do inseto.

A variação dos esferulócitos pode está relacionada aos danos mecânicos por crescimento de hifas e produção de toxinas (Inglis *et al.* 2001), pois, de acordo com Sass *et al.* (1994) essas células estão envolvidas no transporte de componentes cuticulares. A diminuição dos adipohemócitos pode ter ocorrido porque eles não têm função específica na defesa celular e, por

consequência são mais vulneráveis aos patógenos (Lanot *et al.* 2001, Lavine & Strand 2002). Já os oenocitóides contêm precursores da fenoloxidase que provavelmente desempenha uma função na melanização (Jiang *et al.* 1997).

Níveis de Óxido Nítrico, Fenoloxidase e Proteínas Totais na Hemolinfa. A produção média de óxido nítrico para as lagartas de *D. flavipennella* avaliadas 24 horas após a pulverização com *M. anisopliae*, apresentou diferença significativa entre a testemunha e o tratamento 10^7 . Na avaliação 60 horas após a pulverização não houve diferença significativa entre os tratamentos ($F_{2,27} = 0,36$, $P 0,7028$) (Fig. 4).

Esse resultado sugere que este tipo de reação ocorre geralmente logo após a percepção do corpo estranho, corroborando com outros trabalhos que mostram o aumento da produção de óxido nítrico na hemolinfa de insetos como resposta aos agentes estranhos (Molina-Cruz *et al.* 2007). Faraldo *et al.* (2005) verificaram elevada produção desta molécula em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae) após inoculação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen), verificando diferenças entre os diferentes períodos de avaliação, pois um pico na produção ocorreu com 24 horas, seguido por uma redução 48 horas após tratamento. Os autores atribuíram este fato a possível tentativa de controlar a proliferação do microrganismo na hemocele.

A atividade da fenoloxidase observada na hemolinfa das lagartas de *D. flavipennella*, não tratadas e tratadas com suspensões fúngicas nas concentrações testadas, apresentaram comportamentos diferentes nos intervalos de tempo avaliados. No intervalo de 24h, a atividade enzimática foi semelhante para os tratamentos, ocorrendo um aumento gradativo da atividade da enzima ao longo do tempo. Já no intervalo de 60 horas, o tratamento 10^7 conídios/mL se mantém em níveis constantes em relação ao intervalo anterior, enquanto o tratamento 10^3 conídios/mL e a testemunha apresentam uma atividade da fenoloxidase inferior (Figs. 5A e 5B).

O comportamento da testemunha e do tratamento 10^3 conídios/mL pode está relacionado ao processo de muda da lagarta, no qual ocorre a melanização e consequente ativação da profenoloxidase. Visto que, com um tempo maior de contato com o fungo, e nível mais avançado de infecção, a atividade da enzima é menor que no primeiro intervalo de tempo. Já no tratamento 10^7 conídios/mL, ocorre uma resposta imediata a infecção pelo fungo, a qual se mantem ao longo da infecção, as 60 horas. Isso ocorre devido à fenoloxidase catalisar a oxidação de compostos fenólicos presentes na hemolinfa e na cutícula dos insetos, tendo como produto final a melanina, que participa de processos fisiológicos tais como a esclerotização da cutícula, cicatrização de feridas e defesas imunológicas (Ashida *et al.* 1983, Brookman *et al.* 1989, Rowley 1990, Marmara *et al.* 1993, Lee *et al.* 1999, Silva *et al.* 2000).

Embora pesquisas relacionem tolerância a patógenos com reações de melanização e consequente envolvimento da cascata de 22 profenoloxidase (Wilson *et al.* 2001), pouco se sabe sobre a atividade da fenoloxidase em insetos contaminados por fungos. Os resultados apresentados também mostraram que, numericamente, houve uma redução dos oenocitóides no intervalo de 60h na concentração 10^7 conídios/mL, podendo assim confirmar a participação dessas células na produção da fenoloxidase nessa espécie.

A quantidade de proteína total na hemolinfa de *D. flavipennella* não apresentou diferença entre os tratamentos no intervalo de 24 horas, com 60 horas o tratamento 10^7 conídios/mL de *M. anisopliae* apresentou um aumento de proteína total em relação à testemunha, (Fig. 6). Esse aumento, provavelmente, está associado a elevação da atividade da fenoloxidase observada nesse intervalo, na maior concentração.

Histoquímica. As análises histoquímicas dos hemócitos de todos os tratamentos estão contidas na Tabela 4. Histoquimicamente apenas os plamatócitos, granulócitos, prohemócitos e esferulócitos, não foram reativos ao PAS na presença do fungo, enquanto que os adipohemócitos e oenocitóides

não reagiram ao corante em nenhum dos tratamentos (Figs. 7 e 8). Quanto à reação pelo Sudan Black verificou-se que os plasmatócitos no tratamento testemunha, e os granulócitos e adipohemócitos em todos os tratamentos apresentaram-se reativos. O prohemócito foi reativo no tratamento testemunha e em presença do fungo apresentou reação moderada. Já os esferulócitos e oenocitóides não foram reativos (Fig. 9 e 10). Em relação ao tricrômico de Mallory os plasmatócitos não foram reativos na testemunha, porém mostrou-se reativo na presença do fungo. Os granulócitos foram reativos em todos os tratamentos. Os prohemócitos apresentaram moderada reação na testemunha, sendo reativos na presença do fungo. Adipohemócitos apresentaram reação moderada em todos os tratamentos, enquanto que esferulócitos e oenocitóides não reagiram (Fig. 11 e 12).

O fungo, nas concentrações avaliadas, parece ter interferido no conteúdo de carboidrato, lipídios e mucina nos hemócitos, exceto para os oenocitóides e adipohemócitos. A reação negativa observada nos adipohemócitos é pertinente uma vez que essa célula não participa no processo de defesa, enquanto que os oenocitóides contribuem na resposta humoral (Jiang *et al.* 1997, Lavine & Strand 2002). Como os carboidratos são compostos altamente energéticos utilizados em diversos processos fisiológicos, como defesa do organismo, reparação tecidual, proliferação celular etc, sendo mobilizados de acordo com a necessidade metabólicas da célula, é natural que a redução desse composto nos plasmatócitos, granulócitos, prohemócitos e esferulócitos tenha ocorrido. A presença do fungo parece estimular a liberação de enzimas e reservas de energia dessas células, em resposta ao processo de reparação ou de defesa, o que também foi observado por Cunha *et al.* (2012) em células digestivas de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae), alimentados com lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: noctuidae) criados em algodão Bt.

Os plasmatócitos e esferulócitos sofreram redução no conteúdo de lipídios, podendo indicar que a taxa metabólica dessas células na presença do fungo não permite o acúmulo desse composto. No entanto, o fungo parece estimular a produção de mucinas nos plasmatócitos e prohemócitos. Segundo Nieuw Amerogen & Veerman (2002), as mucinas são glicoproteínas com função antimicrobiana que atuam na agregação e encapsulação de invasores, em vertebrados e parece ter a mesma função nos insetos, o que justifica a sua maior produção na presença do fungo independente da concentração ou tempo de avaliação.

Nesse estudo foi possível mostrar que *M. anisopliae* em baixas concentrações promove alongamento do período larval de *D. flavipennella*, comprometendo a conclusão do seu ciclo biológico, além de interferir na dinâmica hemocitária, nos teores de fenoloxidase, óxido nítrico e proteína total, bem como o conteúdo bioquímico dos hemócitos, contudo a defesa foi superada pelo patógeno através dos danos mecânicos causados pelo crescimento de hifas e pela produção de toxinas. Assim, conclui-se que o fungo *M. anisopliae* pode ser utilizado no Manejo Integrado de *D. flavipennella* nos canaviais nordestinos, por apresentar patogenicidade e interferir no seu desenvolvimento mesmo quando expostas a pequenas concentrações.

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, 2ª ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B., J.E.M. Almeida, A.J. Moino & L.F.A. Alves. 1998.** Técnicas de laboratório, p. 637-711. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos, 2ª ed. 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, 2ª ed Piracicaba, FEALQ, 1163p.

