

JÚLIO CÉSAR MELO PODEROSO

**PREDADOR VERSUS ENTOMOPATÓGENO: *Podisus distinctus* (Stal)  
(HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) DESAFIADO POR *Beauveria bassiana* e  
*Metarhizium anisopliae***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P742p  
2014

Poderoso, Júlio César Melo, 1982-  
Predador versus entomopatógeno : *Podisus distinctus* (Stal)  
(Heteroptera: Pentatomidae) desafiado por *Beauveria bassiana* e  
*Metarhizium anisopliae* / Júlio César Melo Poderoso. – Viçosa,  
MG, 2014.  
ix, 72f. : il. ; 29 cm.

Orientador: José Cola Zanúncio.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Podisus distinctus*. 2. Percevejo (Inseto). 3. Fungos  
entomopatógenos. 4. *Podisus distinctus* - Controle biológico.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.  
II. Título.

CDD 22. ed. 595.754

JÚLIO CÉSAR MELO PODEROSO

**PREDADOR VERSUS ENTOMOPATÓGENO: *Podisus distinctus* (Stal)  
(HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) DESAFIADO POR *Beauveria bassiana* e  
*Metarhizium anisopliae***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 17 de FEVEREIRO de 2014

---

Genésio Tâmara Ribeiro

---

Rosenilson Pinto

---

Jorge Abdala Dergam dos Santos

---

Jackson Victor de Araujo

---

José Cola Zanuncio  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, que é causa primária de todas as coisas, obrigado pela oportunidade que me foi dada e pela força nos momentos difíceis ao longo de minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela oportunidade de realização do curso.

Aos meus familiares, pelo apoio, carinho, pela força e motivação todos os dias de minha vida. Em especial aos meus pais, Hermogenes (in memoriam) e Maria de Fátima por todo amor e confiança que sempre depositaram em mim.

Aos Professores José Cola Zanuncio, José Eduardo Serrão e Professora Teresinha Vinha Zanuncio, pela paciência e atenção prestada a mim durante o curso.

Aos amigos e professores Genésio Tâmara Ribeiro e Gláucia Barretto, que sempre confiaram em mim desde o início da graduação em Engenharia Florestal.

Aos amigos da graduação que estiveram comigo nos momentos difíceis e alegres, Aline, Dariele, Gomes, Itamara, Allivia, Heloisa, Eliana, Priscylla, Francis, Emilene, Adailton e Carol. A gente não faz amigos, reconhece-os (Vinícius de Moraes), foi muito bom encontrar vocês em minha caminhada.

Aos irmãos que fiz em Viçosa, amigos que foram colocados por DEUS em minha vida, Kátia Fraga, Carla Ávila, Francisco, Rafael (Pará), Douglas, Tony, Dani Venâncio e Rosenilson.

A todos os amigos do Laboratório de Controle Biológico, pelo convívio e auxílio em vários momentos e aos bons colegas que fiz no Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

Aos professores da Pós-Graduação em Entomologia, pelos ensinamentos.

Aos funcionários, Dona Paula, Miriam, Sr. Moacir e Sr. Antônio pela disponibilidade, boa vontade e bons serviços prestados.

A todos que torceram e colaboraram para realização desse sonho.

## **BIOGRAFIA**

Júlio César Melo Poderoso, filho de Hermogenes Lima Poderoso e Maria de Fátima Melo Poderoso, nasceu no dia 23 de Junho de 1982, na cidade de Aracaju, Sergipe.

Iniciou a graduação em Engenharia Florestal em 2003, Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Sergipe, finalizando-a em dezembro de 2008 quando obteve o título de Engenheiro Florestal. Durante toda a graduação foi estagiário no Laboratório de Pragas Agrícolas e Florestais (LPAF), onde trabalhou com levantamentos de entomofauna em neem, controle biológico e desenvolveu projetos com percevejos predadores e extratos botânicos.

Em Março de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia no Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, trabalhando com percevejos predadores da subfamília Asopinae, sob orientação do Professor José Cola Zanuncio, defendendo a dissertação em Fevereiro de 2011.

Em Março de 2011, iniciou o curso de Doutorado em Entomologia no Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, trabalhando com *Podisus distinctus* da família Pentatomidae, sob orientação do Professor José Cola Zanuncio, defendendo a tese em Fevereiro de 2014.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                 | <b>Página</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| RESUMO .....                                                                                                                                                                                    | v             |
| ABSTRACT .....                                                                                                                                                                                  | vii           |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL.....                                                                                                                                                                        | 1             |
| 2. OBJETIVOS .....                                                                                                                                                                              | 4             |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                                                             | 5             |
| <br>                                                                                                                                                                                            |               |
| 1º ARTIGO – Exposição aos fungos <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> afetam parâmetros biológicos do predador <i>Podisus distinctus</i> (Heteroptera: Pentatomidae) ..... | 13            |
| RESUMO .....                                                                                                                                                                                    | 14            |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                                | 15            |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                                                                        | 16            |
| RESULTADOS .....                                                                                                                                                                                | 18            |
| DISCUSSÃO.....                                                                                                                                                                                  | 19            |
| AGRADECIMENTOS.....                                                                                                                                                                             | 22            |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                                                                                                 | 23            |
| <br>                                                                                                                                                                                            |               |
| 2º ARTIGO – Reação imune celular do predador <i>Podisus distinctus</i> (Heteroptera: Pentatomidae) ao fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i> .....                                | 32            |
| RESUMO .....                                                                                                                                                                                    | 33            |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                                | 34            |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                                                                        | 35            |
| RESULTADOS .....                                                                                                                                                                                | 37            |
| DISCUSSÃO.....                                                                                                                                                                                  | 38            |
| AGRADECIMENTOS.....                                                                                                                                                                             | 40            |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                                                                                                 | 41            |
| <br>                                                                                                                                                                                            |               |
| 3º ARTIGO – Predador versus entomopatógeno: defesa imune celular de <i>Podisus distinctus</i> (Heteroptera: Pentatomidae) contra <i>Beauveria bassiana</i> .....                                | 53            |
| RESUMO .....                                                                                                                                                                                    | 54            |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                                | 55            |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| MATERIAL E MÉTODOS .....         | 55 |
| RESULTADOS.....                  | 57 |
| DISCUSSÃO.....                   | 59 |
| AGRADECIMENTOS.....              | 61 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 62 |
| <br>                             |    |
| 4. CONCLUSÕES GERAIS.....        | 72 |

## RESUMO

PODEROSO, Júlio César Melo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2014. **Predador versus entomopatógeno: Podisus distinctus (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) desafiado por Beauveria bassiana e Metarhizium anisopliae** Orientador: José Cola Zanuncio. Co orientadores: José Eduardo Serrão, Teresinha Vinha Zanuncio

*Podisus distinctus* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) é uma das mais importantes espécies de percevejos predadores da família Pentatomidae. Esses inimigos naturais podem ser criados em laboratório e utilizados para o controle biológico de insetos desfolhadores. O uso de inimigos naturais nativos, especialmente zoofitofagos como *P. distinctus* é recomendável por serem generalistas. Fungos entomopatogênicos também são utilizados no controle biológico. Esses entomopatógenos, com cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies descritas, são utilizados no controle de insetos pragas e responsáveis por cerca de 80% das doenças causadas em insetos. Os fungos foram os primeiros patógenos a serem utilizados no controle microbiano, mas os insetos possuem mecanismos de defesa contra micro-organismos, através do sistema imune celular. A resposta e dinâmica do sistema imune celular em percevejos predadores são pouco conhecidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto dos entomopatógenos sobre parâmetros biológicos de *Podisus distinctus* e caracterizar a resposta imune celular contra os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Ninfas do terceiro instar do percevejo predador foram expostas topicamente as concentrações fúngicas ( $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL) de *M. anisopliae* e *B. bassiana* e o controle tratado com água destilada esterilizada contendo espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%. Os parâmetros avaliados foram porcentagem de sobrevivência ninfal, duração de cada estágio, peso de fêmeas e machos adultos oriundos de ninfas tratadas com as soluções fúngicas. Casais foram formados por concentração das soluções fúngicas de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Os parâmetros avaliados foram período de pré-oviposição e oviposição, número de ovos, posturas, ninfas por fêmea e longevidade da fase adulta de machos e fêmeas. A resposta imune do percevejo predador foi estudada com adultos de até 48h de idade. Esses adultos foram tratados topicamente com a deposição de um  $\mu$ L das suspensões do fungo nas concentrações de  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/mL e o controle recebeu um  $\mu$ L água destilada e espalhante adesivo. A sobrevivência e o número de hemócitos de machos e fêmeas de *P. distinctus* foram avaliados após 24, 48, 72, 96 e 120 horas da

aplicação do fungo. A duração e a sobrevivência das ninfas do percevejo predador foram afetadas negativamente principalmente pelo *B. bassiana*. O período de pré oviposição, número de ovos e posturas, ninfas afetados negativamente após a exposição aos fungos. O número de hemócitos circulantes foi menor em ambos os gêneros após 24 horas da exposição ao *M. anisopliae*. A sobrevivência de fêmeas e machos adultos desse percevejo predador foi menor na concentração de  $10^8$  conídios/mL de *B. bassiana*. Machos e fêmeas de *P. distinctus*, após o contato com *B. bassiana*, apresentaram menor número de hemócitos. A influência negativa da exposição aos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* indica que, apesar de eficientes no controle de insetos pragas, esses fungos entomopatogênicos, também, afetam negativamente parâmetros biológicos de insetos benéficos como *P. distinctus*. Fêmeas e machos de *P. distinctus* possuem sistema imune ativo contra o fungo *M. anisopliae*, mas isto não foi suficiente para garantir sua sobrevivência na concentração de  $10^8$  conídios/mL de *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

## ABSTRACT

PODEROSO, Júlio César Melo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2014. **Predator versus pathogen: *Podisus distinctus* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) challenged by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae***  
Adviser: José Cola Zanuncio. Co adviser: José Eduardo Serrão, Teresinha Vinha Zanuncio

*Podisus distinctus* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) is one of the most important species of predatory bugs in the Pentatomidae family. This natural predator can be created in the laboratory and used for biological control of defoliating insects. The use of natural enemies is recommended, especially generalist insects such as *Podisus distinctus*. Entomopathogenic fungi, with about 90 genera and over 700 species described, are responsible for 80% of diseases in insects and are used for biological control of pests. The fungi were the first pathogens to be used for microbial control, but insects possess defense mechanisms against micro-organisms through their cellular immune system. There is little known about the dynamic response of the cellular immune system in predatory stinkbugs. The aim of this study was to evaluate the impact of entomopathogens on biological parameters of *Podisus distinctus* and characterize the cellular immune response against fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. The fungi were topically applied to the third instar nymphs of the predatory stinkbug with concentrations:  $10^6$ ,  $10^7$ , and  $10^8$  conidia/mL of *M. anisopliae* and *B. bassiana*. The control was treated with sterile distilled water containing adhesive spreader Tween 80<sup>®</sup> / 0.01%. The parameters evaluated were the percentage of nymphal survival, duration of each stage, weight of females, and adult males originating from nymphs treated with fungal solutions. Couples were formed by concentration of fungal solutions *B. bassiana* and *M. anisopliae*. The parameters evaluated were pre-oviposition and oviposition, number of eggs, postures, nymphs per female, and longevity of adulthood for males and females. The immune response of the predatory stinkbug was studied in adults up to 48 hours old. These adults were treated topically with the deposition of a  $\mu\text{L}$  of the fungal suspensions in concentrations of  $10^6$ ,  $10^7$ , and  $10^8$  conidia/mL; the control received a  $\mu\text{L}$  of spreader-sticker and distilled water. After 24, 48, 72, 96, and 120 hours of application the number of surviving *P. distinctus* males and females were evaluated. The hemocyte count of *P. distinctus* males and females were taken at each interval. The duration and survival of nymphs of the predatory stinkbug were negatively

affected primarily by *B. bassiana*. The pre-oviposition period, number of eggs, and postures of nymphs were negatively affected after exposure to molds. The number of circulating hemocytes was lower in both genders after 24 hours of exposure to *M. anisopliae*. The survival of adult males and females of this predator stinkbug was lower in concentration of  $10^8$  conidia/mL of *B. bassiana*. Males and females of *P. distinctus*, after contact with *B. bassiana*, had fewer hemocytes. The negative influence of exposure to fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* indicates that although it is effective in controlling pests, these entomopathogenic fungi also negatively affect biological parameters of beneficial insects such as *P. distinctus*. Females and males of *P. distinctus* have an active immune system against the fungus *M. anisopliae*, but this was not enough to ensure their survival in the concentration of  $10^8$  conidia/mL of *M. anisopliae* and *B. bassiana*.

## 1. INTRODUÇÃO

Métodos de controle de insetos pragas têm dado maior ênfase a métodos naturais para reduzir o uso de químicos. É por isso que o desenvolvimento de métodos naturais de controle de insetos ou biopesticidas é estudada atualmente (SHAHID et al., 2012).

O uso de entomófagos tem um papel importante no manejo integrado de pragas (MIP) (SAAVEDRA et al., 1997, TIPPING et al., 1999, MEDEIROS et al., 2000). Dentre as espécies de entomófagos estão os percevejos predadores. *Podisus* é um dos gêneros mais importantes de percevejos predadores no Brasil (ZANUNCIO et al., 1994; MEDEIROS et al., 2000; LEMOS et al., 2003), destacando-se *Podisus distinctus* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae), com ocorrência desde o Paraguai a Guiana Francesa (THOMAS, 1992).

*Podisus distinctus* é um agente de controle biológico de pragas em florestas de eucalipto no Brasil (THOMAS, 1992) e, por isto a biologia reprodutiva, capacidade predatória e susceptibilidade a substâncias inseticidas desse predador são importantes para o manejo integrado de pragas (TAVARES et al., 2010).

Fungos entomopatogênicos atuam na regulação ecológica natural de insetos podendo causar ao declínio das populações hospedeiras por epizootias (VEGA et al., 2009; MEYLING & HAJEK, 2010).

*Metarhizium anisopliae* (Sorokin) e *Beauveria bassiana* (Vuillemin) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) são utilizados como alternativas aos pesticidas químicos e tem atividade inseticida contra uma ampla gama de hospedeiros (LORD, 2005).

*Beauveria bassiana*, com mais de 700 hospedeiros é usado no controle de pragas e outros artrópodes que atuam como vetores de doenças, incluindo mosquitos e carrapatos (SHAH & PELL, 2003; BLANFORD et al., 2005; MARTI et al., 2005; CRUZ et al., 2006; KLINGER et al., 2006).

*Metarhizium anisopliae* é um fungo entomopatogênico de uma ampla gama de artrópodes, insetos pragas agrícolas e vetores de doenças humanas (ARRUDA et al., 2005; MENT et al., 2010; SANTI et al., 2010). Este fungo é encontrado no solo (até  $10^6$  propágulos por grama) e em uma variedade de ecossistemas podendo infectar mais de 200 espécies de insetos (MILNER, 1991; ROBERTS & HAJEK,

1992; LEGER, 1993; MAGALHAES et al., 2001; EKESI et al., 2005; SCHOLTE et al., 2006; ONDIAKA et al., 2008).

