

DINÂMICA HEMOCITÁRIA EM *DIATRAEA SACCHARALIS* F. (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) DESAFIADA IMUNOLOGICAMENTE PELOS FUNGOS *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL. E *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (METSCH.) SOROK.

M.A.P. Oliveira¹, V. Wanderley-Teixeira¹, E.J. Marques¹,
A.C. Albuquerque¹, F.A.B. Santos³, R. Barros¹, A.A.C. Teixeira²

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/nº, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: valeria@dmfa.ufrpe.br

RESUMO

A pesquisa objetivou analisar, morfológica e quantitativamente, os tipos de hemócitos em lagartas do terceiro ínstar de *Diatraea saccharalis* F., desafiadas imunologicamente por *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., nas concentrações 10^3 , 10^5 e 10^7 conídios mL^{-1} , em comparação a lagartas não tratadas. Foram coletados 10 μL de hemolinfa de cinco lagartas por tratamento, nos intervalos de 24, 36, 48, e 60 horas pós-inoculação, sendo contadas 300 células em campos aleatórios da lâmina, utilizando-se a objetiva de imersão (100X). Os hemócitos mais freqüentes foram os esferulócitos (34,8%), plasmatócitos (29,7%) e granulócitos (22,2%), enquanto os menos freqüentes foram os prohemócitos (8,3%), adipohemócitos (2,6%) e oenocitóides (2,4%). *B. bassiana* promoveu interferência efetiva na população de granulócitos na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} (24 e 36h) e plasmatócitos nas concentrações 10^3 conídios mL^{-1} (60h) e 10^7 conídios mL^{-1} (24 e 36h), onde ocorreu aumento do número de granulócitos e redução do número de plasmatócitos na maior concentração e, ainda, o aumento do número de plasmatócitos na concentração 10^3 conídios mL^{-1} . *M. anisopliae* não interferiu quantitativamente nos granulócitos e plasmatócitos. No que se refere aos esferulócitos, verificou-se maior tendência de redução do número 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, apresentando a menor média. Conclui-se que *B. bassiana* tem ação mais efetiva sobre a dinâmica populacional dos granulócitos e plasmatócitos em lagartas de *D. saccharalis* em relação ao *M. anisopliae*.

PALAVRAS-CHAVE: Hemócitos, fungos entomopatogênicos, morfologia, broca da cana-de-açúcar.

ABSTRACT

HEMOCYTIC DYNAMICS IN *DIATRAEA SACCHARALIS* F. (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) IMMUNOLOGICALLY CHALLENGED BY *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL. AND *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (METSCH.) SOROK. FUNGI. This study was aimed to morphologically and quantitatively analyze the types of hemocytes in *Diatraea saccharalis* F. third-instar caterpillar immunologically challenged by *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in concentrations of 10^3 , 10^5 and 10^7 conidia mL^{-1} , compared to nontreated specimens. A 10 μL -sample of hemolymphs from five caterpillars for each treatment, in the intervals of 24, 36, 48 and 60h; 300 cells were counted in random fields of the lamina, using the immersion objective (100X). The most frequent hemocytes were the spherulocytes (34.8%), plasmatocytes (29.7%) and granulocytes (22.2%), while the least frequent were the prohemocytes (8.3%), the adipohemocytes (2.6%) and the oenocytoids (2.4%). *B. bassiana* promoted effective interference in the population of granulocytes at the concentration of 10^7 conidia mL^{-1} (24 and 36h) and of plasmatocytes at the concentrations of 10^3 conidia mL^{-1} (60h) and 10^7 conidia mL^{-1} (24 and 36h); there occurred an increase of the number of the granulocytes and a decrease of the number of plasmotocytes at the highest concentration, and an increase in the number of plasmatocytes at the concentration of 10^3 conidia mL^{-1} . *M. anisopliae* do not interfere quantitatively in the granulocytes and plasmatocytes. Regarding the spherulocytes, there was observed a higher tendency of

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Área de Histologia, Recife, PE, Brasil.

³Universidade Federal de Pernambuco, FIOCRUZ, CPqAM, Recife, PE, Brasil.

reduction in the number of these cells in the interval of 24 and 36h for both fungi, but a meaningful difference only occurred at the concentration of 10^5 conidia mL^{-1} in the 60h interval, presenting the smallest average. It was possible to conclude that *B. bassiana* has a more effective action over the populational dynamics of the granulocytes and plasmatocytes of *D. saccharalis* caterpillars in association with *M. anisopliae*.