- Andrade, F.G., M.C.C. Negreiro & A.M.F. Falleiros. 2004.** Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). Arq. Inst. Biol. 71: 391-398.
- Araújo, J.R., P.S.M. Botelho, S.M.S.S. Araújo, L.C. Almeida & N. Degaspari. 1985.** Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Rev. Tecnol. Indúst. Açuc. Alcool. 36: 45-48.
- Ashida, M., Y. Ishizaki & H. Iwahana. 1983.** Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell wall or b-1,3-gulcans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 113: 562-564.
- Balavenkatasubbaiah, M & B. Nataraju. 2005.** Hemocyte changes during the progressive infection of *Beauveria bassiana* in different breeds of silkworm (*Bombyx mori* L.). Madras Agric. J. 92: 431-437.
- Boman, H.G. 1991.** Antibacterial peptides: key components needed in immunity. Cell 65: 205–207.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive methods for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248–254.
- Brey, P.T., W.J. Lee, M. Yamakawa, Y. Koizumi, S. Perrot, M. Francois & M. Ashida. 1993.** Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6275–6279.
- Brookman, J.I., A.F. Rowley & N.A. Ratcliffe. 1989.** Studies on nodule formation in locust following injection of microbial products. J. Invertebr. Pathol. 53: 315-323.
- Cesnik, R. & J. Miocque. 2004.** Histórico, p. 23-30. In R. Cesnik & J. Miocque (eds.), Melhoramento da cana-de-açúcar. Brasília, Embrapa, 307p.

- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira & J.B. Torres. 2008.** Dinâmica hemocitária em larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Bol. Sanid.Veg. Plagas 34: 357-365.
- Cunha, F.M., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, A.C. Albuquerque, L.C. Alves & E.A.L. Lima. 2009.** Caracterização dos hemócitos de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) e avaliação hemocitária após parasitismo por *Metarhizium anisopliae*. Neotrop. Entomol. 38:293-297.
- Cunha, F.M., F.H. Caetano, V. Wanderley-Teixeira, J.B. Torres, A.A.C. Teixeira & L.C. Alves. 2012.** Ultra-structure and histochemistry of digestive cells of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with prey reared on Bt-cotton. Micron 43: 245–250
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2011.** Agencia de Informação Embrapa: Cana-de-açúcar. Fonte consultada: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/Abertura.html>> Acesso dia 01/10/2011.
- 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). Braz. Arch. Technol. 46: 287-294.
- Faraldo, A.C., A. Sanunes, L.H. Faccioli, E.A. Del Bel & E. Lello. 2005.** Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. Nitric Oxid. 13:240-246.
- Freitas, M.R.T., E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.P. Fonseca, A.L. Mendonça, J.S. Santos, R.R. Nascimento & A.E.G. Sant'ana. 2007.** The biology of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) reared under laboratory conditions. Fl. Entomol. 90: 309-313.
- Foley, E. & P.H. O'Farrel. 2003.** Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. Genes Develop. 17: 115-125.

- Gillespie, J.P., M.R. Kanost, & T. Trenczek. 1997.** Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42:611-643.
- Green, L.C., K.R., De Luzuriaga, D.A. Wagner, W. Rand, N. Istfan, V.R. Young & S.R. Tannenbaum. 1981.** Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7764– 7768.
- Gourdon, I., M.C. Guérin, J. Torreiles & P. Roch. 2001.** Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* 5: 1-6.
- 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.
- Hensley, S.D. & A.M. Hammond JR. 1968.** Laboratory technique for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *J. Econ. Entomol.* 61: 1742-1743.
- Inglis, G.D., M.S. Goettel, T.M. Butt & H. Strasser. 2001.** Use of Hyphomycetous fungi for managing insects pest, p. 23–70. In T.M. Butt, C.W. Jackson & N. Magan (eds.), *Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential*. Wallingford, CABI Publ., 416p.
- 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. *Ins. Bio. Mol. Biol.* 27: 835-850.
- Junqueira, L.C.U. & L.M.M.S. Junqueira. 1983.** *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo, Guanabara Koogan, 123p.
- Lanot, R., D. Zachary, F. Holder & M. Meister. 2001.** Postembryoni hematopoiesis in *Drosophila*. *Devel. Biol.* 230: 243–257.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Ins. Bio. Mol. Biol.* 32: 1295-1309.

- Lee, H.S., M.Y. Cho, K.M. Lee, T.H. Kwon & B.L. Lee. 1999.** The prophenoloxidase of coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae was activated during cell clump/cell adhesion of insect cellular defense reactions. FEBS Let. 444: 255-259.
- Lowenberger, C. 2001.** Innate immune response of *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol. 31: 219–229.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2011.** Cana-de-açúcar. Fonte consultada: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>> Acesso em 15/12/2011.
- Marmaras, V.J., S.N. Bournazos, P.G. Katsoris & M. Lambropoulou. 1993.** Defense mechanisms in insects: certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for nonselfrecognition and immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitidis capitata*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 23: 169-180.
- Mendonça, A.F. 1996.** Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, p. 3-48. In A.F. Mendonça (ed.), Pragas da cana-de-açúcar. Maceió, Insetos & Cia, 239p.
- Mendonça, A.F., J.A. Moreno, S.H. Risco & I.C.B. Rocha. 1996.** As brocas da cana-de-açúcar, *Diatraea* spp. (Lep., Pyralidae), 51-82. In A.F. Mendonça (ed.), Pragas da cana-de-açúcar. Maceió, Insetos & Cia, 239p.
- Molina-Cruz, A., R.J. Dejong, B. Charles, L. Gupta, S. Kumar, G. Jaramillo-Guatierrez & C. Barillas-Mury. 2007.** Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*. J. Biol. Chem. 28: 3217-3223.
- Nappi, A.J. & E. Vass. 1993.** Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. Pigment. Cell Res. 6: 117-126.
- Nappi, A.J. & E. Ottaviani. 2000.** Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. Bio Essays 22: 469-480.

- 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. Agric. 25: 293-308.
- Nieuw Amerongen, A.V., E.C.I. Veerman. 2002.** Salivary glands and saliva. number 2. Saliva the defender of the oral cavity. Oral Dis. 8:12-22
- Oliveira, M.A.P., E.J. Marques, V. Wanderley-Teixeira & R. Barros. 2008a.** Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). Acta Sci. Biol. 30: 220-224.
- Oliveira, M.A.P., V. Wanderley-Teixeira, E.J. Marques, A.C. Albuquerque, F.A.B. Santos, R. Barros & A.A.C.Teixeira. 2008b.** Dinâmica hemocitária em *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae) desafiada imunologicamente pelos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Arq. Inst. Biol. 75: 173-179.
- 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.
- Ribeiro, C. & M. Brehélin. 2006.** Insect hemocytes: What type of cell is that? J. Insect Physiol., 52: 417-429.
- Rowley, A.F., J.L. Brookman & N.A. Ratcliffe. 1990.** Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in antimicrobial activity. J. Invertebr. Pathol. 56: 31-38.
- Russo, J., M. Brehélin & Y. Carton. 2001.** Hemocyte changes in resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster* caused by virulent and a virulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. J. Insect Physiol. 47: 167-172.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. SAS Institute, Cary,

NC.

Sass, M., A. Kiss & M. Locke. 1994. Integument and hemocyte peptides. *J. Insect Physiol.* 40: 407-421.

Silva, C., B.D. Gary & M.E. Rau. 2000. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Developm. Compar. Immunol.* 24: 367-379.

Wilson, K., S.C. Cotter, A.F. Reeson, & J.K. Pell. 2001. Melanism and disease resistance in insects. *Ecol. Let.* 4: 637-649.

Zappelini, L.O., J.E.M. Almeida, A. Batista Filho & F.H.C. Giometti. 2010. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). *Arq. Inst. Biol.* 77: 75-82.

Zimmer, C.R., M.C. Cárcamo, P.B. Ribeiro & J.S. Nascimento. 2010. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre desenvolvimento do díptero *Muscina stabulans* em laboratório. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62: 1142-1147.

Tabela 1. Efeito de *Metarhizium anisopliae* em diferentes concentrações sobre a sobrevivência de lagartas de *Diatraea flavipennella* em laboratório.

Tratamentos (conídios/mL)	Sobrevivência (dias)
10 ³	45,4 ± 2,97a ¹
10 ⁴	52,1 ± 2,55a
10 ⁵	28,1 ± 4,97b
Testemunha	22,4 ± 1,06c
	$\chi^2 = 22,56^{0,0001}$

¹Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Log-Rank por pares de tratamento após análise de sobrevivência pelo método Kaplan-Meier.