O processo de infecção do hospedeiro por fungos começa com conídios aderidos à superfície do hospedeiro, seguido pela penetração no tegumento. Os conídios são a fase, normalmente, utilizada em campo em programas de controle biológico e envolvida em reconhecimento do hospedeiro e infecção (SANTI et al., 2010; SHAHID et al., 2012)

A cutícula e o mesêntero de insetos são a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos (LEVY et al., 2009) a quebras dessas barreiras podem desencadear reações imunológicas divididas em respostas de defesa humoral e celular (LAVINE & STRAND, 2002). A primeira realiza os processos de coagulação da hemolinfa, melanização e produção de peptídeos antimicrobianos sem a participação direta dos hemócitos (VILMOS & KURUCZ, 1998). O segundo meio de defesa são reações mediadas pelos hemócitos e conhecidas como reação celular (CERENIUS & SÖDERHÄLL, 2004; FELDHAAAR & GROSS, 2008). Essa reação é ativada após o reconhecimento dos patógenos e estimula um sistema de resposta com a participação de proteínas especializadas dos hemócitos que se ligam a polissacarídeos de bactérias ou fungos (GILLESPIE et al., 1997).

Hemócitos são células morfologicamente distintas circulando livremente na hemolinfa de insetos e atuando na resposta imune celular (GILLESPIE et al., 1997; LAVINE & STRAND, 2002). Os granulócitos, plasmatócitos e prohemócitos, são os hemócitos mais abundantes nos insetos e os principais atuantes na defesa contra organismos invasores (GILLESPIE et al., 1997).

Essas células atacam microorganismos invasores que são isolados por fagocitose formando agregados ou nódulos e, também, pela formação de uma cápsula multicelular ao redor do invasor de maior tamanho (encapsulação) (LAVINE & STRAND, 2002).

Função imunológica de insetos tem sido estudada, principalmente, para espécies solitárias das ordens Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera e Mecoptera (LAWNICZAK et al., 2007) mas pouco conhecida para percevejos predadores Pentatomidae.

*Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* possuem uma ampla gama de hospedeiros, sendo importante determinar o impacto desses fungos sobre artrópodes benéficos (LUDWIG & OETTING 2001; JARONSKI, 2010).

O gasto energético elevado para eliminar um patógeno pode comprometer componentes importantes na história de vida e trazer consequências em diversos aspectos biológicos e reprodutivos do inseto (HAJEK & BUTLER, 2000; AWMACK & LEATHER, 2002).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Observar o impacto da exposição dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre o predador *Podisus distinctus*.

### **2.2 Objetivos específicos**

Observar o impacto da exposição dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* na sobrevivência e duração dos instares ninfais de *Podisus distinctus*.

Avaliar o efeito da exposição dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* nos parâmetros reprodutivos de *Podisus distinctus*.

Identificar se ocorrem alterações na sobrevivência e dinâmica hemocitária de fêmeas e machos adultos de *P. distinctus* expostos a *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. (Piracicaba: FEALQ, 1998), pp. 21-34.

ARRUDA, W.; LUBECK, I.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Experimental & Applied Acarology**, v. 37, p. 231-244, 2005.

AWMACK, C. S.; LEATHER, S. R. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 817-844, 2002.

BELLOWS, T. S.; VAN DRIESCHE, R. G.; ELKINTON, J. S. Life-table construction and analysis in the evaluation of natural enemies. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 587-612, 1992.

BRAGANÇA, M. A. L.; ZANUNCIO, J. C.; PICANÇO, M. C.; LARANJEIRO, A. J. Effects of environmental heterogeneity on Lepidoptera and Hymenoptera populations in Eucalyptus plantations in Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 103, p. 287-292, 1998.

BLANFORD, S.; CHAN, B. H.; JENKINS, N.; SIM, D.; TURNER, R. J.; READ, A. F.; THOMAS, M. B. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. **Science**, v. 308, p. 1638-1641, 2005.

CASTRO, A. A.; LACERDA, M. C.; ZANUNCIO, T. V.; RAMALHO, F. S.; POLANCZYK, R. A.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO J. C. Effect of the insect growth regulator diflubenzuron on the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Ecotoxicology**, v. 21, p. 96-103, 2012.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 116-126, 2004.

CRUZ, L. P.; GAITAN, A. L.; GONGORA, C. E. Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 918-926, 2006.

DE CLERCQ, P.; MOHAGHEGH, J.; TIRRY, L. Effect of host plant on the functional response of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Biological Control**, v. 18, p. 65-70, 2000.

DUBOVSKIY, I. M.; WHITTEN, M. M. A.; YAROSLAVTSEVA, O. N.; GREIG, C.; KRYUKOV, V. Y.; GRIZANOVA, E. V.; MUKHERJEE, K.; VILCINSKAS, A.; GLUPOV, V. V.; BUTT, T. M. Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? **Plos One**, v. 8, p. 1-9, 2013.

EKESI, S.; MANIANIA, N.; LUX, S. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, p. 157-167, 2005.

FELDHAAR, H.; GROSS, R. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 1082-1083, 2008.

FRANÇA, I. W. B.; MARQUES E. J.; TORRES, J. B.; OLIVEIRA, J. V. Efeitos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 349-356, 2006.

GARCIA, J. F.; BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Scientia Agricola**, v. 63, p. 317-320, 2006.

GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 611-643, 1997.

HAJEK, A.; BUTLER, L. **Predicting the host range of entomopathogenic fungi.** In: FOLLETT, P. A., DUAN, J.J. (Eds.), Nontarget effects of biological control. (Kluwer Academic Press, 2000), pp. 263-276.

JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, p. 159-185, 2010.

KLINGER, E.; GRODEN, E.; DRUMMOND, F. Beauveria bassiana horizontal infection between cadavers and adults of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Environmental Entomology**, v. 35, p. 992-1000, 2006.

KREBS, C. J. **Ecology.** The experimental analysis of distribution and abundance. New York: Harper Collins, 1994. 801 p.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 1295-1309, 2002.

LAWNICZAK, M. K. N.; BARNES, A. I.; LINKLATER, J. R.; BOONE, J. M.; WIGBY, S.; CHAPMAN, T. Mating and immunity in invertebrates. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, p. 48-55. 2007.

LEGER, R. J. In **Parasites and Pathogens of Insects**, BECKAGE, N. C.; THOMPSON, S. N.; FEDERICI, B. A., Eds. (Academic Press, New York, 1993), pp. 211-229.

LEMOS, W. P.; RAMALHO, F. S.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Effects of diet on development of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae), a predator of the cotton leafworm. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 389-395, 2003.

LEMOS, W. P.; RAMALHO, F. S.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Morphology of female reproductive tract of the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on different diets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 129-138, 2005a.

LEMONS, W. P.; SERRÃO, J. E.; RAMALHO, F. S.; ZANUNCIO, J.C.; LACERDA, M.C. Effect of diet on male reproductive tract of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, p. 91-96, 2005b.

LEVY, S. M.; MOSCARDI, F.; FALLEIROS, B.; SILVA, R. J.; GREGÓRIO, E. A. A morphometric study of the midgut in resistant and non-resistant *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, p. 17-22, 2009.

LORD, J. C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.89, p. 19-29, 2005.

LUDWIG, S. W.; OETTING, R. D. Susceptibility of natural enemies to infection by *Beauveria bassiana* and impact of insecticides on *Iphesius degenerans* (Acari: Phytoseiidae). **Journal of Agriculture and Urban Entomology**, v. 18, p. 169-178, 2001.

MAIA, A. H. N.; LUIZ, A. J. B.; CAMPANHOLA, C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using Jackknife technique: computational aspects. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 511-518, 2000.

MAGALHAES, B. P.; De FARIA, M. R.; LECOQ, M.; SCHMIDT, F. G. V.; SILVA, J. B. T.; FRAZAO, H. S.; BALANÇA, G.; FOUCART, A. The use of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* against the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in Brazil. **Journal of Orthoptera Research**, v. 10, p. 199-202, 2001.

MARTI, G. A.; SCORSETTI, A. C.; SIRI, A.; LASTRA, C. C. Isolation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) from the Chagas disease vector, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Argentina. **Mycopathologia**, v. 159, p. 389-391, 2005.

MEDEIROS, R. S.; RAMALHO, F. S.; LEMOS, W. P.; ZANUNCIO, J. C. Age-dependent fecundity and life-fertility tables for *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 124, p. 319-324, 2000.

MEDEIROS, R. S.; RAMALHO, F. S.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Temperature influence on the reproduction of *Podisus nigrispinus*, a predator of the Noctuidae larva *Alabama argillacea*. **BioControl**, v. 48, p. 695-704, 2003.

MENT, D.; GINDIN, G.; ROT, A.; SOROKER, V.; GLAZER, I.; BAREL, S.; SAMISH M. Novel technique for quantifying adhesion of *Metarhizium anisopliae* conidia to the tick cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 3521-3528, 2010.

MEYLING, N. V.; HAJEK, A. E. Principles from community and metapopulation ecology: application to fungal entomopathogens. **Biocontrol**, v. 55, p. 39-54, 2010.

MILNER, R. J. in **Biological Control of Locusts and Grasshoppers**, LOMER C. J.; PRIOR, C., Eds. (CAB International, Wallingford, UK, 1991), pp. 200-207

MOLINA, D. E.; CARBONE, S. S. Toxicity of synthetic and biological insecticides against adults of the Eucalyptus snout-beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 297-305, 2010.

MUSTU, M.; DEMIRCI, F.; KOÇAK E. Mortality effects of *Isaria farinose* (Holm.) and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Sordariomycetes: Hypocreales) on *Aelia rostrata* Boh. (Hemiptera: Pentatomidae). **Türkiye Entomoloji Derneği**, v. 35, p. 559-568, 2011.

ONDIKA, S.; MANIANIA, N. K.; NYAMASYO, G. H. N.; NDERITU, J. H. Virulence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to sweet potato weevil *Cylas puncticollis* and effects on fecundity and egg viability. **Annals of Applied Biology**, v. 153, p. 41-48, 2008.

RABINOVICH, J. E. **Ecología de poblaciones animales**. Washington: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1978. 114 p.

RIBEIRO, C.; BREHÉLIN, M. Insect haemocytes: What type of cell is that? **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 417-429, 2006.

ROBERTS, D. W.; HAJEK, A. in **Frontiers in Industrial Mycology**, LEATHAN, G. F., Ed. (Chapman & Hall, New York, 1992), pp. 144-159

SAAVEDRA, J. L. D.; ZANUNCIO, J. C.; ZANUNCIO, T. V.; GUEDES, R. N. C. Prey capture ability of *Podisus nigrispinus* (Dallás) (Heteroptera: Pentatomidae) reared for successive generations on a meridic diet. **Journal of Applied Entomology**, v. 121, p. 327-330, 1997.

SANTI, L.; BEYS SILVA, W. O.; BERGER, M.; GUIMARES, J. A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, p. 874-880, 2010.

SCHOLTE, E.; KNOLS, B. G. J.; TAKKEN, W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 91, p. 43-49, 2006.

SOUTHWOOD, T. R. E. **Ecological methods with particular reference to the study of insect populations**. Chapman and Hall. London, 1978. 546p.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 413-423, 2003.

SHAHID, A. A.; RAO, A. Q.; BAKHSH, A.; HUSNAIN T. Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. **Archives of Biological Sciences**, v. 64, p. 21-42, 2012.

TAVARES, W. S.; COSTA, M. A.; CRUZ, I.; SILVEIRA, R. D.; SERRÃO J. E.; ZANUNCIO, J. C. Selective effects of natural and synthetic insecticides on mortality of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 45, p. 1-5, 2010.

TIPPING, P. W.; HOLKO, C. A.; ABDUL-BACK, A. A.; ADRICH, J. R. Evaluating *Edovum puttleri* and *Podisus maculiventris* (Say) for augmentative biological control of Colorado potato beetle in tomatoes. **Biology Control**, v. 16, p. 35-42, 1999.

THOMAS, D. B. **Taxonomic synopsis of the Asopinae Pentatomidae (Heteroptera) of the Western Hemisphere**. Lanham: Entomological Society of America, 1992. 156 p.

VEGA, F. E.; GOETTEL, M. S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M. A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, N. K.; MONZÓN, A.; OWNLEY, B. H.; PELL, J. K.; RANGEL, D. E. N.; ROY, H. E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, p. 149-159, 2009.

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, p. 475-483, 1997.

VILMOS, P.; KURUCZ, E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. **Immunology Letters**, v. 62, p. 59-66, 1998.

ZANUNCIO, J. C.; ALVES, J. B.; ZANUNCIO, T. V.; GARCIA, J. F. Hemipterous predators of eucalypt defoliators caterpillars. **Forest Ecology and Management**, v. 65, p. 65-73, 1994.

ZANUNCIO, J. C.; ZANUNCIO, T. V.; GUEDES, R. N. C.; RAMALHO, F. S. Effect of feeding on three *Eucalyptus* species on the development of *Brontocoris*

tabidus (Het.: Pentatomidae) fed with *Tenebrio molitor* (Col.: Tenebrionidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 443-450, 2000.

ZANUNCIO, J. C.; LACERDA, M. C.; ZANUNCIO JÚNIOR, J. S.; ZANUNCIO, T. V.; SILVA, M. C.; ESPÍNDULA, M. C. Fertility table and rate of population growth of the predator *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) on one plants of *Eucalyptus cloeziana* in the field. **Annals of Applied Biology**, v. 144, p. 357-361, 2004.

ZANUNCIO, J. C.; BESERRA, E. B.; MOLINA-RUGAMA, A. J.; ZANUNCIO, T. V.; PINON, T. B. M.; MAFFIA, V. P. Reproduction and longevity of *Supputius cincticeps* (Het.: Pentatomidae) fed with larvae of *Zophobas confusa*, *Tenebrio molitor* (Col.: Tenebrionidae) or *Musca domestica* (Dip.: Muscidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 771-777, 2005.

ZANUNCIO, J. C.; JUSSELINO-FILHO, P.; RIBEIRO, R. C.; ZANUNCIO, T.V.; RAMALHO F.S.; SERRÃO, J. E. Hormetic responses of a stinkbug predator to sublethal doses of pyrethroid. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, p. 608-614, 2011.

CAPÍTULO 1

**EXPOSIÇÃO AOS FUNGOS *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* AFETAM PARÂMETROS BIOLÓGICOS DO  
PREDADOR *Podisus distinctus* (HETEROPTERA:  
PENTATOMIDAE)**

## **Exposição aos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* afetam parâmetros biológicos do predador *Podisus distinctus* (Heteroptera: Pentatomidae)**

### **Resumo**

A família Pentatomidae possui espécies importantes de percevejos predadores, como *Podisus distinctus* (Stal) (Hemiptera: Pentatomidae). Este inimigo natural tem sido estudado pelo potencial no controle biológico de insetos praga. Fungos entomopatogênicos como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* também são promissores agentes de controle biológico. O sucesso de entomopatógenos como agentes de controle biológico depende não só da alta eficácia contra insetos pragas, mas também de baixa virulência contra os insetos não-alvo. O objetivo desse trabalho foi avaliar o impacto dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre os parâmetros biológicos do percevejo predador *P. distinctus*. Ninfas do terceiro instar do percevejo predador foram expostas topicamente as concentrações fúngicas ( $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL) de *M. anisopliae* e *B. bassiana* e o controle foi tratado com água destilada esterilizada contendo espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%. Os parâmetros avaliados foram porcentagem de sobrevivência ninfal, duração de cada estágio, peso de fêmeas e de machos adultos. Casais foram formados por adultos oriundos de ninfas expostas as concentrações das soluções fúngicas de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Os parâmetros avaliados foram período de pré-oviposição e oviposição, número de ovos, número de posturas, de ninfas por fêmea e longevidade da fase adulta de machos e fêmeas. A duração e sobrevivência das ninfas do percevejo predador foram afetadas principalmente em ninfas expostas ao *B. bassiana*. As fêmeas de *P. distinctus* também tiveram o período de pré oviposição, número de ovos, posturas, ninfas afetados pela exposição aos fungos entomopatogênicos. A influência negativa causada pela exposição dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* indica que apesar de ser eficiente no controle de insetos pragas os fungos entomopatogênicos também afetam negativamente parâmetros biológicos de insetos benéficos como foi o caso do *P. distinctus*.