KEY WORDS: Hemocytes, entomopathogenic fungi, morphology, sugarcane borer.

INTRODUÇÃO

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 e os sistemas, circulatório, reprodutor, respiratório, nervoso e 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 (HEGEDUS; KHACHATOURIANS 1996).

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).

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 (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. Neste sentido, sabe-se que as proteases extracelulares produzidas por *M. anisopliae* e *B. bassiana* parecem participar na supressão da resposta imunológica celular na hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Noctuidae) (GRIESCH; VILCINSKAS 1998).

Alterações na morfologia, função e quantidade de hemócitos em insetos, ocasionadas por fungos entomopatogênicos, têm sido relatadas por vários pesquisadores. BALAVENKATASUBBIAH; NATARAJU

(2005) verificaram susceptibilidade de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) a *B. bassiana* por este provocar uma interferência no número de alguns hemócitos com o progresso da infecção. O processo de adesão dos hemócitos foi afetado em *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae) após inoculação com *B. bassiana* (DEANA *et al.*, 2004). Modificações na morfologia e ausência da atividade fagocitária dos plasmatócitos em *G. mellonella* quando inoculadas com *M. anisopliae* foram descritas por VILCINSKAS *et al.*, (1997a; b).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar, morfológica e quantitativamente, os tipos de hemócitos em lagartas do terceiro ínstar de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae), submetidas aos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos insetos: As lagartas de *D. saccharalis* foram obtidas da criação existente em laboratório.

Obtenção dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*: Os isolados utilizados foram *B. bassiana* (447) obtido de *Selenopsis invicta* (Buren) e *M. anisopliae* (E9) obtido de *Deois flavopicta* (Stal.), provenientes da micoteca da Esalq, e mantidos no Laboratório de Patologia de Insetos a uma temperatura de $6 \pm 2^\circ \text{C}$ em tubos de vidro com meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido do antibiótico sulfato de estreptomina (BDA+A) e óleo Nujol.

As suspensões dos fungos foram preparadas a partir de placas de Petri contendo meio de cultura (BDA + A) com os conídios, adicionando-se 20mL de água destilada esterilizada para *B. bassiana* e 15 mL 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, conforme metodologia desenvolvida por ALVES *et al.* (1998). A viabilidade de conídios foi avaliada por meio de plaqueamento em BDA+A, após 24h, em estufa incubadora BOD a $26 \pm 1^\circ \text{C}$ e 12h de fotofase, fazendo-se a contagem de conídios germinados e não germinados em microscópio de luz.

Tratamento tóxico de *D. saccharalis*: As lagartas de terceiro ínstar de *D. saccharalis* foram pulverizadas com os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* nas concen-

trações de 10^3 , 10^5 , e 10^7 conídios mL^{-1} , respectivamente. A testemunha foi pulverizada com água destilada esterilizada mais espalhante adesivo Tween 80, totalizando sete tratamentos.

Foram utilizadas 140 lagartas sendo 20 para cada tratamento, divididas em grupos de cinco indivíduos, a fim de permitir a coleta da hemolinfa, em diferentes intervalos de tempo (24, 36, 48 e 60 horas), sendo cada lagarta considerada uma repetição. Estas foram acondicionadas em bandeja de plástico 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. Em seguida, os insetos 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: Amostras de 10 μL de hemolinfa foram coletadas de cinco lagartas por tratamento, nos intervalos de 24, 36, 48, e 60 horas. Para isso realizou-se uma incisão na região mesopleural da lagarta e, com o auxílio de uma micropipeta, colheu-se a hemolinfa.

O material foi colocado sobre uma lâmina contendo 10 μL de solução salina (62 mM NaCl + 100 mM glicose + 10 mM EDTA + 30 mM citrato de sódio + 26 mM ácido cítrico + pH 4,6) para evitar a coagulação. Em seguida, procedeu-se o esfregaço, que foram mantidos por aproximadamente 20 minutos à temperatura ambiente para permitir uma melhor adesão dos hemócitos à lâmina. O esfregaço 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 descrita por FALLEIROS *et al.* (2003), sendo contadas 300 células em campos aleatórios da lâmina, utilizando-se a objetiva de imersão (100X).