Tabela 2. Equações para as proporções (%) e respectivos parâmetros de ajuste (F, Teste de Fisher; P, valor de significância e R², coeficiente de determinação) da contagem diferencial de esferulócito, granulócitos e prohemócito de *Diatraea flavipennella* de terceiro instar, não tratadas e tratadas com *Metarhizium anisopliae* nas concentrações 10³, 10⁵ e 10⁷ conídios/mL em função dos intervalos de 24, 36, 48 e 60 horas após tratamento.

Tipos de Hemócitos	Tratamentos	Equação	F ^P	R ²
Esferulócito	Testemunha	$\hat{y} = 8,027 + 0,387x$	4,38 ^{0,0432}	0,10
	10 ³	$\hat{y} = 12,900 + 0,262x$	2,70 ^{0,01084}	0,07
	10 ⁵	$\hat{y} = 10,754 + 0,334x$	6,94 ^{0,0121}	0,15
	10 ⁷	$\hat{y} = 17,326 + 0,149x$	0,77 ^{0,3867}	0,02
Granulócito	Testemunha	$\hat{y} = 29,883 - 0,329x$	3,42 ^{0,0726}	0,09
	10 ³	$\hat{y} = 25,166 - 0,253x$	4,65 ^{0,0377}	0,11
	10 ⁵	$\hat{y} = 26,289 - 0,197x$	3,38 ^{0,0744}	0,09
	10 ⁷	$\hat{y} = 23,866 - 0,257x$	6,92 ^{0,0125}	0,16
Prohemócito	Testemunha	$\hat{y} = -17,159 + 0,915x$	45,33 ^{0,0001}	0,55
	10 ³	$\hat{y} = -9,183 + 0,861x$	37,28 ^{0,0001}	0,50
	10 ⁵	$\hat{y} = 13,162 + 0,457x$	11,70 ^{0,0015}	0,24
	10 ⁷	$\hat{y} = 1,361 + 0,862x$	26,98 ^{0,0001}	0,42

Tabela 3. Médias (\pm EP) dos números de adipohemócitos e esferulócitos da hemolinfa de lagartas de terceiro ínstar de *Diatraea flavipennella*, tratadas com *Metarhizium anisopliae*.

Tratamentos	Tempo após tratamento (horas)				Estatística F ^P
	24	36	48	60	
Adipohemócitos					
Testemunha	8,29 \pm 1,34 a ¹	1,33 \pm 0,83 b	1,73 \pm 0,52 b	1,70 \pm 0,73 b	10,49 ^{0,0001}
10 ³	9,22 \pm 3,40 a	0,30 \pm 1,44 b	2,46 \pm 1,08 b	0,83 \pm 0,37b	5,76 ^{0,0026}
10 ⁵	3,48 \pm 1,02 a	0,60 \pm 0,29 b	1,20 \pm 0,65 b	0,99 \pm 0,55 b	4,60 ^{0,0081}
10 ⁷	4,30 \pm 0,84 a	2,53 \pm 1,09 ab	2,26 \pm 0,86 ab	0,43 \pm 0,14 b	4,84 ^{0,0064}
Esferulócito					
Testemunha	8,30 \pm 1,33 c	40,23 \pm 4,92 a	22,73 \pm 2,22 b	27,69 \pm 4,24 ab	12,16 ^{0,0001}
10 ³	10,88 \pm 1,81b	34,30 \pm 2,29 a	29,80 \pm 4,73 a	21,80 \pm 3,62 ab	8,91 ^{0,0002}
10 ⁵	21,11 \pm 3,80 a	20,53 \pm 2,97 a	30,67 \pm 3,18 a	29,00 \pm 3,36 a	2,50 ^{0,0753}
10 ⁷	20,47 \pm 4,14 b	16,30 \pm 1,71b	42,89 \pm 3,80 a	19,00 \pm 2,36 b	13,45 ^{<.0001}

¹Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem significativamente entre si pelo teste Tukey (P<0,05)

Tabela 4. Análise histoquímica de hemócitos de lagartas de terceiro ínstar de *Diatraea flavipennella* tratadas com *Metarhizium anisopliae* nas concentrações 10^3 e 10^7 conídios/mL, 24 e 60 horas após o tratamento.

Hemócitos	Plasmatócitos				Granulócitos				Prohemócitos				Esferulócitos				Adipohemócitos				Oenocitóide									
	T	10^3		10^7		T	10^3		10^7		T	10^3		10^7		T	103		107		T	103		107						
Tempo (horas)		24	60	24	60	24	60	24	60	24	60	24	60	24	60	24	60	24	60	24	60	24	60	24	60					
P.A.S.	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Sudan Black	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Tricrômico de Mallory	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	±	±	±	±	±	-	-	-	-	-

Legenda: + reativo, - não reativo, ± reação moderada.

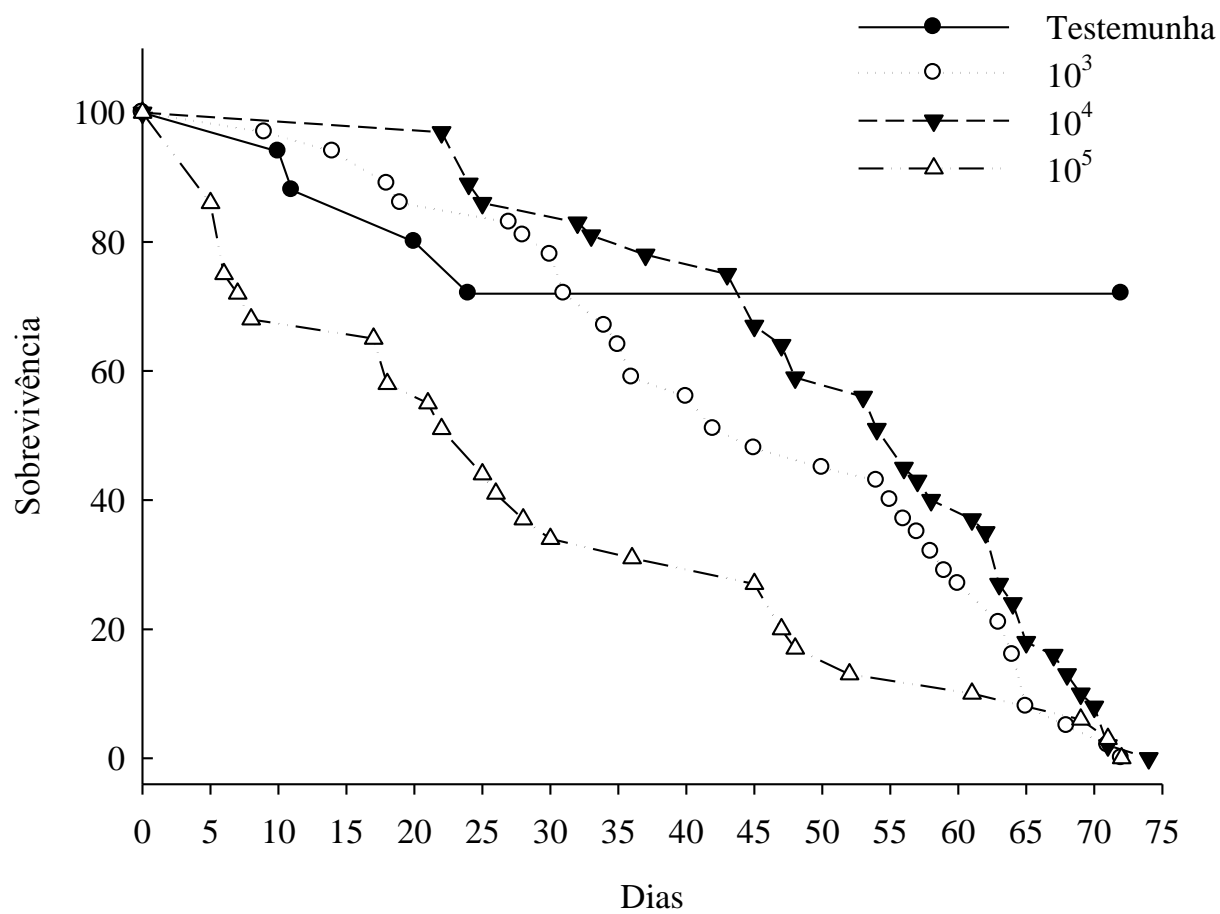


Figura 1. Efeito de *Metarhizium anisopliae* em diferentes concentrações sobre a sobrevivência (%) de lagartas de *Diatraea flavipennella* em laboratório.