**Palavras-chave:** Entomopatógenos; percevejo, controle biológico, inseto não alvo

## 1. INTRODUÇÃO

Percevejos predadores ocorrem desde regiões de clima temperado até as de clima tropical. Heteropteras predadores em sua maioria são generalistas se alimentando de insetos praga e por isso são vistos como insetos benéficos. Algumas famílias, principalmente os Pentatomidae, são foco de pesquisas devido seu potencial no controle biológico de insetos praga (LUNDGREN, 2012).

Podisus é um dos gêneros mais importantes da família Pentatomidae relatado no Brasil (ZANUNCIO et al., 1994), destacando-se Podisus distinctus (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) como uma das principais espécies desse gênero, com ocorrência desde o Paraguai até a Guiana Francesa (THOMAS, 1992).

Fungos entomopatogênicos também são promissores agentes de controle biológico, são mais eficazes no controle de pragas que bactérias e vírus que devem ser ingeridos para causar a doença, enquanto que os fungos entomopatogênicos infectam insetos através do contato (TSUDA et al., 1996; TSUDA et al., 1997, MENT et al., 2010). Existem cerca de 1000 espécies conhecidas de fungos entomopatogênicos, muitos dos quais são ascomicetos (VEGA et al., 2012).

O fungo *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) é um dos mais comuns entomopatógenos com distribuição mundial (SCHOLTE et al., 2004). *Metarhizium* tem sido amplamente pesquisado e foi relatado por ter potencial para utilização como agente de controle biológico de insetos pragas (LIU et al., 2003; KHASHAVEH et al., 2008). O *M. anisopliae* é promissor devido vasto espectro de infecciosidade para uma gama elevada de insetos das ordens Orthoptera, Homoptera, Lepidoptera, Coleoptera, Diptera (ZIMMERMANN, 2007; MENT et al., 2010; VEGA et al., 2012).

O fungo *Beauveria bassiana* (Vuillemin) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) é generalista infectando artrópodes de importância agrícola. Esporos desse fungo, após a pulverização, persistem nas folhas e caule das plantas por duas semanas tornando o controle biológico viável por um período maior (SHAH & PELL, 2003; CRUZ et al., 2006; KLINGER et al., 2006; CASTRILLO et al., 2010).

A patogenicidade elevada do *M. anisopliae* e *B. bassiana* para pentatomídeos pragas sugere que esse patógeno é um agente de controle microbiano candidato para

percevejos pragas como *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, *Plautia stali* e *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) (TSUDA et al., 1996; SOSA-GÓMEZ & MOSCARDI, 1998; IHARA et al., 2001). No entanto, esses fungos também podem afetar pentatomídeos predadores (TODOROVA et al., 2002).

O sucesso de entomopatógenos como agentes de controle biológico depende não só da alta eficácia contra insetos pragas, mas também de baixa virulência contra os insetos não-alvo (THUNGRABEAB & TONGMA, 2007). Além disso, *B. bassiana* e *M. anisopliae* são conhecidos por terem ampla gama hospedeira e o uso de tais agentes de controle biológico para controle de insetos pragas pode ter efeito sobre insetos benéficos, como inimigos naturais.

O impacto de fungos entomopatogênicos sobre pentatomídeos predadores é pouco conhecido e deve ser abordado para esclarecer a adequação para essa aplicação quando percevejos predadores estão presentes. O estudo teve como objetivo investigar o efeito de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre parâmetros biológicos do inimigo natural *Podisus distinctus*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Controle Biológico de Insetos (LCBI) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, Brasil, a  $24,8 \pm 1,1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70,0 \pm 9,5\%$  e fotoperíodo de 12 h.

Ovos de *Podisus distinctus* foram obtidos da criação massal desse predador do LCBI da UFV mantida com pupas de *Tenebrio molitor*. Esses ovos foram colocados em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro e 1,2 cm de altura, com um chumaço de algodão umedecido para reduzir o ressecamento e fonte de água.

### **Obtenção das suspensões entomopatogênicas**

As suspensões dos formulados de Boveril<sup>®</sup> WP (*Beauveria bassiana*, isolado ESALQ PL 63) e Metarril<sup>®</sup> WP (*Metarhizium anisopliae*, isolado ESALQ E9) foram preparadas com água destilada e espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%. As concentrações fúngicas utilizadas no experimento foram  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL (IHARA et al., 2008; MUŞTU et al., 2011).

### **Exposição de *Podisus distinctus* a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae***

Ninfas de terceiro instar, com 48h de idade de *P. distinctus*, foram tratadas topicamente com a deposição de um  $\mu\text{L}$  das suspensões dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* na concentração de  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL. O controle foi tratado com água destilada esterilizada contendo espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%. As aplicações das soluções fúngicas foram feitas no dorso dos insetos com um micropipetador (DUBOVSKIY et al., 2013).

Duzentas e oitenta ninfas de *P. distinctus* foram individualizadas em placas, após os tratamentos, e receberam presas e umidade sempre que necessário. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 40 repetições, tendo um indivíduo por repetição. Os parâmetros avaliados, diariamente, foram: (a) porcentagem de sobrevivência ninfal; (b) duração de cada estágio; (c) peso de fêmeas e de machos adultos oriundos das ninfas tratadas. Todos esses parâmetros foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando Modelos Lineares Gerais (GLM) que foram gerados para testar os efeitos específicos das concentrações de conídios e dos fungos testados.

### **Parâmetros reprodutivos**

Casais adultos de *P. distinctus* provenientes das ninfas tratadas com *B. bassiana* e *M. anisopliae*, foram formados três dias após a emergência dentro da mesma concentração em que as ninfas foram submetidas. Cada casal de percevejo foi colocado em um pote de 500 ml transparente para acasalarem. Nessa fase os adultos foram alimentados com pupa de *T. molitor* e a água foi fornecida através de um chumaço de algodão úmido colocado na parte superior interna da tampa. As posturas foram retiradas dos copos com o auxílio de um chumaço de algodão e colocadas em placas de Petri, sendo mantidas em câmara tipo BOD e sob as mesmas condições anteriormente reportadas. Os ovos e ninfas foram descartados após serem contados sob lupa. Doze casais foram formados por concentração das soluções fúngicas de *B. bassiana* e *M. anisopliae* ( $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL) e doze casais provenientes das ninfas tratadas com água destilada esterilizada contendo espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01% (controle).

Os parâmetros avaliados foram período de pré-oviposição e oviposição, número de ovos, número de posturas, de ninfas por fêmea e longevidade da fase

adulta de machos e fêmeas. Todos esses parâmetros foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando PROC GLM.

### 3. RESULTADOS

A duração do terceiro instar de *P. distinctus* foi significativamente maior em ninfas expostas a concentração de  $10^8$  conídios/mL ( $F= 10,23$ ;  $p<0,01$ ) da solução fúngica de *B. bassiana*. O aumento da duração do terceiro instar do percevejo predador por *B. bassiana* não foi observado para *M. anisopliae* ( $F= 11,01$ ;  $p<0,01$ ). A duração do quarto instar de *P. distinctus* não diferiu significativamente do controle em nenhuma das concentrações das soluções fúngicas testadas ( $F= 2,4$ ;  $p\geq 0,05$ ). Ninfas do quinto instar do percevejo predador tiveram maior duração ninfal quando expostas as concentrações  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL ( $F= 7,7$ ;  $p<0,01$ ) das soluções fúngicas, sendo *B. bassiana* o fungo que mais afetou no aumento da duração do quinto instar do *P. distinctus* ( $F= 5,5$ ;  $p\leq 0,05$ ) (Tabela 1).

As ninfas do terceiro instar de *P. distinctus* tiveram a porcentagem de sobrevivência reduzida quando expostas as três concentrações da solução fúngica de *B. bassiana* ( $F= 6,4$ ;  $p<0,01$ ), já o fungo *M. anisopliae* reduziu a sobrevivência das ninfas apenas na concentração de  $10^8$  conídios/mL ( $F= 5,1$ ;  $p<0,01$ ). Apenas ninfas expostas ao fungo *B. bassiana* reduziu a sobrevivência em ninfas do quarto ( $F= 2,3$ ;  $p\geq 0,05$ ) e do quinto instar ( $F= 2,4$ ;  $p\leq 0,05$ ) na concentração de  $10^8$  conídios/mL (Tabela 2).

Fêmeas de *P. distinctus* expostas aos fungos entomopatogênicos tiveram maior período de pré-oviposição ( $F= 8,2$ ;  $p<0,01$ ) principalmente na concentração de  $10^8$  conídios/mL do fungo *M. anisopliae* ( $F= 8,3$ ;  $p<0,01$ ). O período de oviposição não apresentou redução significativa entre as concentrações ( $F= 1,0$ ;  $p\geq 0,05$ ) e entre os fungos testados ( $F= 1,2$ ;  $p\geq 0,05$ ) (Tabela 3).

Fêmeas de *P. distinctus* tiveram o número de ovos ( $F= 23,3$ ;  $p<0,01$ ) e de posturas ( $F= 9,8$ ;  $p<0,01$ ) reduzido em todas as concentrações das soluções fúngicas utilizadas no experimento. O número de ninfas por fêmeas de *P. distinctus* também foi menor em todas as concentrações aplicadas ( $F= 35,0$ ;  $p<0,01$ ) e não diferiu entre os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* ( $F= 0,7$ ;  $p\geq 0,05$ ) (Tabela 3).

O peso de machos adultos de *P. distinctus* foi significativamente menor na concentração  $10^8$  conídios/mL do *M. anisopliae* e  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL de *B.*

bassiana ( $F= 26,3$ ;  $p<0,01$ ) (Figura 1A). A longevidade desses machos foi significativamente menor na concentração  $10^8$  conídios/mL ( $F= 11,5$ ;  $p<0,01$ ) e não diferiu significativamente entre *M. anisopliae* e *B. bassiana* ( $F= 1,1$ ;  $p\geq 0,05$ ) (Figura 1C).

Fêmeas adultas de *P. distinctus* tiveram menor peso quando expostas ao *M. anisopliae* na concentração de  $10^8$  conídios/mL e *B. bassiana* nas concentrações de  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL de *B. bassiana* ( $F= 41,6$ ;  $p<0,01$ ) (Figura 1B). A longevidade dessas fêmeas foi significativamente menor em todas as concentrações de *B. bassiana* e na concentração de  $10^8$  conídios/mL de *M. anisopliae* ( $F= 9,5$ ;  $p<0,01$ ) (Figura 1D).

#### 4. DISCUSSÃO

A duração dos instares de *P. distinctus* foi maior quando expostos aos fungos entomopatogênicos, principalmente o *B. bassiana*. O aumento da duração dos instares em insetos contaminados por patógenos se deve a redução da taxa de alimentação reduzindo a taxa de crescimento (BAUER & NORDIN, 1988; POPRAWSKI et al., 1998; ROY et al., 2006)

A sobrevivência de ninfas de *P. distinctus* foi menor quando expostos ao fungo *B. bassiana*. Sugere-se que percevejos são naturalmente resistentes à infecção fúngica por *B. bassiana* (SOSA-GÓMEZ & MOSCARDI, 1998) fato que não corrobora com os resultados obtidos no experimento com *P. distinctus*.

Assim como os *P. distinctus* o percevejo predador *Perillus bioculatus* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) exposto ao fungo *B. bassiana* também teve a sobrevivência reduzida (TODOROVA et al., 2002). A redução da sobrevivência de ninfas do *P. distinctus* está relacionada à virulência de fungos entomopatogênicos que envolve quatro etapas: adesão, germinação, diferenciação e penetração. No entanto, a cutícula dos insetos possuem substâncias, como enzimas, que impedem a adesão e germinação de entomopatógenos (BOUCIAS et al., 1998; LEVY et al., 2009). Essas substâncias podem ter reduzido o potencial infeccioso do fungo *M. anisopliae* que não causou redução da mortalidade de *P. distinctus* nas concentrações de  $10^6$  e  $10^7$  conídios/mL.

No entanto, com o aumento da concentração de conídios/mL a capacidade das substâncias das enzimas, presentes na cutícula, inibirem a ação patogênica pode ser

insuficiente para conter a ação do patógeno. Ninfas de terceiro instar de *P. distinctus* tiveram redução significativa da sobrevivência quando expostos a solução de  $10^8$  conídios/mL de *M. anisopliae*. Assim como no experimento com *P. distinctus* a sobrevivência do percevejo *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae) foi reduzida à medida que aumentava a concentração do *M. anisopliae* (SOSA-GÓMEZ & MOSCARDI, 1997).

Fungos entomopatogênicos variam consideravelmente em seu modo de ação e virulência (SHAHID et al., 2012) apesar do *M. anisopliae* reduzir a porcentagem de ninfas de *P. distinctus* sobreviventes no terceiro instar apenas na concentração de  $10^8$  conídios/mL, o fungo, *B. bassiana* reduziu essa porcentagem em todas as concentrações testadas. A redução da porcentagem da sobrevivência de ninfas do percevejo predador está relacionada aos mecanismos desenvolvidos pelos fungos para a degradação das enzimas do tegumento e para a superação dos compostos de defesa de insetos (HU et al., 1996; TODOROVA et al., 2002). A mortalidade de ninfas do percevejo predador expostas ao *B. bassiana* pode estar relacionada à incapacidade das enzimas cuticulares em inibir a adesão e desenvolvimento do fungo, já que a cutícula das ninfas de hemíptero é mais suscetível à entrada desse fungo (HU et al., 1996; TODOROVA et al., 2002).

*Podisus distinctus* expostos aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* tiveram aumento no período de pré-oviposição, que está diretamente relacionado à redução da alimentação das ninfas expostas aos fungos entomopatogênicos. A inibição da alimentação já foi relatada para o predador *Serangium parcesetosum* (Coleoptera: Coccinellidae) que teve a predação e voracidade reduzidas quando expostos ao *Beauveria bassiana* (POPRAWSKI et al., 1998). A alimentação na fase ninfal afeta o peso e conseqüentemente aspectos da fisiologia reprodutiva de percevejos predadores, como o período de pré-oviposição (LEGASPI, et al., 1996; ZANUNCIO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; LEMOS et al., 2006). Portanto o aumento do período de pré-oviposição em *P. distinctus* expostos aos fungos entomopatogênicos pode estar relacionada à redução da capacidade de predação das ninfas do percevejo predador expostos aos fungos.

A redução da capacidade predatória na fase ninfal, após a exposição aos fungos, afeta o tamanho, peso de adultos e outros aspectos ligados à fisiologia reprodutiva como a redução do número total e viabilidade de ovos, fecundidade e longevidade de percevejos (POPRAWSKI et al., 1998; ROY et al., 2006;

VANDEKERKHOVE et al., 2006; SENGONCA et al., 2008; AHMADI et al., 2009, FATHI, 2009). Esses parâmetros reprodutivos também foram reduzidos em adultos *P. distinctus* originários de ninfas expostas aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Além disso, fêmeas infectadas com entomopatógenos tendem a ser menos fecundas (BRAMAN, 2000). O predador *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) quando exposto ao *Beauveria bassiana* teve a fecundidade reduzida (ROY et al., 2008). Esses fatos corroboram com o número reduzido de ovos e ninfas por fêmeas de *P. distinctus*.