Análise estatística: A partir da contagem de 300 células por amostra, foi obtida a proporção de hemócitos (contagem diferencial) para cada tratamento e intervalo após tratamento. Assim, as porcentagens de cada tipo de hemócito foram submetidas à análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial considerando 7 tratamentos e 4 intervalos de avaliação após tratamento como fatores principais. Havendo significância entre fatores principais, bem como de suas interações, ANOVA simples foi conduzida comparando as porcentagens entre tratamentos para cada intervalo de avaliação ou para cada tratamento em função dos respectivos intervalos de avaliação. Em seguida, quando foi caracterizada significância dos fatores pela ANOVA, as médias de tratamentos ou de

intervalo de avaliação foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises foram conduzidas empregando o programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células mais freqüentes foram os esferulócitos, plasmatócitos e granulócitos, com percentuais de 34,8%, 29,7% e 22,2%, respectivamente, enquanto que os hemócitos menos freqüentes foram os prohemócitos (8,3%), adipohemócitos (2,6%) e oenocitóides (2,4%) (Fig. 1). Tal observação corrobora com os dados descritos por RATCLIFFE (1993) e STRAND; PECH (1995), os quais relataram que nos estágios larvais em lepidópteros normalmente as células granulares e os plasmatócitos 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 prohemócitos.

Da mesma forma, FALLEIROS *et al.* (2003), trabalhando com microscopia de transmissão e varredura, também observaram maior freqüência de plasmatócitos, granulócitos e esferulócitos na hemolinfa de larvas de *D. saccharalis*. Segundo SAS *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 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.

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 plasmatócitos nas concentrações 10^3 conídios mL^{-1} (60h) e 10^7 conídios mL^{-1} (24 e 36h), onde houve um aumento do número de granulócitos e redução do número de plasmatócitos na maior concentração, e aumento do número de plasmatócitos na concentração 10^3 conídios mL^{-1} (Tabela 1).

O fungo *M. anisopliae* não interferiu significativamente nos granulócitos e plasmatócitos. No que se refere aos esferulócitos, verificou-se uma tendência de redução do número dessas células no intervalo de 24 e 36h para ambos os fungos, porém, diferença significativa só ocorreu na concentração de 10^6 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.