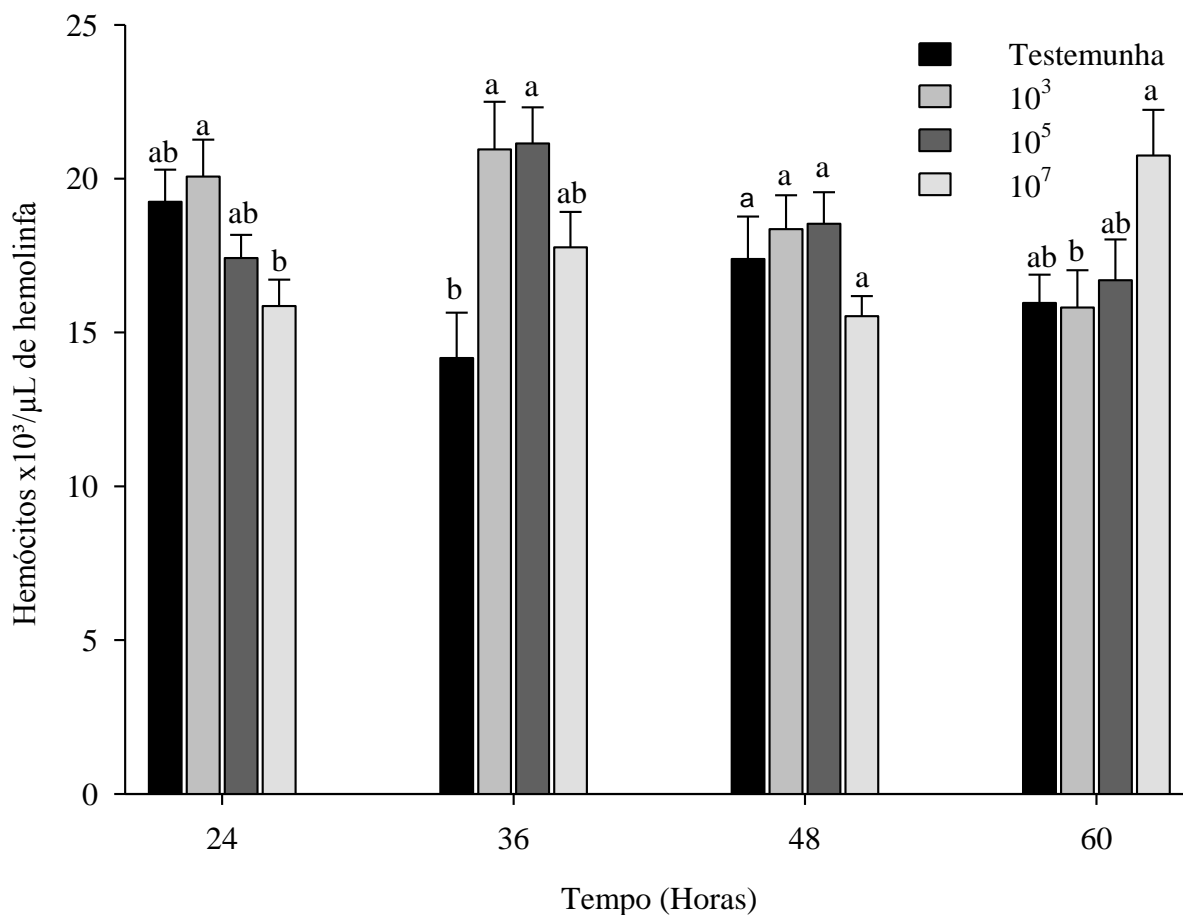


Figura 2. Média (+ EP) da contagem total dos hemócitos de lagartas de terceiro ínstar de *Diatraea flavipennella* pulverizadas com *Metarhizium anisopliae*, nas concentrações 10³, 10⁵ e 10⁷ conídios/mL coletados em diferentes horários. Barras seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (P < 0,05).

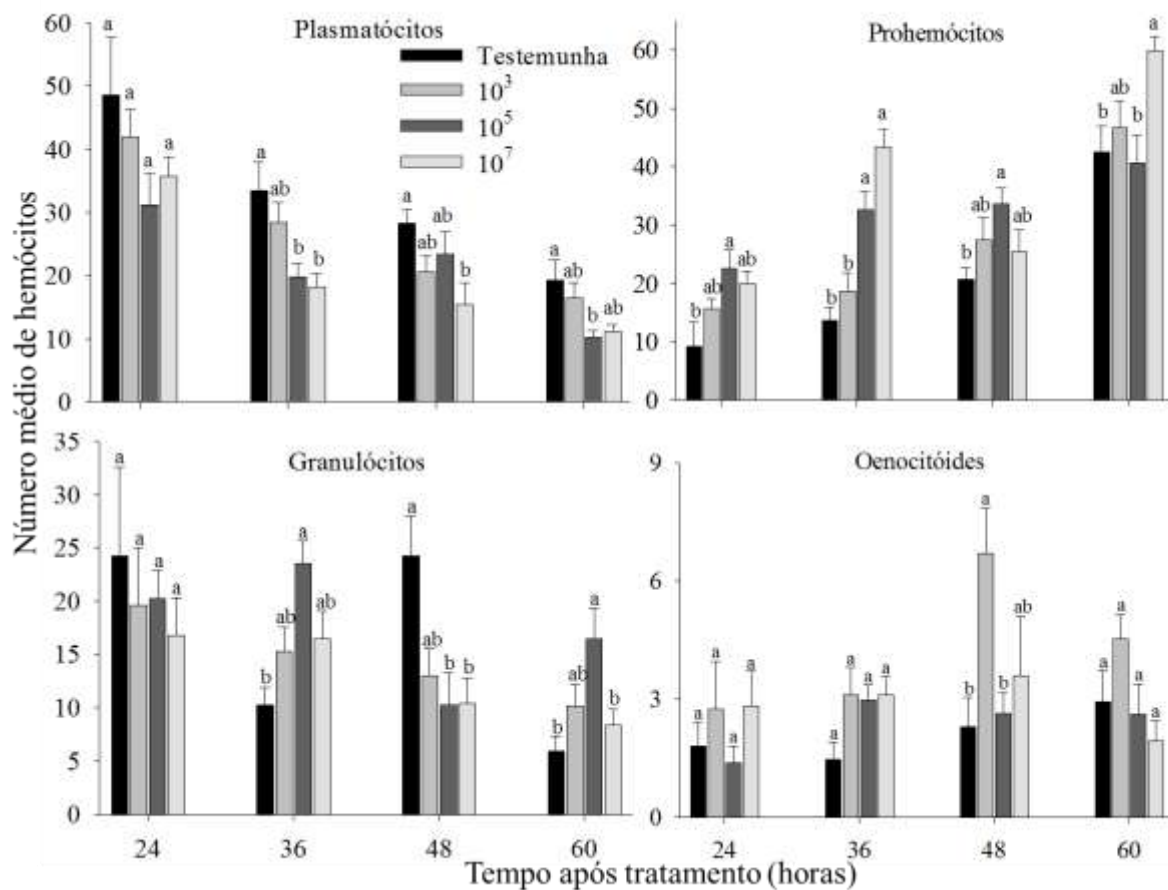


Figura 3. Média (+ EP) da contagem diferencial dos hemócitos de lagartas de *Diatraea flavipennella* pulverizadas com *Metarhizium anisopliae* nas concentrações 10^3 , 10^5 e 10^7 conídios/mL em função dos intervalos de 24, 36, 48 e 60 horas após tratamento. Médias indicadas com diferentes letras ao longo do tempo diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey (P < 0,05).