A redução do número de posturas, ovos e ninfas está relacionada também a redução do peso dos adultos de *P. distinctus* oriundos de ninfas submetidos aos tratamentos com fungos entomopatogênicos. Já que Heterópteros predadores maiores e mais pesados ovipositam por maior período e maior quantidade de ovos (OLIVEIRA et al., 2005). Grande parte do peso de uma fêmea está ligada ao número de ovos que ela amadureceu (O'NEIL & WIEDENMANN, 1990; LUNDGREN, 2011). O peso e o tamanho estão correlacionados com potencial reprodutivo de percevejos. Assim, os fatores que afetam o tamanho de uma fêmea, têm importantes implicações para a capacidade reprodutiva de um percevejo (LUNDGREN, 2011) como observado em *P. distinctus* expostos a fungos entomopatogênicos.

O efeito negativo nos parâmetros biológicos avaliados em *P. distinctus* submetidos a *M. anisopliae* e *B. bassiana* está também vinculado ao gasto energético elevado para eliminar um agente exógeno. O gasto energético para combater um organismo invasor pode comprometer componentes importantes na história de vida e trazer consequências em diversos aspectos biológicos e reprodutivos de um inseto (HAJEK & BUTLER, 2000).

Casos de incompatibilidade entre fungos entomopatogênicos e predadores foram relatados incluindo o percevejo predador *Perillus bioculatus* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) e *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) (MAGALHÃES et al., 1988; JAMES & LIGHTHART, 1994; COOK, et al., 1996; TODOROVA, et al., 2002). O mesmo foi observado com o *P. distinctus* que tiveram redução da sobrevivência, longevidade, número de posturas, ovos e de ninfas por fêmeas de *P. distinctus* quando expostos às soluções fúngicas de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. O impacto desses fungos foi negativo sobre agentes de controle biológico em se tratando de segurança para uso integrado com inimigos naturais no manejo de pragas.

O impacto negativo dos parâmetros avaliados nesse trabalho reforça a característica de amplo espectro de hospedeiros dos fungos o que sugere cuidadoso critério no uso integrado com o percevejo predador *P. distinctus* quando se deseja preservar o controle exercido por ambos.

### **Agradecimentos**

Ao “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)”, a “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)”.

## 5. REFERENCIAS

AHMADI, K.; BLAESER, P.; SENGONCA, C. Prey consumption of *Orius similis* Zheng (Het., Anthocoridae) with different aphid species as prey. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v. 44, p. 119-131, 2009.

BAUER, L. S.; NORDIN, G. L. Nutritional physiology of the eastern spruce budworm *Choristoneura fumiferana*, infected with *Nosema fumiferanae*, and interactions with dietary nitrogen. **Oecologia**, v. 77, p. 44-50, 1988.

BOUCIAS, D. G.; FARMERIE, W. G.; PENDLAND, J. C. Cloning and sequencing the cDNA of the insecticidal toxin, Hirsutellin A. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 258-261, 1998.

CASTRILLO, L. A.; GRIGGS, M. H.; LIU, H.; BAUER, L. S.; VANDENBERG, J. D. Assessing deposition and persistence of *Beauveria bassiana* GHA (Ascomycota: Hypocreales) applied for control of the emerald ash borer, *Agilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae), in a commercial tree nursery. **Biological Control**, v. 54, p. 61-67, 2010.

CRUZ, L. P.; GAITAN, A. L.; GONGORA, C. E. Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 918-926, 2006.

DUBOVSKIY, I. M.; WHITTEN, M. M. A.; YAROSLAVTSEVA, O. N.; GREIG, C.; KRYUKOV, V. Y.; GRIZANOVA, E. V.; MUKHERJEE, K.; VILCINSKAS, A.; GLUPOV, V. V.; BUTT, T. M. Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? **Plos One**, v. 8, p. 1-9, 2013.

FATHI, S. A. A. The abundance of *Orius niger* (Wolf.) and *O. minutus* (L.) in potato fields and their life table parameters when fed on two prey species. **Journal of Pest Science**, v. 82, p. 267-272, 2009.

HAJEK, A.; BUTLER, L. **Predicting the host range of entomopathogenic fungi.** In: FOLLETT, P. A., DUAN, J.J. (Eds.), Nontarget effects of biological control. (Kluwer Academic Press, 2000), pp. 263-276.

HU, W. J.; HOU, R. F.; TALEKAR, N. S. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Riptortus linearis* (Hemiptera: Coreidae), a pest of soybean. **Applied Entomology and Zoology**, v. 31, p. 187-194, 1996.

IHARA, F.; KOBAYASHI N.; MISHIRO K.; SATO, T. Screening of entomopathogenic fungi against brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 36, p. 495-500, 2001.

IHARA, F.; TOYAMA, M.; MISHIRO, K.; YAGINUMA, K. Laboratory studies on the infection of stink bugs with *Metarhizium anisopliae* strain FRM515. **Applied Entomology and Zoology**, v. 43, p. 503-509, 2008.

JAMES, R. R.; LIGHTHART, B. Susceptibility of the convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to four entomogenous fungi. **Environmental Entomology**, v. 23, p. 190-192, 1994.

KHASHAVEH, A.; SAFARALIZADE, M. H.; GHOSTA, Y. Pathogenicity of the three Iranian isolates of the fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against granary weevil, *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 804-808, 2008.

KLINGER, E.; GRODEN, E.; DRUMMOND, F. *Beauveria bassiana* horizontal infection between cadavers and adults of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Environmental Entomology**, v. 35, p. 992-1000, 2006.

LIU, H.; SKINNER, M.; PARKER, B. L. Bioassay method for assessing the virulence of *Beauveria bassiana* against tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hem., Miridae). **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 299-304, 2003.

LEGASPI, J. C.; ONEIL, R. J.; LEGASPI, B. C. Trade-offs in body weights, egg loads, and fat reserves of field-collected *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). **Environmental Entomology**, v. 25, p. 155-164, 1996.

LEMOS, W. P.; RAMALHO, F. S.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C.; BAUCE, E. Diet affects reproduction and number of oocytes per ovary of the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). **Animal Biology**, v. 56, p. 279-287, 2006.

LEVY, S. M.; MOSCARDI, F.; FALLEIROS, B.; SILVA, R. J.; GREGÓRIO, E. A. A morphometric study of the midgut in resistant and non-resistant *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, p. 17-22, 2009.

LUNDGREN, J. G. Reproductive ecology of predaceous Heteroptera. **Biological Control**, v. 59, p. 37-52, 2011.

MAGALHÃES, B. P.; LORD, J. C.; WRAIGHT, S. P.; DAOUST, R. A.; ROBERTS, D. W. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Zoophthora radicans* to the coccinellid predators *Coleomegilla maculata* and *Eriopis connexa*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 471-473, 1988.

MENT, D.; GINDIN, G.; ROT, A.; SOROKER, V.; GLAZER, I.; BAREL, S.; SAMISH, M. Novel technique for quantifying adhesion of *Metarhizium anisopliae* conidia to the tick cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 3521-3528, 2010.

MUSTU, M.; DEMIRCI, F.; KOÇAK, E. Mortality effects of *Isaria farinose* (Holm.) and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Sordariomycetes: Hypocreales) on *Aelia rostrata* Boh. (Hemiptera: Pentatomidae). **Türkiye Entomoloji Derneği**, v. 35, p. 559-568, 2011.

OLIVEIRA, I.; ZANUNCIO, J. C.; SERRAO, J. E.; ZANUNCIO, T. V.; PINON, T. B. M.; FIALHO, M. C. Q. Effect of female weight on reproductive potential of the predator *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1852) (Heteroptera: Pentatomidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p. 295-301, 2005.

O'NEIL, R. J.; WIEDENMANN, R. N. Body weight of *Podisus maculiventris* (Say) under various feeding regimens. **Canadian Entomologist**, v. 122, p. 285-294, 1990.

POPRAWSKI, T. J.; LEGASPI, J. C.; PARKER, P. E. Influence of entomopathogenic fungi on *Serangium parcesetosum* (Coleoptera: Coccinellidae), an important predator of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). **Environmental Entomology**, v. 27, p. 785-795, 1998.

ROY, H. E.; STEINKRAUS, D.; EILENBERG, E.; HAJEK, A.; PELL, J. K. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 331-357, 2006.

ROY, H. E.; BROWN, P. M. J.; ROTHERY, P.; WARE, R. L.; MAJERUS, M. E. N. Interactions between the fungal pathogen *Beauveria bassiana* and three species of ladybird: *Harmonia axyridis*, *Coccinella septempunctata* and *Adalia bipunctata*. **BioControl**, v. 53, p. 265-276, 2008.

SENGONCA, C.; AHMADI, K.; BLAESER, P. Biological characteristics of *Orius similis* Zheng (Heteroptera, Anthocoridae) by feeding on different aphid species as prey. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 115, p. 32-38, 2008.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 413-423, 2003.

SHAHID, A. A.; RAO, A. Q.; BAKHSH, A.; HUSNAIN T. Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. **Archives of Biological Sciences**, v. 64, p. 21-42, 2012.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MOSCARDI, F. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p. 115–120, 1998.

THOMAS, D. B. **Taxonomic synopsis of the Asopinae Pentatomidae (Heteroptera) of the Western Hemisphere**. E. S. A. 1992. 141 p.

THUNGRABEAB, M.; TONGMA, S. Susceptibility of the Hymenopteran Parasitoid, *Habrobracon hebetor* (Say) (Braconidae) to the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* Sorokin **KMITL Science and Technology Journal**, v. 7, p. 8-12, 2007.

TODOROVA, S. I.; CÔTE, J. C.; CODERRE, C. Pathogenicity of six isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromyotina: Hyphomycetes) to *Perillus bioculatus* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 126, p. 182-185, 2002.

TSUDA, K.; YOSHIOKA, T.; TSUTSUMI, T.; YAMANAKA, M.; KAWARABATA T. Pathogenicity of some entomogenous fungi to brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, v. 40, p. 318-321, 1996.

TSUDA, K.; YOSHIOKA, T.; TSUTSUMI, T.; YAMANAKA, M.; KAWARABATA, T. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* isolates obtained from stink bugs to brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, v. 41, p. 95-98, 1997.

SCHOLTE, E. J.; KNOLS, B. G. J.; SAMSON, R. A.; TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. **Journal of Insect Science**, v. 4, p. 1-24, 2004.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MOSCARDI, F. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 115-120, 1998.

TSUDA, K.; YOSHIOKA, T.; TSUTSUMI, T.; YAMANAKA, M.; KAWARABATA, T., Pathogenicity of some entomogenous fungi to brown-winged green bug, *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae). **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, v. 40, p. 318-321, 1996.

VANDEKERKHOVE, B.; VAN BAAL, E.; BOLCKMANS, K.; DE CLERCQ, P. Effect of diet and mating status on ovarian development and oviposition in the polyphagous predator *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). **Biological Control**, v. 39, p. 532-538, 2006.

VEGA, F. E.; MEYLING, N. V.; LUANGSA-ARD, J. J.; BLACKWELL, M., 2012. **Fungal entomopathogens**. In: Vega, F., Kaya, H.K. (Eds.), *Insect Pathology*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA, pp. 171-220.

ZANUNCIO, J. C.; ALVES, J. B.; ZANUNCIO, T. V.; GARCIA, J. F. Hemipterous predators of eucalypt desfoliators caterpillars. **Forest Ecology and Management**, v. 65, p. 65-73, 1994.

ZANUNCIO, J. C.; MOLINA-RUGAMA, A. J.; SANTOS, G. P.; RAMALHO, F. S. Effect of body weight on fecundity and longevity of the stinkbug predator *Podisus rostralis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1225-1230, 2002.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 879-920, 2007.

**Tabela 1.** Duração (dias) (media  $\pm$  erro padrão) durante o III, IV e V instar das fases ninfais do *Podisus distinctus* expostas aos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sob temperatura de  $24,8 \pm 1,1$  °C, umidade relativa de  $70 \pm 9,5\%$  e fotoperíodo de 12 h.

| Instar     | III                    | IV              | V                 |
|------------|------------------------|-----------------|-------------------|
| Tratamento | Metarhizium anisopliae |                 |                   |
| controle   | $3,75 \pm 0,25$        | $4,42 \pm 0,23$ | $5,30 \pm 0,43$   |
| $10^6$     | $3,58 \pm 0,34$        | $4,67 \pm 0,22$ | $5,42 \pm 0,19$   |
| $10^7$     | $4,33 \pm 0,33$        | $5,17 \pm 0,39$ | $5,92 \pm 0,43^*$ |
| $10^8$     | $4,83 \pm 0,17$        | $5,33 \pm 0,43$ | $7,08 \pm 0,23^*$ |
|            | Beauveria bassiana     |                 |                   |
| $10^6$     | $4,42 \pm 0,31$        | $5,17 \pm 0,41$ | $6,75 \pm 0,30^*$ |
| $10^7$     | $4,90 \pm 1,00$        | $5,33 \pm 0,48$ | $6,42 \pm 0,50^*$ |
| $10^8$     | $7,50 \pm 0,19^*$      | $5,50 \pm 0,44$ | $7,30 \pm 0,45^*$ |

\* Significativamente diferente do controle ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 2.** Sobrevivência (%) (media  $\pm$  erro padrão) durante o III, IV e V instar das ninfas do *Podisus distinctus* expostas aos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sob temperatura  $24,8 \pm 1,1$  °C, umidade relativa de  $70 \pm 9,5\%$  e fotoperíodo de 12 h.