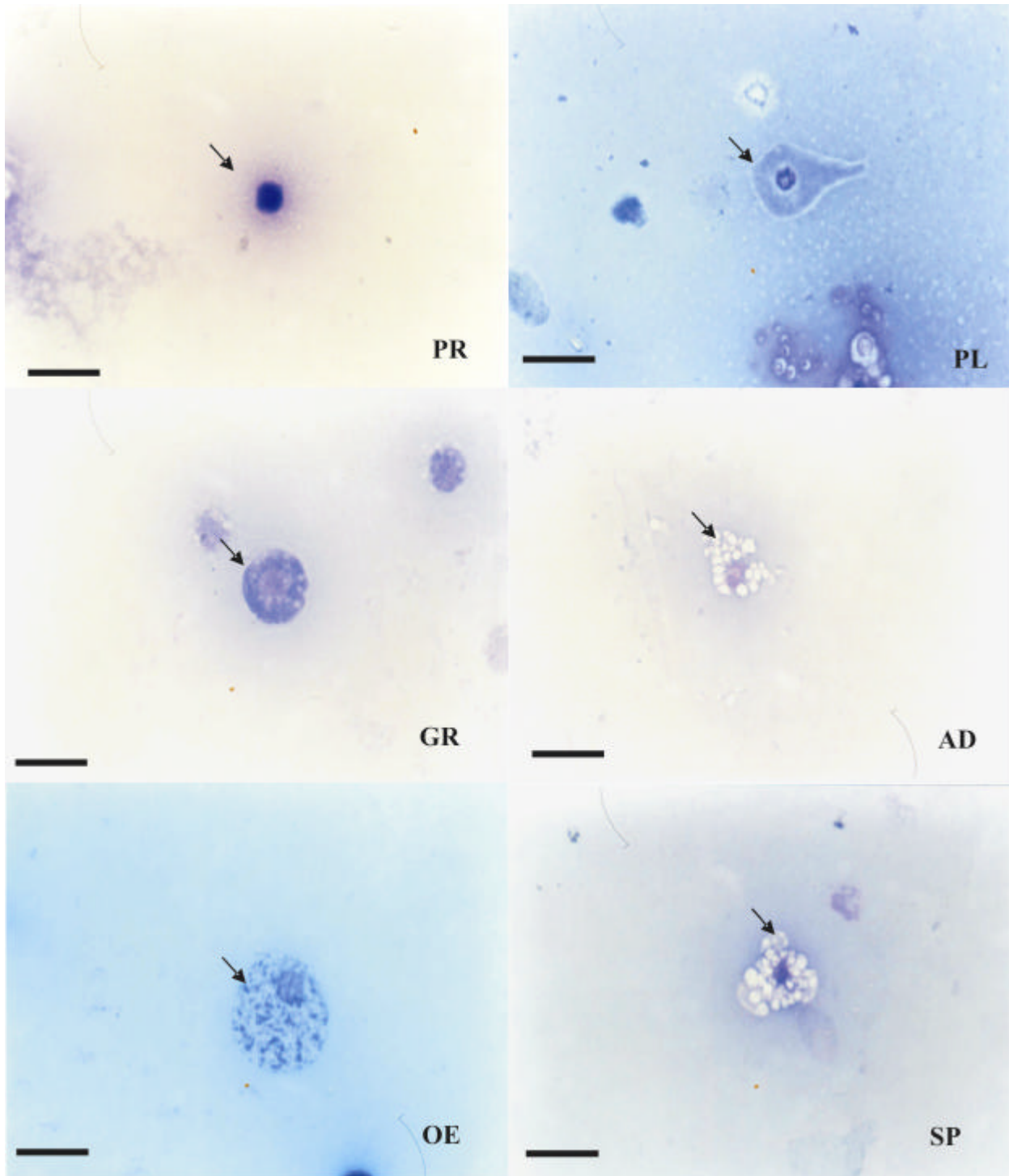


Fig. 1 - Tipos de hemócitos observados na hemolinfa de lagartas do terceiro ínstar de *D. saccharalis*: Prohemócito (PR), Plasmatócito (PL), Granulócito (GR), Adipohemócito (AD), Oenocitóide (OE) e Esferulócito (SP). Barras = 10 μ m.

De acordo com HAN *et al.* (1998), os hemócitos podem ser capazes de responder rapidamente às 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 podem

mudar rapidamente em respostas as várias reações imunes contra patógenos.

Os dados desta pesquisa mostraram uma pequena flutuação populacional dos hemócitos em respostas as diferentes concentrações dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* nos intervalos de 24, 36, 48 e 60h.

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 plasmatócitos de *D. saccharalis*. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por HUNG; BOUCIAS (1996), os quais relataram um aumento do número de granulócitos em *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e no gafanhoto *Melanoplus sanguinipes* F. (Orthoptera: Acrididae) inoculados com *B. bassiana*, enquanto que LEE *et al.* (2005) observaram uma diminuição do número de plasmatócitos em *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae), quan-

do inoculadas com *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e *B. bassiana*.

Segundo FUGUET; VEY (2004), a redução dos plasmatócitos pode estar 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 do número de plasmatócitos em infecções com fungos pode estar relacionado à sua suscetibilidade aos metabólicos secundários tóxicos produzidos por estes.

Tabela 1 - Médias (± EP) dos números de granulócitos (GR), plasmatócitos (PL) e esferulócitos (SP) da hemolinfa de lagartas do terceiro instar de *D. saccharalis*, desafiadas imunologicamente pelos fungos *B. bassiana* (*B.b.*) e *M. anisopliae* (*M.a.*).

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

¹Resultado da análise de variância (F do teste de Fisher) e respectivas significâncias (valor de P sobrescrito), para aqueles resultados significativos (P < 0,05).

²Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

³Resultados não significativos pela ANOVA, portanto, não possuem letras minúsculas ou maiúsculas de diferenciação nas linha e colunas, respectivamente.

A menor interferência do fungo *M. anisopliae* na população dos granulócitos e plasmatócitos pode estar relacionada ao isolado e/ou concentração, pois, segundo SEWIFY; HASHEM (2001), quando *G. mellonella* foi inoculada com *M. anisopliae*, na concentração de 10^7 conídios mL⁻¹, ocorreu um aumento significativo do número de granulócitos. No entanto, GILLESPIE *etal.* (2000) observaram no gafanhoto *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae), uma redução significativa do número de granulócitos e plasmatócitos quando inoculados com *M. anisopliae* var. *acridum*, na concentração $7,5 \times 10^4$ conídios mL⁻¹.

CONCLUSÃO

A infecção de larvas de *D. saccharalis* com *B. bassiana* e *M. anisopliae* alterou a dinâmica populacional dos granulócitos e plasmatócitos. No entanto, *B. bassiana* mostrou ação mais efetiva sobre esta dinâmica do que *M. anisopliae*. Não foi observado efeito significativo das concentrações de conídios na resposta hematocitária, sendo que apenas a maior concentração promoveu uma pequena alteração nesta resposta.