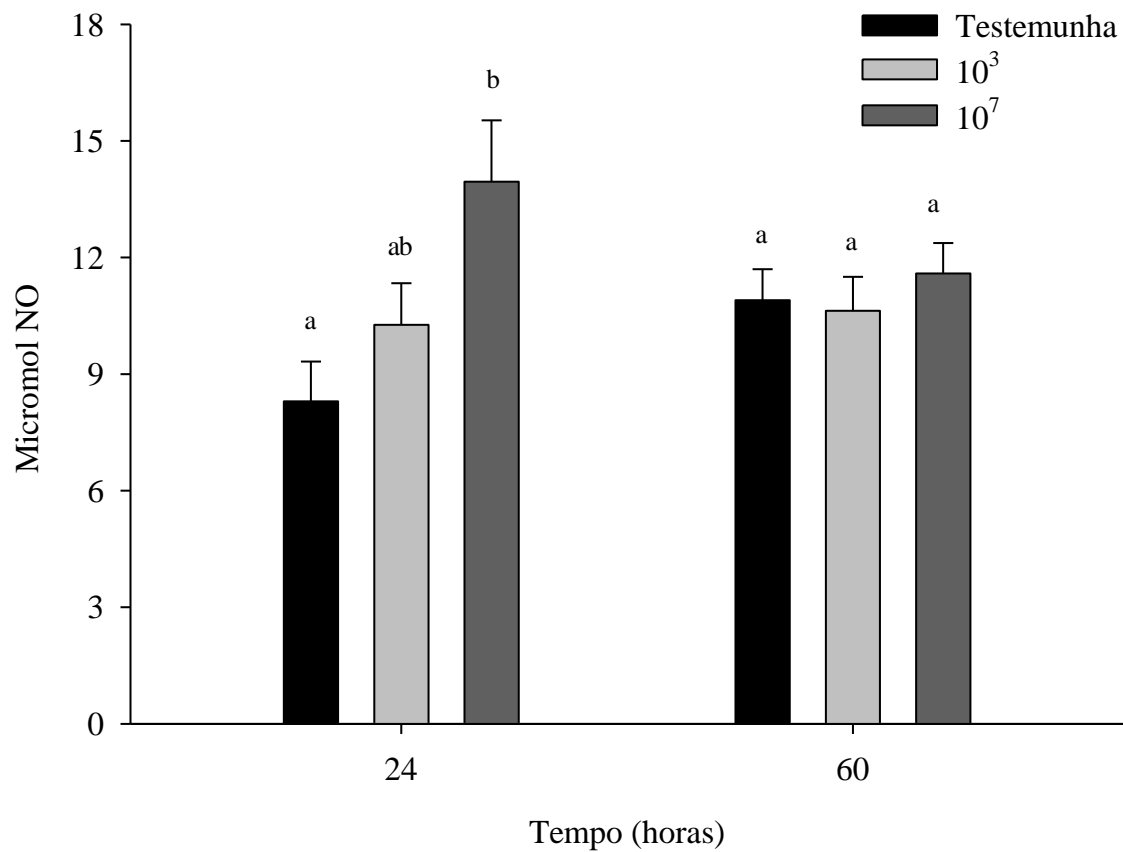


Figura 4. Concentrações de óxido nítrico (μM de $\text{NO}_2^-/\mu\text{L}$ de hemolinfa) em lagartas de *Diatraea flavipennella* submetidas e não submetidas à *Metarhizium anisopliae* em diferentes concentrações, avaliadas em dois tempos diferentes. Barras seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

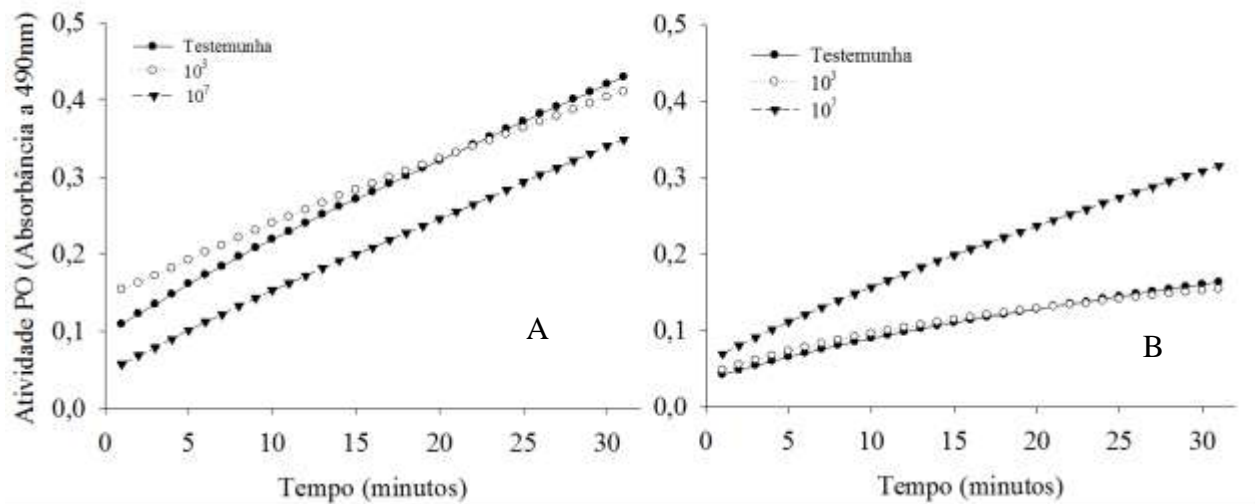


Figura 5. Atividade da fenoloxidase medida de densidade óptica (DO) a 490 nm na hemolinfa de lagartas de *Diatraea flavipennella* tratadas com *Metarhizium anisopliae*, em função do tempo. (A) Avaliada após 24 horas da pulverização. (B) Avaliada 60 horas após a pulverização (n = 10 lagartas).

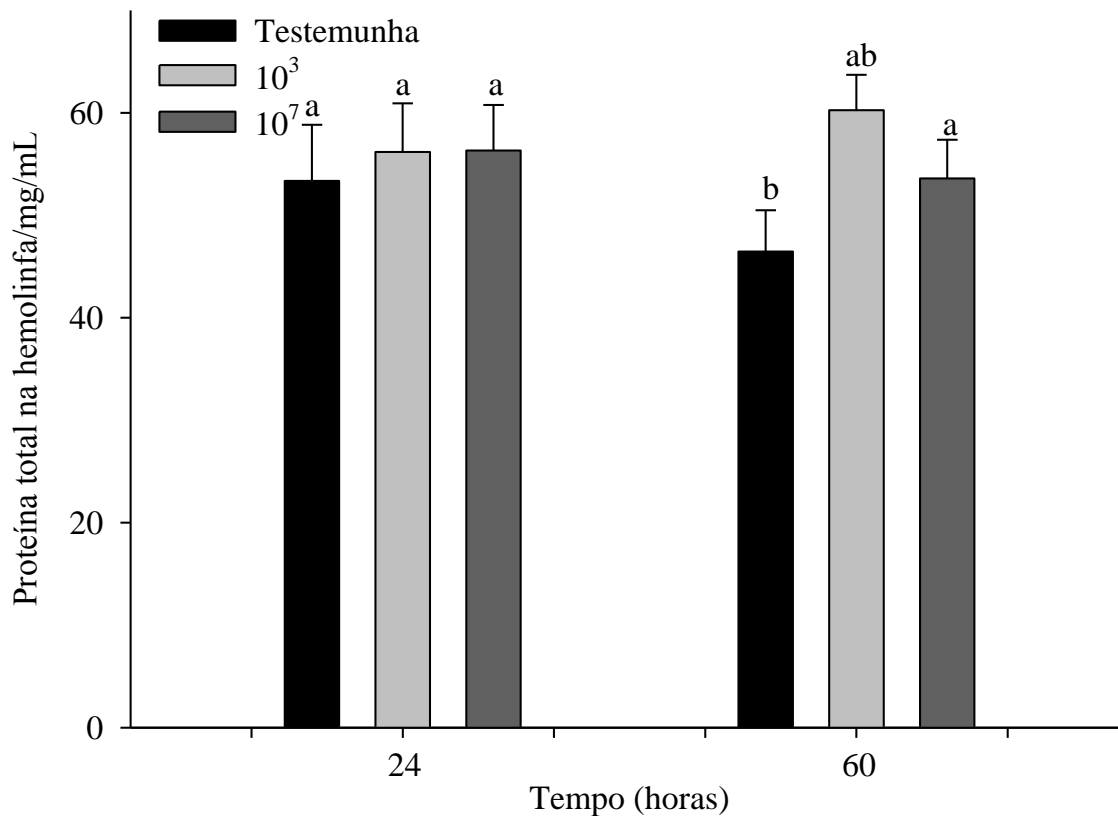


Figura 6. Proteína total (média \pm EP) na hemolinfa de lagartas de terceiro ínstar de *Diatraea flavipennella* tratadas com *Metarhizium anisopliae* avaliada 24 e 60 horas após a pulverização.