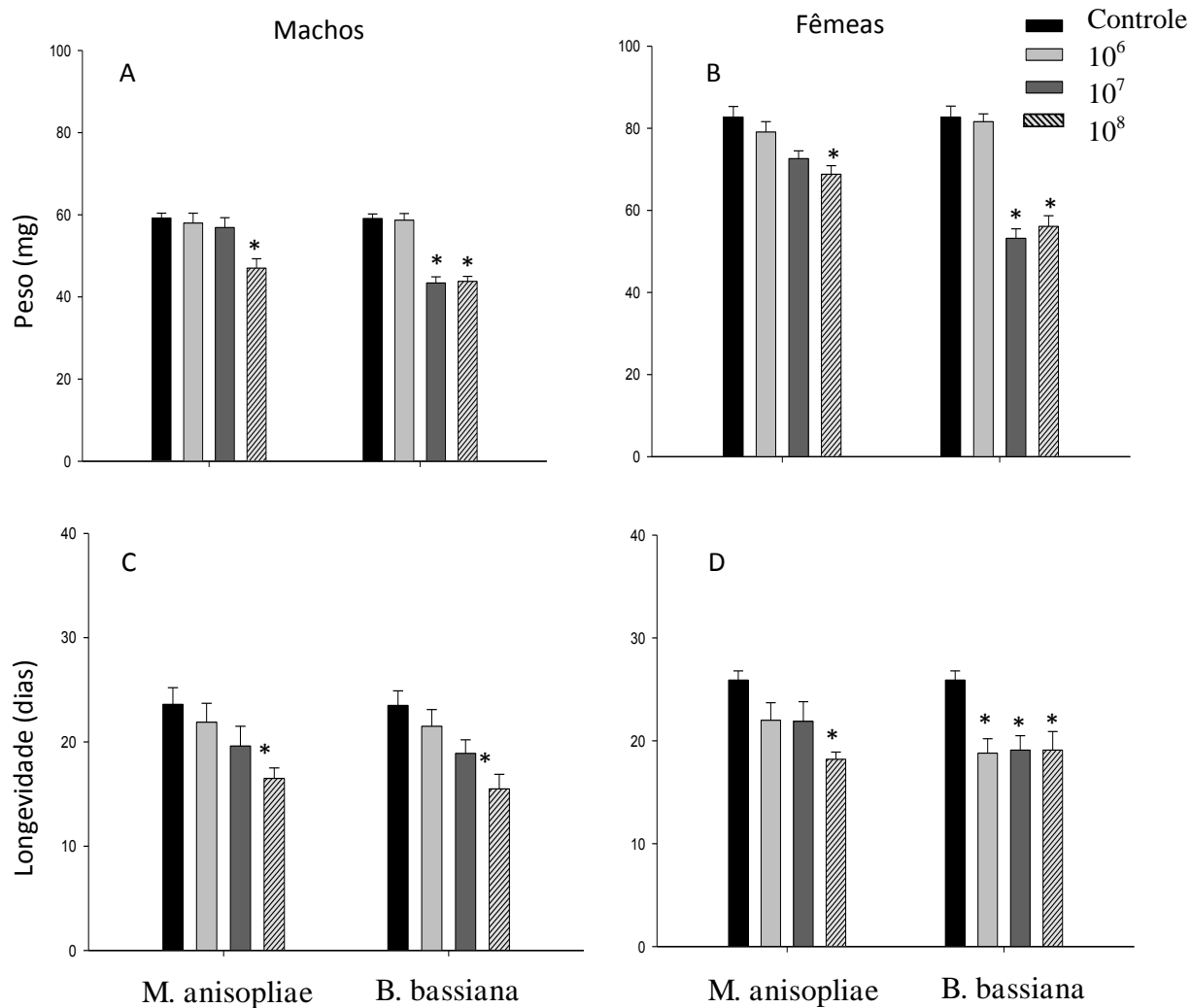
| Instar     | III                    | IV               | V                |
|------------|------------------------|------------------|------------------|
| Tratamento | Metarhizium anisopliae |                  |                  |
| controle   | $90,0 \pm 2,5$         | $98,0 \pm 2,0$   | $99,0 \pm 1,0$   |
| $10^6$     | $91,0 \pm 4,3$         | $91,2 \pm 6,1$   | $86,0 \pm 9,0$   |
| $10^7$     | $80,0 \pm 9,3$         | $86,0 \pm 9,1$   | $90,0 \pm 6,0$   |
| $10^8$     | $72,0 \pm 9,2^*$       | $79,0 \pm 6,2$   | $94,4 \pm 8,9$   |
|            | Beauveria bassiana     |                  |                  |
| $10^6$     | $76,0 \pm 9,8^*$       | $86,0 \pm 8,1$   | $86,0 \pm 9,2$   |
| $10^7$     | $64,0 \pm 7,1^*$       | $75,0 \pm 7,6$   | $88,0 \pm 8,0$   |
| $10^8$     | $56,0 \pm 7,4^*$       | $61,4 \pm 4,9^*$ | $70,0 \pm 9,1^*$ |

\* Significativamente diferente do controle ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 3.** Pré-oviposição (Pré-ovip) (dias), Oviposição (Ovip) (dias), número de posturas (P) número de ovos (O), Número de ninfas (N) media  $\pm$  erro padrão dos parâmetros biológicos de fêmeas do *Podisus distinctus* (Heteroptera: Pentatomidae) expostas aos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sob temperatura de  $24,8 \pm 1,1$  °C, umidade relativa de  $70 \pm 9,5\%$  e fotoperíodo de 12 h.

| Parâmetros | Pré-ovip                      | Ovip           | P               | O                 | N                 |
|------------|-------------------------------|----------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| Tratamento | <i>Metarhizium anisopliae</i> |                |                 |                   |                   |
| Controle   | $7,9 \pm 0,3$                 | $9,7 \pm 0,8$  | $7,1 \pm 0,3$   | $161,0 \pm 8,3$   | $137,5 \pm 8,2$   |
| $10^6$     | $10,8 \pm 0,9^*$              | $8,0 \pm 1,3$  | $4,5 \pm 0,7^*$ | $73,9 \pm 19,5^*$ | $48,2 \pm 15,0^*$ |
| $10^7$     | $10,3 \pm 0,7^*$              | $8,1 \pm 1,2$  | $4,6 \pm 0,7^*$ | $71,4 \pm 20,0^*$ | $47,8 \pm 15,2^*$ |
| $10^8$     | $14,0 \pm 0,9^*$              | $12,3 \pm 2,1$ | $3,9 \pm 0,8^*$ | $75,5 \pm 11,4^*$ | $50,8 \pm 12,3^*$ |
|            | <i>Beauveria bassiana</i>     |                |                 |                   |                   |
| $10^6$     | $7,3 \pm 0,3$                 | $10,3 \pm 1,5$ | $5,5 \pm 0,6^*$ | $87,0 \pm 13,8^*$ | $62,1 \pm 11,0^*$ |
| $10^7$     | $9,8 \pm 0,9^*$               | $7,8 \pm 1,9$  | $3,5 \pm 0,8^*$ | $56,3 \pm 13,5^*$ | $30,2 \pm 11,0^*$ |
| $10^8$     | $9,2 \pm 0,8^*$               | $8,0 \pm 1,2$  | $3,9 \pm 0,6^*$ | $57,7 \pm 6,5^*$  | $26,7 \pm 5,4^*$  |

\* Significativamente diferente do controle ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 1.** Peso e longevidade de *Podisus distinctus* (Heteroptera: Pentatomidae) expostas aos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sob temperatura de  $24,8 \pm 1,1$  °C, umidade relativa de  $70 \pm 9,5\%$  e fotoperíodo de 12 h.  
\* Significativamente diferente do controle ( $p \geq 0,05$ ).

## CAPÍTULO 2

# **REAÇÃO IMUNE CELULAR DO PREDADOR *Podisus distinctus* (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) AO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae***

## **Reação imune celular do predador *Podisus distinctus* (Heteroptera: Pentatomidae) ao fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***

### **Resumo**

Os insetos são o grupo animal de maior sucesso no mundo em termos de diversidade de espécies. O sistema imunológico destes organismos foi otimizado ao longo de milhões de anos, resultando na capacidade em ocupar praticamente todos os nichos ambientais. Fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) (Deuteromycotina: Hyphomycetes), estão associados a diversos habitats. Percevejos predadores, como *Podisus distinctus* (Heteroptera: Pentatomidae), são, generalistas e utilizados em programas de controle biológico assim como *Metarhizium anisopliae*. A interação imunológica desse predador com fungos entomopatogênicos é pouco conhecida. O objetivo desse estudo foi avaliar o impacto do fungo *M. anisopliae* na sobrevivência e dinâmica hemocitária de machos e fêmeas de *P. distinctus*. Adultos com até 48h de idade desse predador foram tratados topicamente com a deposição de um  $\mu\text{L}$  das suspensões do fungo nas concentrações de  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/mL e o controle recebeu um  $\mu\text{L}$  água destilada e espalhante adesivo. Todos os tratamentos tiveram o espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%. A sobrevivência e o número de hemócitos de machos e fêmeas de *P. distinctus* foram avaliados após 24, 48, 72, 96 e 120 horas da aplicação do fungo. Machos de *P. distinctus* apresentaram maior mortalidade que suas fêmeas. O número de hemócitos circulantes foi menor em ambos os gêneros após 24 horas do início do experimento. Fêmeas e machos *P. distinctus* possuem sistema imune ativo contra o fungo *M. anisopliae*, mas isto não foi suficiente para garantir a sobrevivência desse percevejo predador na concentração de  $10^8$  conídios/mL de *Metarhizium anisopliae*.

**Palavras chave:** Resposta celular, defesa imune, percevejo predador

## 1. INTRODUÇÃO

Percevejos predadores são utilizados no controle biológico de insetos herbívoros e considerados inimigos naturais importantes de insetos-praga (TIPPING et al., 1999; MEDEIROS et al., 2000).

Podisus é o gênero mais importante de percevejos predadores no Brasil, destacando-se *Podisus distinctus* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) (THOMAS, 1992; ZANUNCIO et al., 1994), agente de controle biológico de desfolhadores (THOMAS, 1992; HENRY & WILSON, 2004).

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) tem ampla gama de hospedeiros artrópodes, como insetos pragas agrícolas e vetores de doenças humanas (ARRUDA et al., 2005; LORD, 2005; SANTI et al., 2010). Este fungo é encontrado no solo (até  $10^6$  propágulos por grama) em uma variedade de ecossistemas infectando mais de 200 espécies de insetos (EKESI et al., 2005; SCHOLTE et al., 2006; ONDIKA et al., 2008).

Agentes de controle biológico podem ocorrer simultaneamente nos agroecossistemas controlando o mesmo ou diferentes organismos. Os fungos dependem do vento, chuva e outros fatores para sua disseminação. Por outro lado, insetos predadores explorando grandes áreas foliares podem entrar em contato com conídios dos fungos sobre as folhas, serem atingidos diretamente com o entomopatógeno aplicado ou quando esses organismos são disseminados pelo vento. A ampla gama de hospedeiros de *M. anisopliae* torna importante determinar seu impacto sobre artrópodes benéficos, pois entomopatógenos infectam insetos benéficos, incluindo predadores (LUDWIG & OETTING, 2001; ROY & COTTRELL, 2008; JARONSKI, 2010).

Reações mediadas por hemócitos são um dos meios de defesa de insetos contra patógenos (CERENIUS & SÖDERHÄLL, 2004; FELDHAAR & GROSS, 2008; VILCINSKAS, 2013). Essa reação é ativada após o reconhecimento dos patógenos e estimula um sistema de resposta imune com a participação de proteínas especializadas dos hemócitos, que se ligam aos polissacarídeos de bactérias ou fungos (GILLESPIE et al., 1997; GILLESPIE et al., 2000; STRAND, 2008; JAMES & XU, 2012).

Hemócitos são células morfologicamente distintas circulando livremente na hemolinfa de insetos e atuando na resposta imune (GILLESPIE et al., 1997; GILLESPIE et al., 2000; LAVINE & STRAND, 2002; JAMES & XU, 2012). Essas células fagocitam microorganismos, os quais são isolados formando nódulos ou formando uma cápsula multicelular ao redor do invasor de maior tamanho (encapsulação) (LAVINE & STRAND, 2002; STRAND, 2008).

A susceptibilidade a substâncias inseticidas deve ser estudada em programas de manejo integrado de pragas (TAVARES et al., 2010). O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do *Metarhizium anisopliae* na sobrevivência e dinâmica hemocitária do predador *Podisus distinctus*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico de Insetos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### **Criação dos insetos**

Adultos do percevejo predador *Podisus distinctus* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) foram colocados em gaiolas teladas de 60 x 40 x 40 cm e alimentados com pupas da presa alternativa *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1785) (Coleoptera: Tenebrionidae) com água disponibilizada em algodão umedecido. As posturas depositadas nas gaiolas foram coletadas com algodão e transferidas para placas de Petri (9,0 x 1,5 cm) com algodão umedecido. Após a eclosão, as ninfas desse predador foram mantidas nessas placas e alimentadas com pupas de *T. molitor* até a fase adulta.

### **Obtenção das suspensões**

O produto utilizado foi Metarril<sup>®</sup> WP (*Metarhizium anisopliae*, isolado ESALQ E9). A suspensão do formulado Metarril<sup>®</sup> foi preparada com água destilada e espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%. As concentrações utilizadas no experimento foram 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> conídios/mL (IHARA et al., 2008; MUSTU et al., 2011).

### **Tratamento tópico em predador**

Adultos com até 48h de idade de *P. distinctus* foram tratados topicamente com a deposição de um  $\mu\text{L}$  das suspensões do fungo na concentração de  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/mL e o controle água destilada e espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%. Esse fungo foi aplicado no dorso dos insetos com um micropipetador.

### **Sobrevivência de *Podisus distinctus* (Heteroptera: Pentatomidae) exposto a *Metarhizium anisopliae***

Adultos de *P. distinctus* foram separados em grupos de cinco por placa de Petri (9,0 x 1,2 cm) e contaminadas via aplicação tópica. Machos com peso entre 55 e 60 mg e fêmeas com peso entre 75 e 80 mg foram utilizados no experimento. A sobrevivência de *P. distinctus* foi avaliada após 24, 48, 72, 96 e 120 horas da exposição ao fungo *M. anisopliae* (MOLINA & CARBONE, 2010). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, cada uma com cinco adultos (cinco machos e cinco fêmeas) por concentração.

As curvas de sobrevivência de fêmeas e machos de *P. distinctus* foram geradas pelo método Kaplan-Meier e comparadas pelo teste Log-Rank a 5% de probabilidade.

### **Coleta da hemolinfa e contagem dos hemócitos**

Amostras de dois  $\mu\text{L}$  de hemolinfa foram coletadas com micropipeta dos percevejos predadores adultos expostos ao fungo entomopatogênico *M. anisopliae* nas concentrações de  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL. Essa hemolinfa foi acondicionado em tubos Eppendorf com 20  $\mu\text{L}$  de solução anticoagulante e 4  $\mu\text{L}$  de corante Giemsa transferidas para câmara de Neubauer com identificação e contagem total e diferencial dos hemócitos realizada com microscópio (aumento de 400 X) (RIBEIRO & BREHÉLIN, 2006).

### **Dinâmica hemocitária**

A hemolinfa de *P. distinctus*, para a contagem das células desse percevejo predador, foi coletada 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a aplicação do fungo *M. anisopliae*.

Dez machos e dez fêmeas de *P. distinctus* foram utilizados por período de avaliação e concentração da solução fúngica. Modelos Lineares Gerais (GLM) foram gerados para testar os efeitos específicos do gênero, da concentração de conídios e do tempo decorrido desde a exposição de *P. distinctus* aos conídios de *M. anisopliae* no número de hemócitos. A contribuição independente de cada uma das variáveis no número de hemócitos e as interações potenciais entre as variáveis também foram testadas.

### 3. RESULTADOS

A porcentagem de sobrevivência de fêmeas de *P. distinctus* foi menor na concentração de  $10^8$  conídios/mL ( $\chi^2=21,32$ ;  $p < 0,001$ ) de *M. anisopliae* e semelhante ao controle nas demais concentrações (Fig. 1A). Machos desse percevejo apresentaram menor percentual de sobrevivência nas concentrações de  $10^6$  ( $\chi^2=23,18$ ;  $p < 0,001$ ),  $10^7$  ( $\chi^2=10,11$ ;  $p < 0,001$ ),  $10^8$  conídios/mL ( $\chi^2=22,04$ ;  $p < 0,001$ ) de *M. anisopliae* que no controle (Fig. 1B). A sobrevivência de fêmeas de *P. distinctus* foi maior que a de machos em todas as concentrações de *M. anisopliae*, exceto na de  $10^8$  conídios/mL.

Percevejos fêmeas e machos expostos às três concentrações ( $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL) de *M. anisopliae* tiveram redução no número de hemócitos totais ( $F=20,8$ ;  $p < 0,01$ ). O menor número de hemócitos totais desse predador foi observado durante todo período avaliado ( $F=5,5$ ;  $p < 0,01$ ) demonstrando que após cinco dias de avaliações o número de hemócitos totais é significativamente menor em todas as concentrações que no controle (Fig. 2).