AGRADECIMENTOS

Aos pesquisadores Drs. Fábio André Brayner dos Santos e Luiz Carlos Alves, Pesquisadores do CPqAM – FIOCRUZ/UFPE- Recife, PE, pela contribuição científica para realização deste trabalho e ao Prof. Dr. Jorge Braz Torres, do Curso de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola da UFRPE, pelas análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.) *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.39-54.
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JUNIOR, A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.) *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.637-711.
- BALAVENKATASUBBIAH, M.; NATARAJU, B. Hemocyte changes during the progressive infection of *Beauveria bassiana* in different breeds of silkworm (*Bombyx mori* L.) *Madras Agricultural Journal*, v.92, n.7/9, p.431-437, 2005.
- DEANA, P.; RICHARDSB, E.H.; EDWARDSB, J.P.; REYNOLDSA, S.E.; CHARNLEYA, K. Microbial infection causes the appearance of hemocytes with extreme spreading ability in monolayers of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Developmental and Comparative Immunology*, v.28, n.7/8, p.689-700, 2004.
- FALLEIROS, A.M.F.; BOMBONATO, M.T.S.; GREGÓRIO, E.A. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.46, n.2, p.287-294, 2003.
- FUGUET, R.; VEY, A. Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp. in vivo studies. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.85, n.3, p.152-167, 2004.
- GILLESPIE, J.P.; BURNETT, C.; CHARNLEY, A.K. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Journal of Insect Physiology*, v.46, n.4, p.429-437, 2000.
- GRIESCH, J.; VILCINSKAS, A. Proteases released by entomopathogenic fungi impair phagocytic activity, attachment and spreading of plasmatocytes isolated from haemolymph of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Biocontrol Science Technology*, v.8, n.4, p.517-531, 1998.
- GUPTA, A.P. Cellular elements in hemolymph. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 3, p. 401-451.
- HAN, S.S.; LEE, M.H.; KIM, W.K. Hemocytic differentiation in hemopoietic organ of *Bombix mori* larvae. *Zoological Science*, v.15, n.3, p.371-379, 1998.
- HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Analysis of cellular defense reactions of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*, infected with heat-sensitive mutants of *Beauveria bassiana*. *Journal Invertebrate Pathology*, v.68, n.2, p.166-169, 1996.
- HOCH, G.; SOLTER, L.F.; SCHOPF, A. Hemolymph melanization and alterations in hemocyte numbers in *Lymantria dispar* larvae following infections with different entomopathogenic microsporidia. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.113, n.2, p.77-86, 2004.
- HUNG, S.H.; BOUCIAS, D.G. Phenoloxidase activity in hemolymph of naïve and *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae. *Journal Invertebrate Pathology*, v.67, n.1, p.35-40, 1996.
- JIANG, H.; WANG, Y.; MA, C.; KANOST, M.R. Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit PPO-pl. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.27, n.10, p.835-850, 1997.
- LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.32, n.10, p.1295-1309, 2002.

LEE, M.; YOON, C.S.I.K.; YI, J.I.; CHO, J.R.; KIM, H.S. Cellular immune responses and FAD-glucose dehydrogenase activity of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) challenged with three species of entomopathogenic fungi. *Physiological Entomology*, v.30, n.3, p.287-292, 2005.

RATCLIFFE, N.A. Cellular defense responses of insects: unresolved problems. In: BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.). *Parasites and Pathogens of Insects*. San Diego: Academic Press, 1993. v.1, p.267-303.

RUSSO, J.; BREHÈLIN, M.; CARTON, Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *Journal of Insect Physiology*, v.47, n.2, p.167-172, 2001.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT User's guide, version 8.2, TS level 2MO. SAS Institute. Inc., Cary, N.C., 2001.

SASS, M.; KISS, A.; LOCKE, M. Integument and hemocyte peptides. *Journal of Insect Physiology*, v.40, n.5, p.407-421, 1994.

SEWIFY, G.H.; HASHEM, M.Y. Effect of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*

(Metsch.) Sorokin on cellular defense response and oxygen uptake of the wax moth *Galleria mellonella* L. (Lep., Pyralidae). *Journal of Applied Entomology*, v.125, n.9/10, p.533-536, 2001.

STRAND, M.R.; PECH, L.L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology*, v.40, p.31-56, 1995.

VILCINSKAS, A.; MATHA, V.; GÖTZ, P. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, v.43, n.12, p.1149-1159, 1997a.

VILCINSKAS, A.; MATHA, V.; GÖTZ, P. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *Journal of Insect Physiology*, v.43, n.5, p.415-483, 1997b.

Recebido em 7/3/07
Aceito em 19/5/08