Barras seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

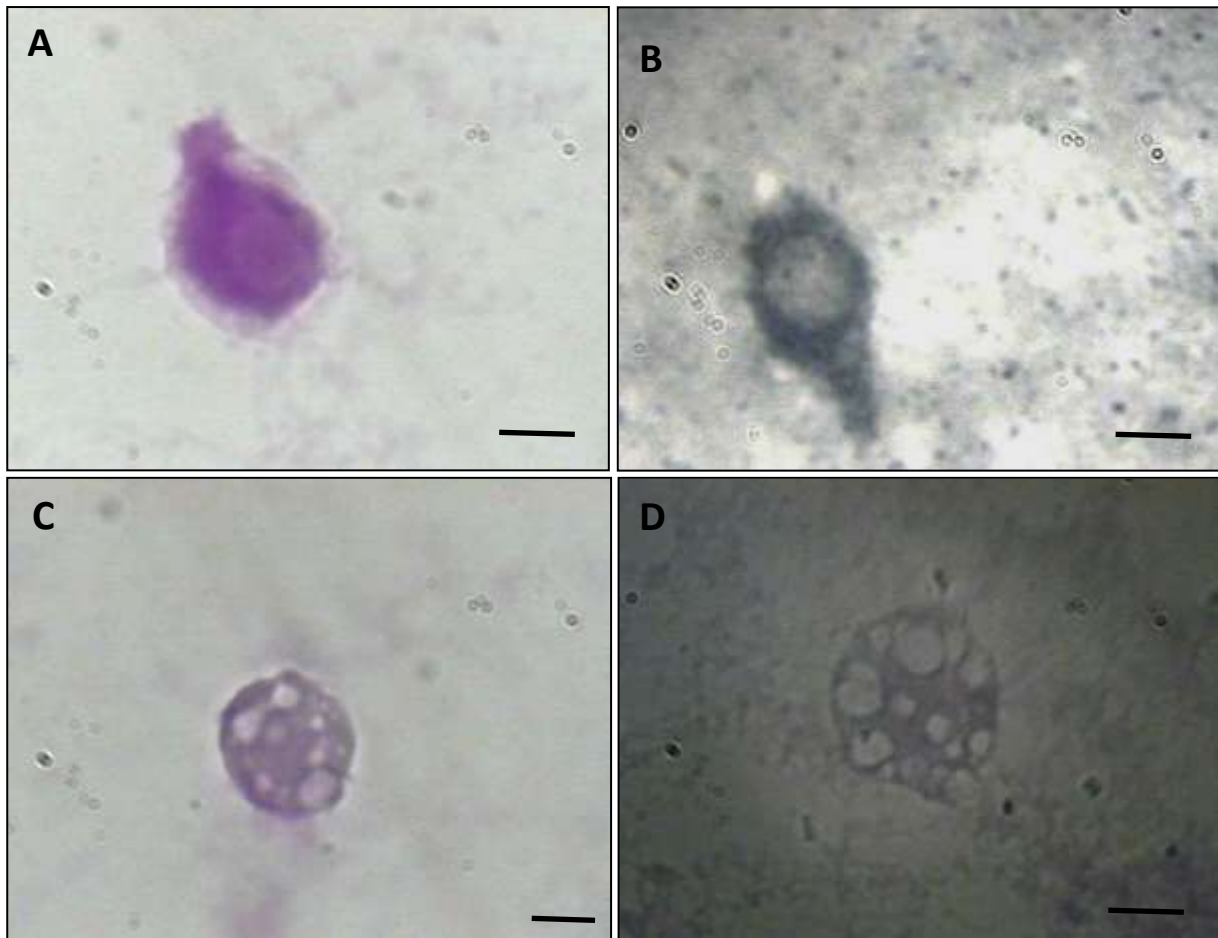


Figura 7. Plasmatócitos (A: testemunha; B: tratamento 10^3 conídios/mL 24h) e granulócitos (C: testemunha; D: tratamento 10^3 conídios/mL 24h) de larvas de terceiro ínstar de *Diatraea flavipennella* pulverizadas com *Metarhizium anisopliae* e corados com Ácido Periódico de Schiff (P.A.S). Barras = 25 μ m.

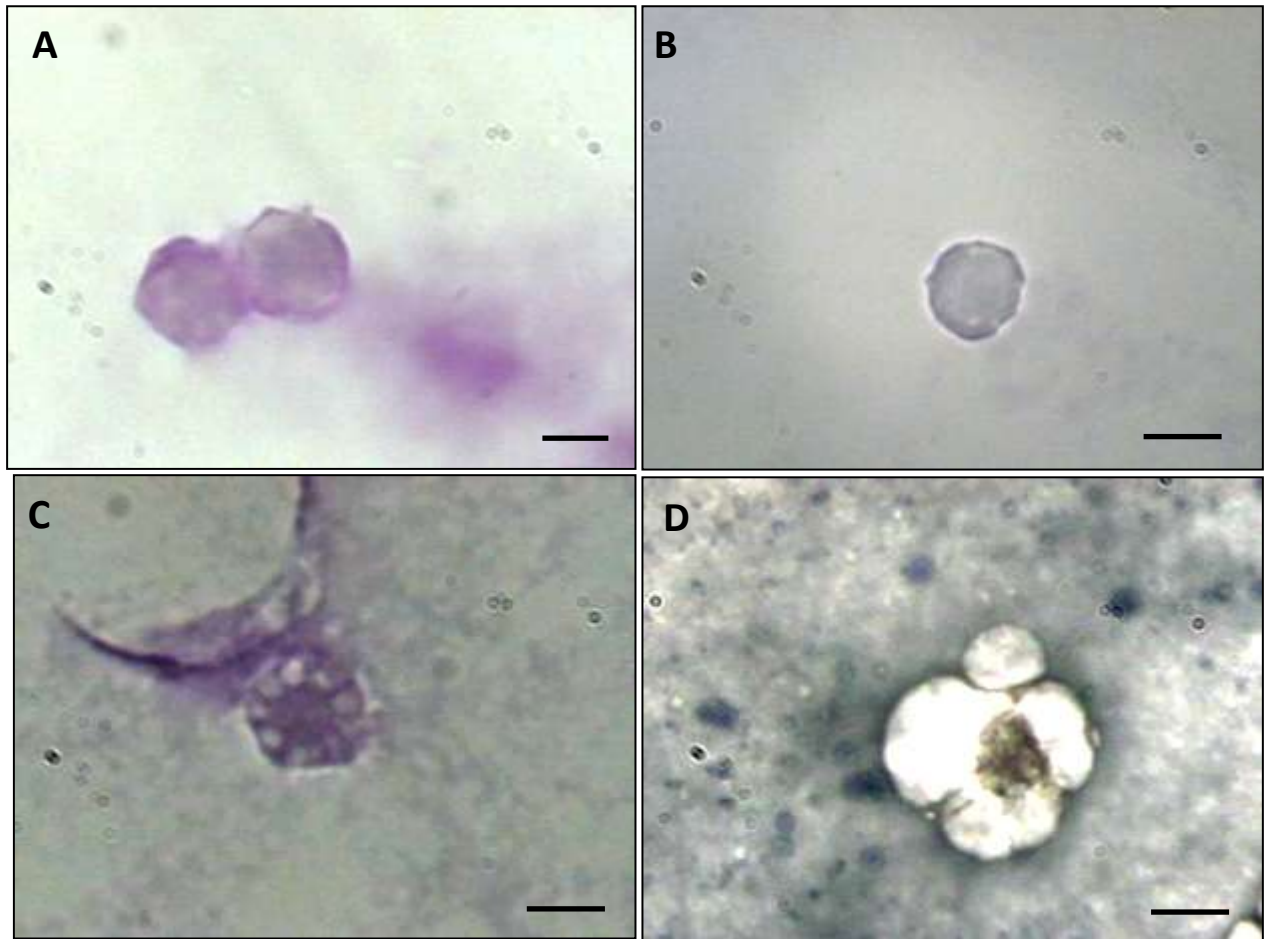


Figura 8. Prohemócitos (A: testemunha; B tratamento 10^3 conídios/mL 24h) e esferulócitos (C: testemunha; D: tratamento 10^3 conídios/mL 24h) de larvas de terceiro ínstar de *Diatraea flavipennella* pulverizadas com *Metarhizium anisopliae* e corados com Ácido Periódico de Schiff (P.A.S). Barras = 25 μ m.