Machos de *P. distinctus* apresentaram menor número de prohemócitos que as fêmeas ( $F= 76,2$ ;  $p < 0,01$ ). Os conídios/mL de *M. anisopliae* reduziram o número de prohemócitos desse predador ( $F=268,1$ ;  $p < 0,01$ ), no entanto os números dessa célula não variaram significativamente ao longo do tempo de avaliação ( $F=2,0$ ;  $p \geq 0,05$ ) (Fig. 3).

O número de plasmatócitos de machos de *P. distinctus* foi menor que o de suas fêmeas ( $F=11,7$ ;  $p < 0,01$ ). A exposição desse predador as diferentes concentrações de conídios/mL de *M. anisopliae* reduziu o número dessas células, com menor valor em insetos expostos a solução com  $10^8$  conídios/mL ( $F=53,7$ ;  $p <$

0,01). O número de plasmatócitos foi menor 72 horas e manteve-se até 120 horas ( $F=18,6$ ;  $p < 0,01$ ) (Fig. 4).

O número de granulócitos foi semelhante para machos e fêmeas de *P. distinctus* ( $F=1,5$ ;  $p \geq 0,05$ ). As três concentrações de conídios/mL de *M. anisopliae* reduziram o número de granulócitos comparado ao controle ( $F=114,3$ ;  $p < 0,01$ ) (Fig. 5).

#### 4. DISCUSSÃO

A menor sobrevivência de *P. distinctus* até o quinto dia, principalmente, de machos confirma a alta virulência do fungo *M. anisopliae* observado também para *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* e *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) (SOSA-GÓMEZ & MOSCARDI, 1998).

A redução da sobrevivência de machos de *P. distinctus* até o quinto dia de avaliação pode ser explicada pelo maior tamanho das fêmeas que podem investir relativamente mais na defesa contra patógenos (BARNES & SIVA-JOTHY, 2000; SIVA-JOTHY et al., 2005; TEDER & TAMMARU, 2005), sendo fêmeas mais resistentes que os machos (ECHEVERRI-MOLINA & SANTOLAMAZZA-CARBONE, 2010). Isto corrobora com a hipótese de que machos investem mais em características sexuais em detrimento da sobrevivência (ZUK & STOEHR, 2002), enquanto fêmeas investem na resposta imune para favorecer longevidade (ROLFF, 2002).

A menor sobrevivência de machos e fêmeas de *P. distinctus* expostos a concentração de  $10^8$  conídios/mL da solução fúngica corrobora os dados para *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae) expostos ao fungo *M. anisopliae* com maior virulência nessa concentração. Portanto, a concentração mais alta utilizada ( $10^8$  conídios/ mL) causa maior mortalidade em menor período (PEREIRA et al., 2011), mostrando que quanto maior o número de conídios, maior serão as chances de aderir à cutícula da espécie hospedeira (KIRKLAND et al., 2004; MENT et al., 2010).

A redução do número de hemócitos totais e diferenciais evidencia à resposta imune celular de *P. distinctus* após o contato com o fungo *Metarhizium anisopliae*. No entanto, isto difere do observado para *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) que não tiveram alterações no número de hemócitos totais e

diferenciais quando expostos a toxina Cry1Ac da bactéria *Bacillus thuringiensis*. Isso pode estar relacionado a quantidade de toxina na hemolinfa do predador que não foi suficiente para conduzir mudanças significativas no número de hemócitos (CUNHA et al., 2013).

A redução do número de hemócitos totais até 120 horas do início do experimento demonstra a continuidade da resposta contra a infecção por *M. anisopliae* pelo predador *P. distinctus*. Isto é semelhante a redução do número total de hemócitos em *Oxya japonica* (Orthoptera: Acrididae) em todas as concentrações de *M. anisopliae*, (ANGGRAENI et al., 2011).

O maior número de prohemócitos de fêmeas de *P. distinctus* concorda com o observado para *Acheta domestica* (Orthoptera: Gryllidae) (DA SILVA et al., 2000) e confirma o fato de fêmeas de invertebrados serem, em geral, mais imunocompetentes que machos (ZUK & MCKEAN, 1996).

A redução do número de prohemócitos em *P. distinctus* vinte e quatro horas após a aplicação de *M. anisopliae* deve-se à diferenciação celular dos prohemócitos em plasmotócitos e granulócitos (YAMASHITA & IWABUCHI, 2001; LING et al., 2005).

Os menores números de plasmotócitos após 120 horas da exposição à *M. anisopliae* deve-se a infecção e reflete a continuidade da defesa celular, susceptibilidade a metabolitos fúngicos tóxicos ou atividades fagocíticas (VILCINSKAS et al., 1997; GILLESPIE et al., 2000; VEY et al., 2002).

O menor número de granulócitos de *P. distinctus*, 48 horas após ser exposto à *M. anisopliae* confirma relato de que essas células tendem a aumentar 12 horas após a infecção e diminuir ao longo do tempo de infecção. O aumento inicial do número dessa célula reflete sua função na ativação do sistema de defesa do inseto contra organismos estranhos (AJAMHASSANI et al., 2013).

A redução da sobrevivência de machos de *P. distinctus* nas diferentes concentrações de *M. anisopliae* e o menor número de hemócitos desse predador está relacionada à seleção sexual em machos, o que diminui sua imunocompetência como relatado para *Gryllus texensis* (Orthoptera: Gryllidae), *Panorpa vulgaris* (Mecoptera: Panorpidae), *Lestes viridis* (Odonata: Lestidae) (KURTZ et al., 2000; ADAMO et al., 2001; KURTZ & SAUER, 2001; ROLFF, 2001; STOEHR & KOKKO, 2006).

A maior sobrevivência e o maior número de hemócitos de fêmeas de *P. distinctus* ressalta que a defesa imunológica visa, principalmente, preservar a

sobrevivência e que o sexo que mais investe em sobrevivência, normalmente, as fêmeas, têm defesas imunitárias superiores (STOEHR & KOKKO, 2006).

*Podisus distinctus* responde imunologicamente contra o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*. No entanto, o aumento da resposta imune celular do predador à medida que a concentração conídios/mL da solução fúngica não foi suficiente para manter a sobrevivência de fêmeas desse percevejo predador. Machos de *P. distinctus* expostos as diferentes concentrações de conídios/mL das soluções de *M. anisopliae* foram mais susceptíveis, pois a resposta imune não foi capaz de manter a sobrevivência.

### **Agradecimentos**

Ao “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)”, a “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)”.

## 5. REFERÊNCIAS

ADAMO, S. A.; JENSEN, M.; YOUNGER, M. Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. **Animal Behaviour**, v. 62, p. 417-425, 2001.

AJAMHASSANI, M.; SENDI, J. J.; ZIBAE, A.; ASKARY, H.; FARSI, M. J. Immunological responses of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) to entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Bals.-Cry) and *Isaria farinosae* (Holmsk.) FR. **Journal of Plant Protection Research**, v. 53, p. 110-118, 2013.

ANGGRAENI, T.; RAMADHANI, E. P. Cellular and humoral immune defenses of *Oxya japonica* (Orthoptera: Acrididae) to entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*. **Entomological Research**, v. 41, p. 1-6, 2011.

ARRUDA, W.; LUBECK, I.; SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Experimental & Applied Acarology**, v. 37, p. 231-244, 2005.

BARNES, A. I.; SIVA-JOTHY, M. T. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. **Proceedings of the Royal Society of London Series B**, v. 267, p. 177-182, 2000.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 116-126, 2004.

CUNHA, F. M.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; SANTOS, F. A. B.; ALVES, L. C.; CAETANO, F. H. Insect/Bt-cotton interactions: are immunological variables and hemocyte ultrastructure in *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) affected? **International Journal of Pest Management**, v. 59, p. 157-164, 2013.

DA SILVA, C.; DUNPHY, G. B.; RAU, M. E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 24, p. 367-379, 2000.

ECHEVERRI-MOLINA, D.; SANTOLAMAZZA-CARBONE, S. Toxicity of synthetic and biological insecticides against adults of the Eucalyptus snout-beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 297-305, 2010.

EKESI, S.; MANIANIA, N.; LUX, S. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, p. 157-167, 2005.

FELDHAAR, H.; GROSS, R. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 1082-1083, 2008.

GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 611-643, 1997.

GILLESPIE, J. P.; BAILEY, A. M.; COBB, B.; VILCINSKAS, A. Fungi as elicitors of insect immune responses. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 44, p. 49-68, 2000.

HENRY, T. J.; WILSON, M. R. First records of eleven true bugs (Hemiptera: Heteroptera) from the Galapagos Islands, with miscellaneous notes and corrections to published reports. **Journal of the New York Entomological Society**, v. 112, p. 75-86, 2004.

IHARA, F.; TOYAMA, M.; MISHIRO, K.; YAGINUMA K. Laboratory studies on the infection of stink bugs with *Metarhizium anisopliae* strain FRM515. **Applied Entomology and Zoology**, v. 43, p. 503-509, 2008.

JAMES, R. R.; XU, J. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 175-182, 2012.

JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v.55, p.159-185. 2010.

KIRKLAND, B. H.; WESTWOOD, G. S.; KEYHANI, N. O. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 705-711, 2004.

KURTZ, J.; WIESNER, A.; GÖTZ, P.; SAUER, K. P. Gender differences and individual variation in the immune system of the scorpionfly *Panorpa vulgaris* (Insecta: Mecoptera). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 24, p. 1-12, 2000.

KURTZ, J.; SAUER, K. P. Gender differences in phenoloxidase activity of *Panorpa vulgaris* hemocytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 53-55, 2001.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 1295-1309, 2002.

LING, E.; SHIRAI, K.; KANEKATSU, R.; KIGUCHI, K. Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. **Cell and Tissue Research**, v. 320, p. 535-543, 2005.

LORD, J. C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 89, p. 19-29, 2005.

LUDWIG, S. W.; OETTING, R. D. Susceptibility of natural enemies to infection by *Beauveria bassiana* and impact of insecticides on *Iphesius degenerans* (Acari: Phytoseiidae). **Journal of Agriculture and Urban Entomology**, v. 18, p. 169-178, 2001.

MEDEIROS, R. S.; RAMALHO, F. S.; LEMOS, W. P.; ZANUNCIO, J. C. Age-dependent fecundity and life-fertility tables for *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 124, p. 319-324, 2000.

MENT, D.; GINDIN, G.; ROT, A.; SOROKER, V.; GLAZER, I.; BAREL, S.; SAMISH M. Novel technique for quantifying adhesion of *Metarhizium anisopliae* conidia to the tick cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 3521-3528, 2010.

MOLINA, D. E.; CARBONE, S. S. Toxicity of synthetic and biological insecticides against adults of the Eucalyptus snout-beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 297-305, 2010.

MUSTU, M.; DEMIRCI, F.; KOÇAK E. Mortality effects of *Isaria farinose* (Holm.) and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Sordariomycetes: Hypocreales) on *Aelia rostrata* Boh. (Hemiptera: Pentatomidae). **Türkiye Entomoloji Derneği**, v. 35, p. 559-568, 2011.

ONDIKA, S.; MANIANIA, N. K.; NYAMASYO, G. H. N.; NDERITU, J. H. Virulence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to sweet potato weevil *Cylas puncticollis* and effects on fecundity and egg viability. **Annals of Applied Biology**, v. 153, p. 41-48, 2008.

PEREIRA, A.; CASALS P.; SALAZAR, A. M.; GERDING, M. Virulence and pre-lethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* on *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 74, p. 554-559, 2011.

RIBEIRO, C.; BREHÉLIN, M. Insect haemocytes: What type of cell is that? **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 417-429, 2006.

ROLFF, J. Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Libellulidae) from a wild population. **Canadian Journal of Zoology**, v. 79, p. 2176-2180, 2001.

ROLFF, J. Bateman's principle and immunity. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 269, p. 867-872, 2002.

ROY, H. E.; COTTRELL, T. E. Forgotten natural enemies: Interactions between coccinellids and insect-parasitic fungi. **European Journal of Entomology**, v. 105, p. 391-398, 2008.

SANTI, L.; BEYS SILVA, W. O.; BERGER, M.; GUIMARES, J. A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, p. 874-880, 2010.

SCHOLTE, E.; KNOLS, B. G. J.; TAKKEN, W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 91, p. 43-49, 2006.

SIVA-JOTHY, M. T.; MORET, Y.; ROLFF, J. Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. **Advances in Insect Physiology**, v. 32, p. 1-48, 2005.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MOSCARDI, F. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 115-120, 1998.

STRAND, M. R. The insect cellular immune response. **Insect Science**, v. 15, p. 1-14. 2008.

STOEHR, A. M.; KOKKO, H. Sexual dimorphism in immunocompetence: what does life-history theory predict? **Behavioral Ecology**, v. 17, p. 751-756, 2006.

TAVARES, W. S.; COSTA, M. A.; CRUZ, I.; SILVEIRA, R. D.; SERRÃO J. E.; ZANUNCIO, J. C. Selective effects of natural and synthetic insecticides on mortality of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its predator *Eriopis connexa*

(Coleoptera: Coccinellidae). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 45, p. 1-5, 2010.

TEDER, T.; TAMMARU, T. Sexual size dimorphism within species increases with body size in insects. **Oikos**, v. 108, p. 321-334, 2005.

TIPPING, P. W.; HOLKO, C. A.; ABDUL-BACK, A. A.; ADRICH, J. R. Evaluating *Edovum puttleri* and *Podisus maculiventris* (Say) for augmentative biological control of Colorado potato beetle in tomatoes. **Biological Control**, v. 16, p. 35-42, 1999.

THOMAS, D. B. **Taxonomic synopsis of the Asopinae Pentatomidae (Heteroptera) of the Western Hemisphere**. Lanham: Entomological Society of America, p. 156, 1992.

VEY, A.; MATHA, V.; DUMAS, C. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, p. 177-187, 2002.

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, p. 475-483, 1997.

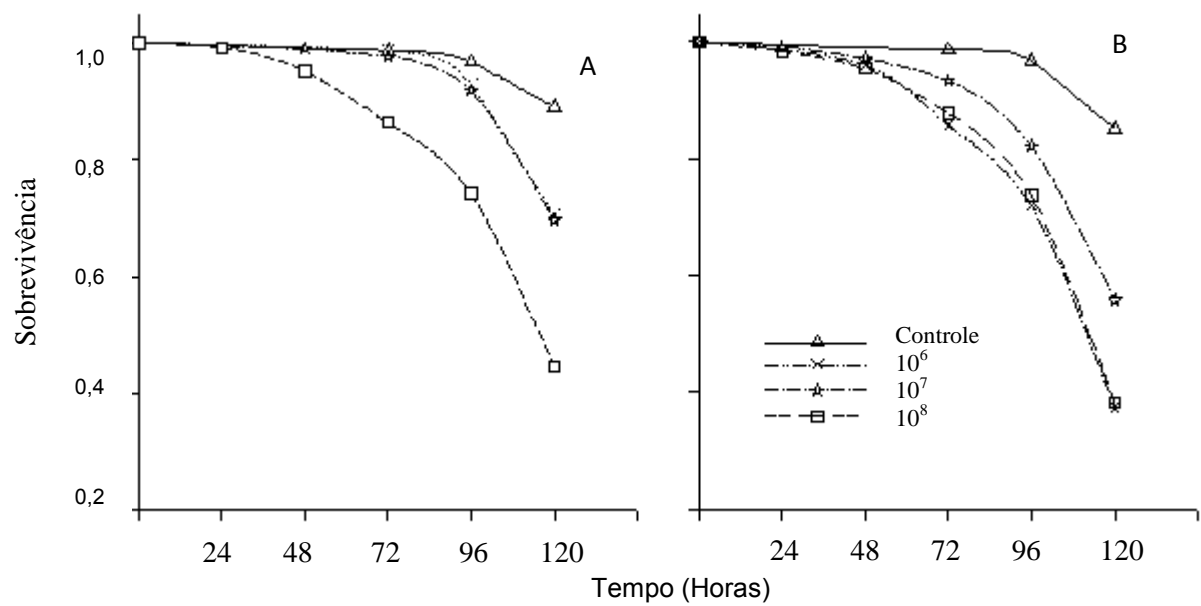
VILCINSKAS, A. Evolutionary plasticity of insect immunity. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, p. 123-129, 2013.