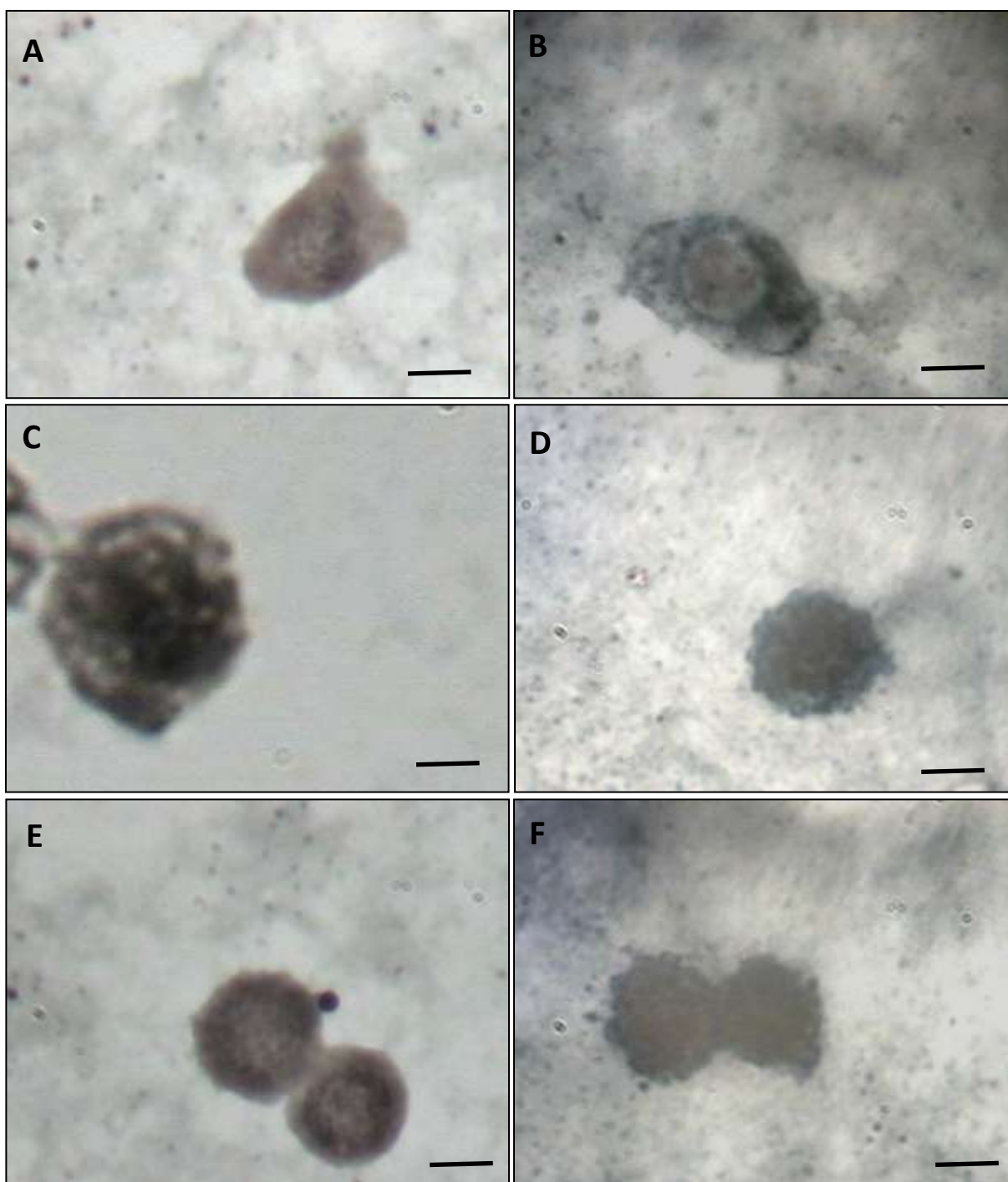


Figura 9. Plasmatócitos (A: testemunha; B: tratamento 10^3 conídios/mL 24h), granulócitos (C: testemunha; D: tratamento 10^3 conídios/mL 24h) e prohemócitos (E: testemunha; F: tratamento 10^3 conídios/mL 24h) de larvas de terceiro ínstar de *Diatraea flavipennella* pulverizadas com *Metarhizium anisopliae* e corados com Sudan Black. Barras = 25 μ m.

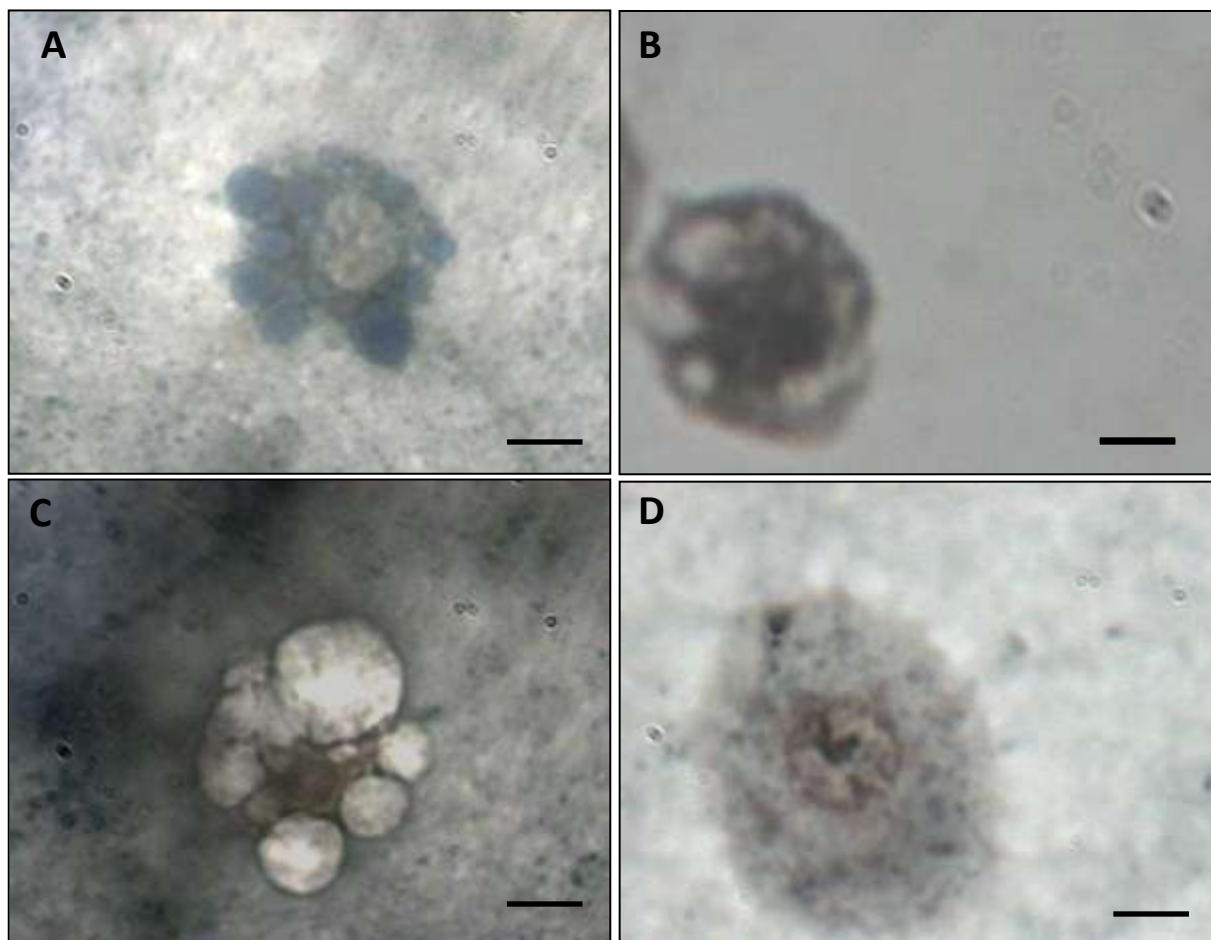


Figura 10. Adipohemócitos (A: testemunha; B: tratamento 10^3 conídios/mL 24h), esferulócitos (C: testemunha) e oenocitóides (D: testemunha) de larvas de terceiro ínstar de *Diatraea flavipennella* pulverizadas com *Metarhizium anisopliae* e corados com Sudan Black. Barras = 25µm.