YAMASHITA, M.; IWABUCHI, K. *Bombyx mori* prohemocytes division and differentiation in individual microcultures. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 325-331, 2001.

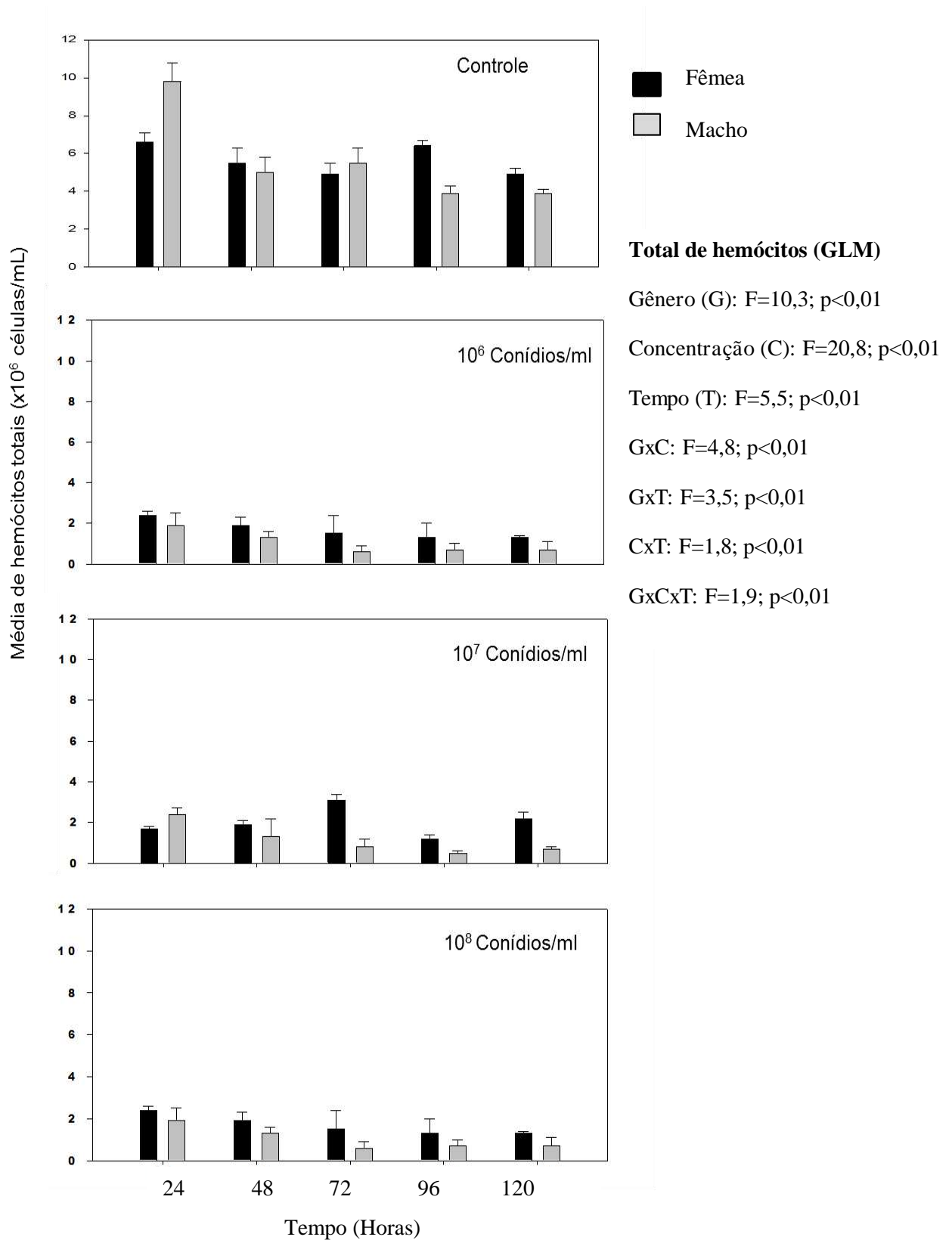
ZANUNCIO, J. C.; ALVES, J. B.; ZANUNCIO, T. V.; GARCIA, J. F. Hemipterous predators of eucalypt desfoliators caterpillars. **Forest Ecology and Management**, v. 65, p. 65-73. 1994.

ZUK, M.; MCKEAN, K. A. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. **International Journal for Parasitology**, v. 26, p. 1009-1024, 1996.

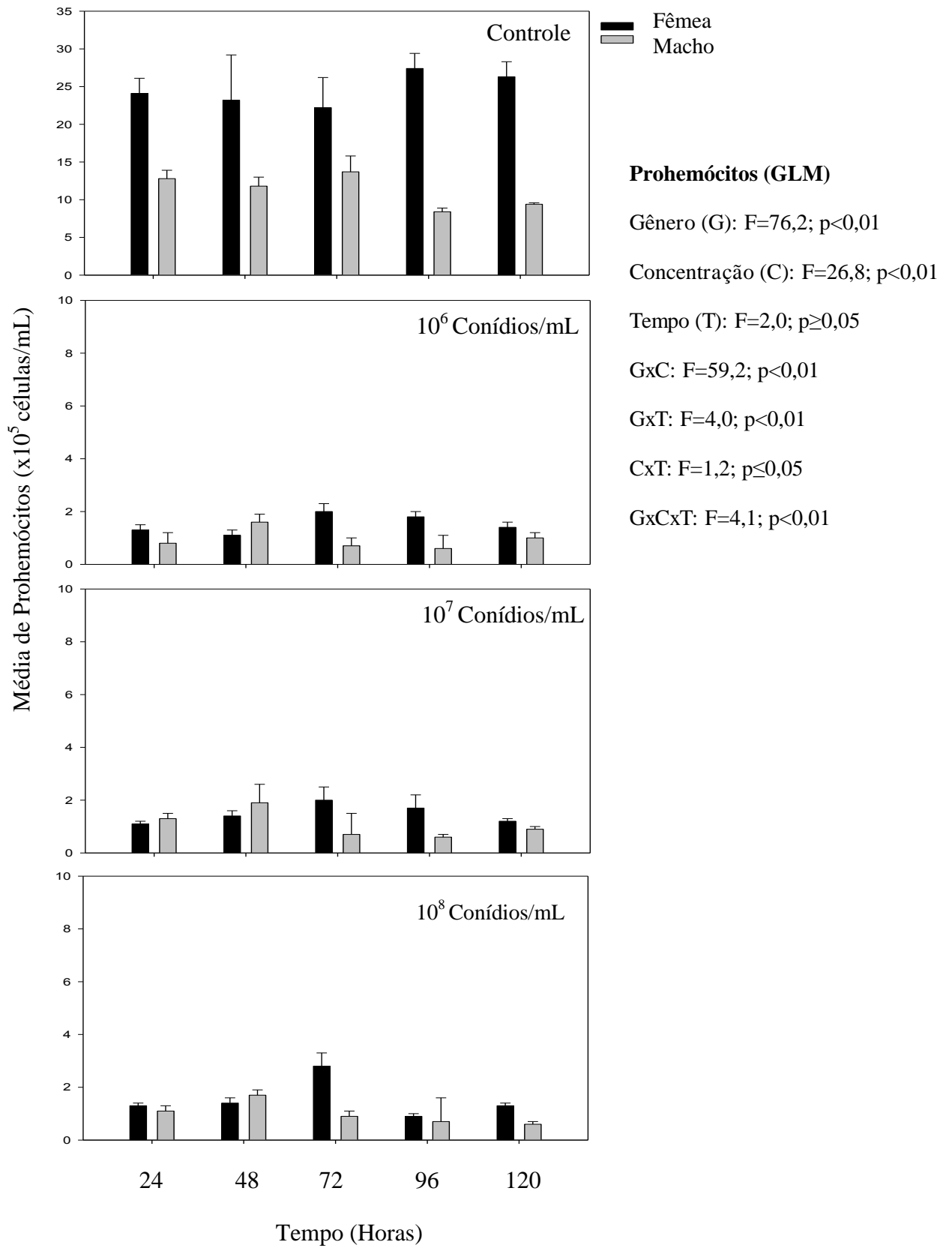
ZUK, M.; STOEHR, A. M. Immune defense and host life history. **American Naturalist**, v. 160, p. 9-22, 2002.



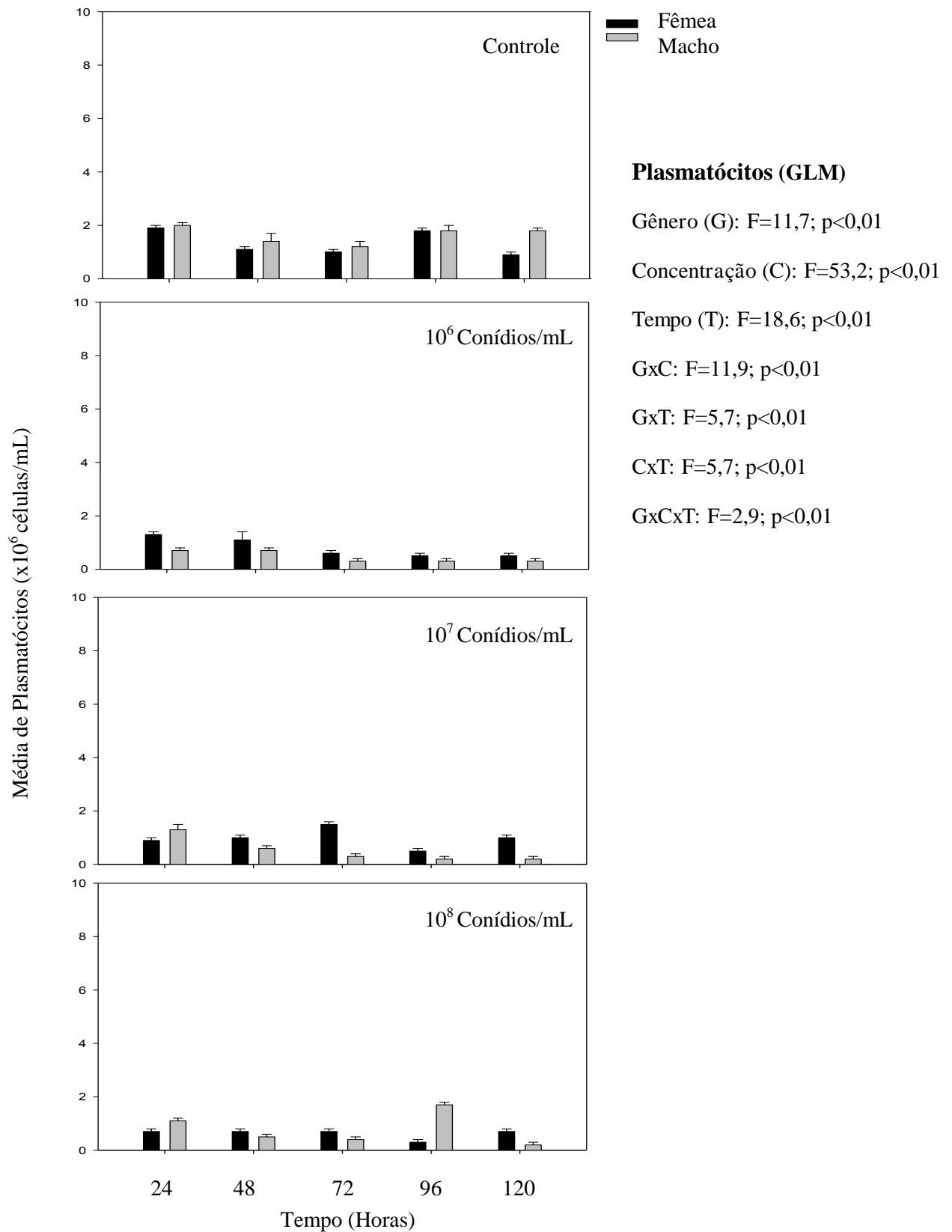
**Figura 1.** Sobrevivência de fêmeas (A) e de machos (B) de *Podisus distinctus* (Heteroptera: Pentatomidae) tratados topicamente com *Metarhizium anisopliae* nas concentrações de  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL.



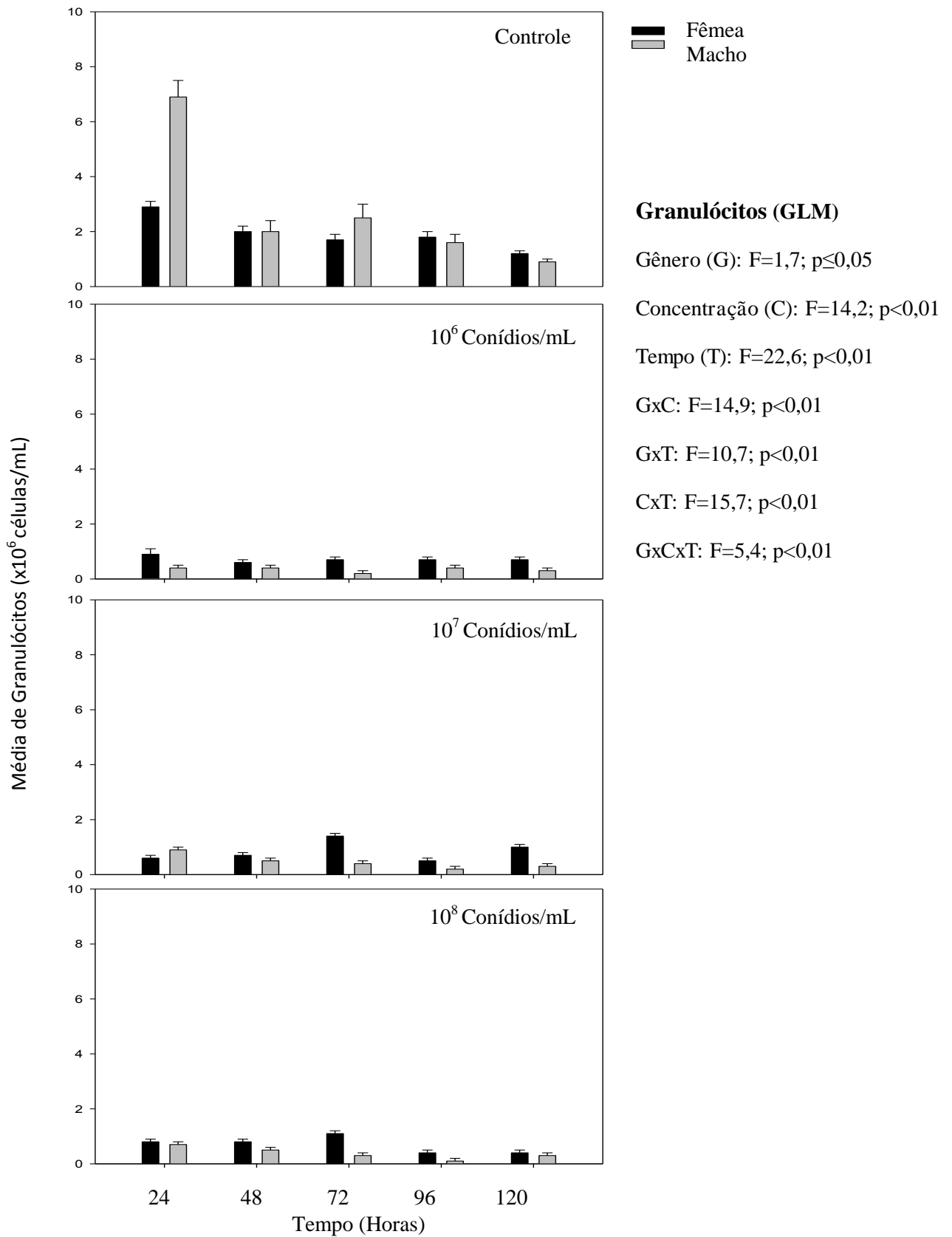
**Figura 2.** Número total de hemócitos (células x 10<sup>6</sup>/mL) em fêmeas e machos de *Podisus distinctus* (Heteroptera: Pentatomidae) após exposição a *Metarhizium anisopliae*.