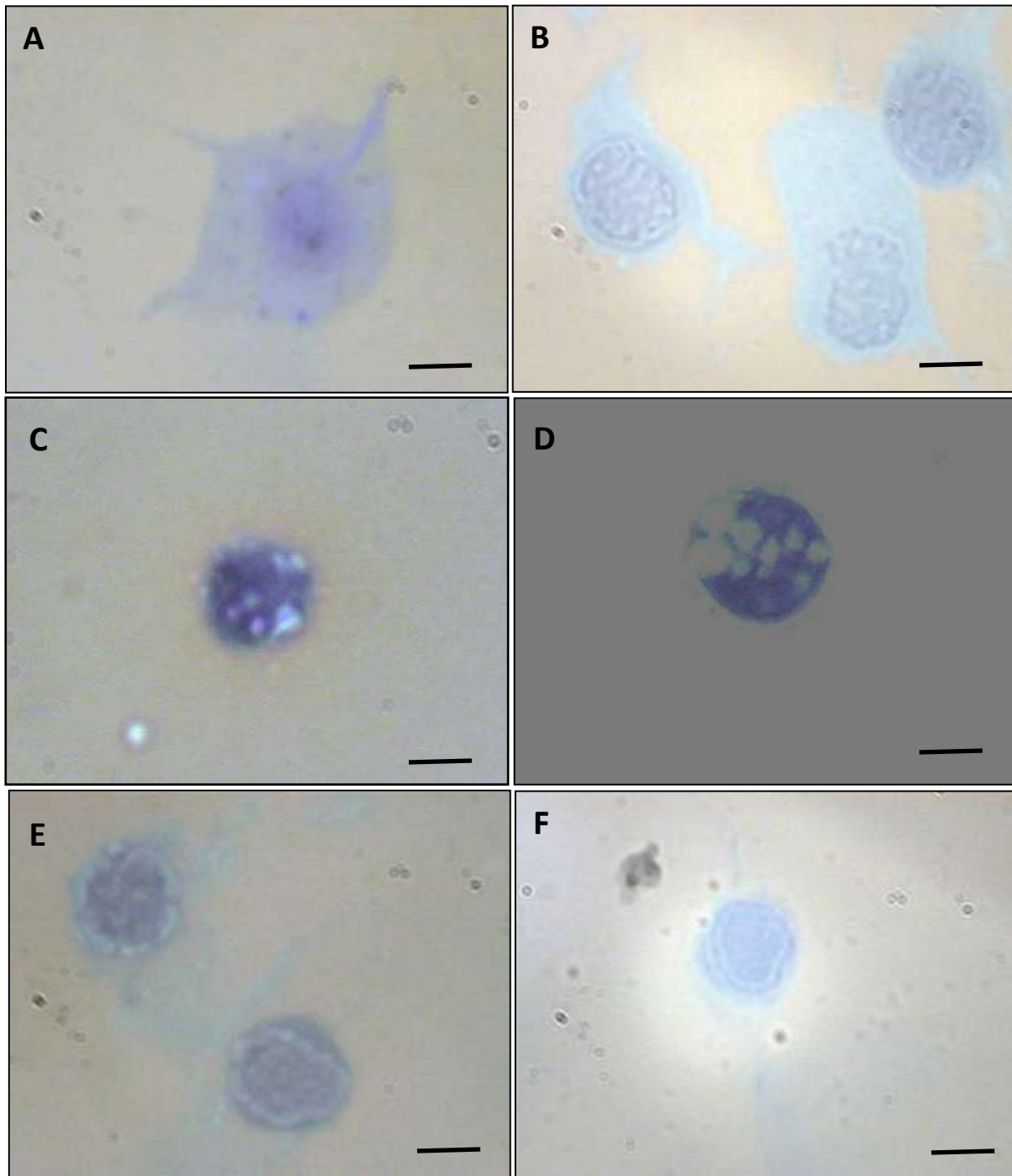


Figura 11. Plasmatócitos (A: testemunha; B: tratamento 10^3 conídios/mL 24h), granulócitos (C: testemunha; D: tratamento 10^3 conídios/mL 24h) e prohemócitos (E: testemunha; F: tratamento 10^3 conídios/mL 24h) de larvas de terceiro ínstar de *Diatraea flavipennella* pulverizadas com *Metarhizium anisopliae* e corados com Tricrômico de Mallory. Barras = 25µm.

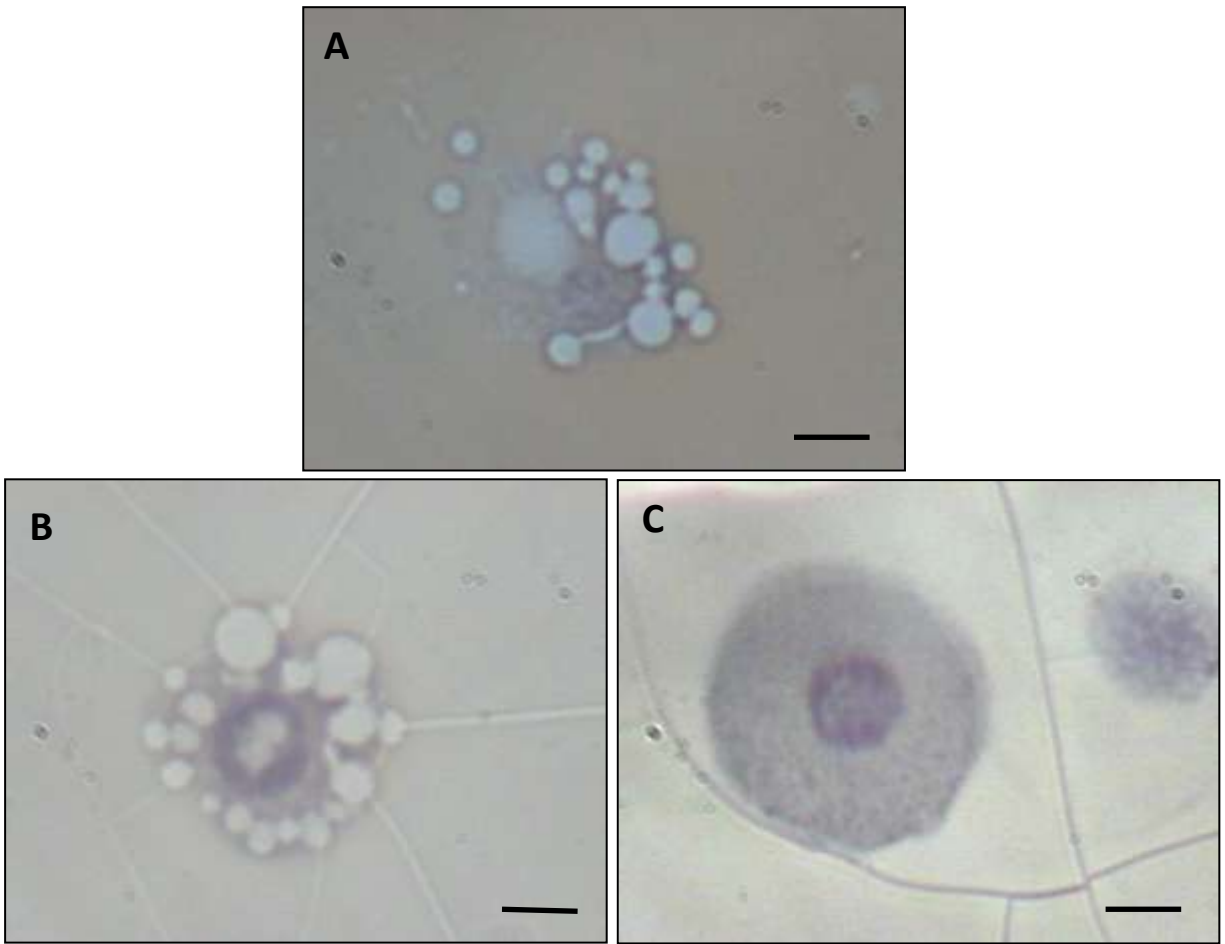


Figura 12. Adipohemócitos (A: testemunha 24h), esferulócitos (B: testemunha 24h) e oenocitóides (C: testemunha 24h) de larvas de terceiro ínstar de *Diatraea flavipennella* pulverizadas com *Metarhizium anisopliae* e corados com Tricrômico de Mallory. Barras = 25µm.