**Figura 3.** Número de prohemócitos (células  $\times 10^5$ /mL  $\pm$  SE) em fêmeas e machos de *Podisus distinctus* após exposição a *Metarhizium anisopliae*.



**Figura 4.** Número de plasmatócitos (células x 10<sup>6</sup>/mL ± SE) em fêmeas e machos de *Podisus distinctus* (Heteroptera: Pentatomidae) após exposição a *Metarhizium anisopliae*.



**Figura 5.** Número granulócitos (células x 10<sup>6</sup>/mL ± SE) em fêmeas e machos de *Podisus distinctus* após exposição a *Metarhizium anisopliae*.

## CAPÍTULO 3

### **PREDADOR VERSUS ENTOMOPATÓGENO: DEFESA IMUNE CELULAR DE *Podisus distinctus* (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) CONTRA *Beauveria bassiana***

## **Predador versus Entomopatógeno: defesa imune celular de *Podisus distinctus* (Heteroptera: Pentatomidae) contra *Beauveria bassiana***

### **Resumo**

A subfamília Asopinae possui espécies importantes de percevejos predadores, como *Podisus distinctus* (Hemiptera: Pentatomidae), o qual tem sido estudado para o controle biológico de desfolhadores. Fungos entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana*, representam uma alternativa para o controle de insetos herbívoros, mas é necessário se estudar o impacto desse patógeno na resposta imune celular de percevejos predadores. A sobrevivência e a dinâmica hemocitária de machos e fêmeas de *P. distinctus* foram estudadas após exposição ao fungo *B. bassiana*. Adultos, desse predador, com até 48h de idade foram tratados topicamente com a deposição de um  $\mu\text{l}$  das suspensões do fungo nas concentrações de  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/mL e o controle recebeu um  $\mu\text{l}$  água destilada e espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%. A sobrevivência e o número de hemócitos de machos e fêmeas de *P. distinctus* foram avaliados após 24, 48, 72, 96 e 120 horas após aplicação do fungo. A sobrevivência de fêmeas e machos desse percevejo predador foi menor com  $10^8$  conídios/mL de *B. bassiana*. Machos e fêmeas de *P. distinctus*, após o contato com *B. bassiana*, apresentaram menor número de hemócitos. No entanto, a resposta imune celular não foi suficiente para evitar a mortalidade de machos e fêmeas desse predador na concentração de  $10^8$  conídios/mL de *B. bassiana*.

**Palavras chave:** Defesa imune, hemócitos, percevejo predador

## 1. INTRODUÇÃO

Insetos vivem em ambientes onde estão expostos a invasores potenciais como patógenos, parasitas e parasitoides, embora possam colonizar a maioria dos nichos. Esse sucesso tem sido atribuído à capacidade desses organismos em neutralizar as invasões de patógenos (ALBERT et al., 2011; VILCINSKAS, 2013).

O sistema imunológico, contando com os componentes humoral e celular, de insetos pode suportar os desafios da maioria dos microrganismos nos diferentes habitats em que vivem (LAVINE & STRAND, 2002; STANLEY & MILLER, 2006; FALABELLA et al., 2012).

Hemócitos circulantes são elementos importantes do mecanismo de defesa imunológica dos insetos contra microrganismos. Essas células atuam em processos como a fagocitose, formação de nódulos e encapsulamento para aprisionar e eliminar organismos invasores (SCHMID-HEMPEL, 2005; ALBERT et al., 2011; AZZAMI et al., 2012).

Fungos entomopatogênicos estão associados a diversos habitats, incluindo água, superfícies de solo e ambientes aéreos (HAJEK & LEGER, 1994; MEYLING & EILENBERG, 2007). *Beauveria bassiana* (Vuillemin), utilizado em programas de controle biológico (SHAH & PELL, 2003; DUBOVSKIY, et al., 2013), pode produzir conídios infecciosos. Esses conídios penetram na cutícula do inseto, o que indica que *B. bassiana* tenha um mecanismo apropriado para superar a primeira linha de defesa do inseto, a cutícula, e superar o sistema de defesa celular do inseto (ABOOD et al., 2010).

Percevejos predadores são, também, utilizados em programas de controle biológico e considerados inimigos naturais importantes de insetos-praga (MEDEIROS et al., 2000). *Podisus* é o gênero mais importante de percevejos predadores no Brasil, destacando-se *Podisus distinctus* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) (THOMAS, 1992; ZANUNCIO et al., 1994).

A interação entre entomopatógenos e reação imunológica deve ser estudada, por demonstrar a capacidade de um superar o outro e estudos hematológicos representam um importante campo de fisiologia de insetos (NAHLA et al., 2010; VEGA, et al., 2012).

O objetivo do trabalho foi avaliar o impacto do *Beauveria bassiana* na sobrevivência e dinâmica hemocitária de *Podisus distinctus*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico de Insetos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### **Criação dos insetos**

Adultos do percevejo predador *Podisus distinctus* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) foram colocados em gaiolas teladas de 60 x 40 x 40 cm e alimentados com pupas da presa alternativa *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1785) (Coleoptera: Tenebrionidae) com água disponibilizada em algodão umedecido. As posturas depositadas nas gaiolas foram coletadas com algodão e transferidas para placas de Petri (9,0 x 1,5 cm) com algodão umedecido. Após a eclosão, as ninfas desse predador foram mantidas em placas e alimentadas com pupas de *T. molitor* até a fase adulta.

### **Obtenção das suspensões**

O produto utilizado foi Boveril<sup>®</sup> WP (*Beauveria bassiana*, isolado ESALQ PL 63). A suspensão do formulado Boveril<sup>®</sup> foi preparada com água destilada e espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%. As concentrações utilizadas no experimento foram  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/ mL (IHARA et al., 2008, MUSTU et al., 2011).

### **Tratamento tópico em predador**

Adultos com até 48h de idade de *P. distinctus* foram tratados topicamente com a deposição de um  $\mu$ L das suspensões (FRANÇA et al., 2006) do fungo nas concentrações de  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/mL e o controle recebeu um  $\mu$ L água destilada e espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%. A aplicação foi feita no dorso dos insetos com o auxílio de um micropipetador.

### **Sobrevivência de *Podisus distinctus* (Heteroptera: Pentatomidae) expostos a *Beauveria bassiana***

Adultos de *P. distinctus* foram separados em grupos de cinco por placa de Petri (9,0 x 1,2 cm) e contaminadas via aplicação tópica. Machos com peso entre 55 e 60 mg e fêmeas com peso entre 75 e 80 mg foram utilizados no experimento. A sobrevivência de *P. distinctus* foi avaliada após 24, 48, 72, 96 e 120 horas da exposição ao fungo *B. bassiana* (MOLINA & CARBONE, 2010). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, cada uma com cinco adultos (cinco machos e cinco fêmeas) por concentração.

As curvas de sobrevivência de fêmeas e machos de *P. distinctus* foram geradas pelo método Kaplan-Meier e posteriormente comparadas pelo teste Log-Rank a 5% de probabilidade.

### **Coleta da hemolinfa e contagem dos hemócitos**

Amostras de 2  $\mu$ L de hemolinfa de *Podisus distinctus* foram coletada com micropipeta dos percevejos predadores adultos expostos ao fungo entomopatogênico nas concentrações ( $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL) e o controle que recebeu um  $\mu$ l água destilada e espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%. A hemolinfa desse predador foi acondicionado em tubos eppendorf com 20  $\mu$ L de solução anticoagulante e 4  $\mu$ L de corante Giemsa. As amostras foram transferidas para Câmara de Neubauer, onde sob microscópio (aumento de 400 X) foi realizada a identificação e contagem diferencial e total dos hemócitos (RIBEIRO & BREHÉLIN, 2006).

### **Dinâmica hemocitária**

A coleta de hemolinfa de *P. distinctus* para contagem das células do percevejo predador foi realizada 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a aplicação do fungo.

Dez machos e dez fêmeas de *Podisus distinctus* foram utilizados por intervalo de avaliação e concentração da solução entomopatogênica. Modelos Lineares Gerais (GLM) foram gerados para testar os efeitos específicos do gênero, da concentração de conídios e do tempo decorrido desde a exposição de conídios no número de hemócitos do percevejo predador. Os modelos testaram a contribuição independente de cada uma das variáveis no número de hemócitos, bem como as interações potenciais entre as mesmas.

### 3. RESULTADOS

A porcentagem de sobrevivência de fêmeas ( $\chi^2=21,3$ ;  $p < 0,001$ ) e de machos ( $\chi^2=21,2$ ;  $p < 0,001$ ), de *P. distinctus* foi menor, após exposição a *B. bassiana* na concentração de  $10^8$  conídios/mL sem diferença entre sexos ( $\chi^2=0,02$ ;  $p < 0,88$ ). As demais concentrações apresentaram valores semelhantes a do controle (Fig. 1).

Os números de hemócitos totais foi maior em machos de *P. distinctus* que suas fêmeas após a exposição ao fungo ( $F=4,3$ ;  $p < 0,05$ ). O número de hemócitos em insetos expostos as concentrações  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL de *B. bassiana* foi menor que no controle ( $F=32,7$ ;  $p < 0,01$ ). O menor número de hemócitos foi observado 24 horas após a exposição a *B. bassiana* em percevejos concentração de  $10^8$  conídios/mL ( $F=30,9$ ;  $p < 0,01$ ) (Fig. 2).

Machos de *P. distinctus* apresentaram menor número de prohemócitos que suas fêmeas ( $F= 12,2$ ;  $p < 0,01$ ) exceto nas concentrações de  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL após 48 e 72 horas em que machos apresentam maior número de prohemócitos que fêmeas ( $F=29,6$ ;  $p < 0,01$ ) A exposição desse predador às concentrações de conídios/mL de *B. bassiana* reduziu o número dessas células comparado ao controle e com os menores valores para percevejos expostos à solução com  $10^8$  conídios/mL ( $F=29,6$ ;  $p < 0,01$ ). Os menores números de prohemócitos foram observados após 24 horas da exposição ao fungo *B. bassiana* ( $F=30,6$ ;  $p < 0,01$ ) (Fig. 3).

O número de plasmatócitos em fêmeas foi menor que o de machos de *P. distinctus* ( $F=10,0$ ;  $p < 0,01$ ), principalmente quando expostos as concentrações de  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL ( $F=13,0$ ;  $p < 0,01$ ) (Fig. 4).

O número de granulócitos de machos foi maior que o de fêmeas de *P. distinctus* ( $F=15,7$ ;  $p < 0,01$ ). Insetos expostos às concentrações de  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL apresentaram menor número de granulócitos que os do controle ( $F=25,1$ ;  $p < 0,01$ ). O número de granulócitos foi menor após 24 horas do início das avaliações e após este período. Após esse período os números de granulócitos circulantes aumentam em percevejos expostos ao fungo ( $F= 40,4$ ;  $p < 0,01$ ) (Fig. 5).

#### 4. DISCUSSÃO

A sobrevivência semelhante de machos e fêmeas de *P. distinctus* no controle e nas concentrações de  $10^6$  e  $10^7$  conídios/mL até o quinto dia, reforça o fato do fungo *B. bassiana* causar baixa mortalidade a pentatomídeos como relatado para *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae), *Piezodorus guildinii* (Westw.) (Hemiptera: Pentatomidae) e *Euchistus heros* (F) (Hemiptera: Pentatomidae) (SOSA-GÓMEZ & MOSCARDI 1998).

No entanto, a menor sobrevivência de machos e de fêmeas após exposição ao fungo *B. bassiana* na concentração de  $10^8$  conídios/mL corrobora com a maior virulência desse patógeno nessa concentração para *Aelia rostrata* (Heteroptera: Pentatomidae), *Perillus bioculatus* (Heteroptera: Pentatomidae) e *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) (TODOROVA et al., 2002; MUŞTU et al., 2011; GANDARILLA-PACHECO et al., 2013). O predador *Perillus bioculatus* (Heteroptera: Pentatomidae) apresentou mortalidade dependente da concentração de conídios/mL seis isolados do fungo *Beauveria bassiana* (TODOROVA et al., 2002).

A maior mortalidade de *P. distinctus* com o aumento da concentração de conídios/mL de *B. bassiana* pode ser explicada pelo processo de infecção do fungo ocorrer através da adesão dos conídios na cutícula do hospedeiro e, por isto, quanto maior o número de conídios maiores as chances de aderirem à cutícula da espécie hospedeira e maiores as probabilidades do processo patogênico levar o hospedeiro a morte (KIRKLAND et al., 2004; MENT et al., 2010).

A resposta imune celular em *P. distinctus*, após o contato com *B. bassiana* foi demonstrada pela redução do número de hemócitos como indicador da dinâmica hemocitária ativa em machos e fêmeas desse predador ao fungo. Isto é semelhante a atividade imune celular ativa relatada para *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) contra o fungo *B. bassiana* (AJAMHASSANI et al., 2013).

O menor número de hemócitos totais em *P. distinctus* nas concentrações de  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL é semelhante à redução acentuada de hemócitos totais em *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) de forma dose-dependente após exposição ao fungo entomopatogênico *Tolypocladium cylindrosporum* (BANDANI, 2005). Essa redução do número de hemócitos circulantes deve-se a formação de nódulos induzidos por metabolitos fúngicos solúveis (GILLESPIE et al., 2000; VEY et al., 2002).

A redução do número de prohemócitos de *P. distinctus* após 96 horas da exposição ao fungo *B. bassiana* deve-se ao fato de prohemócitos serem células-tronco responsáveis pela formação de plasmatócitos e granulócitos, por isto a redução de número de prohemócitos deve-se ao direcionamento dessas células para o foco infeccioso (YAMASHITA & IWABUCHI, 2001; LING et al., 2005).

Os menores números de plasmatócitos em *P. distinctus* nas concentrações de  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL de *B. bassiana* deve-se as reações imune celulares. Plasmatócitos e granulócitos são os principais agentes de fagocitose e nodulação como demonstrado por reações imunológicas em *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) contra *B. bassiana* (AJAMHASSANI et al., 2013), com aumento expressivo, do número de hemócitos, no início da infecção e redução a medida que o organismo invasor é detectado por essas. O aumento do número de plasmatócitos e granulócitos após 96 horas e a redução após 120 horas da infecção em machos de *P. distinctus* está relacionada à continuidade da atividade imune celular contra o fungo entomopatogênico, devido ao direcionamento dessas células para os processos de fagocitose e nodulação (VILCINSKAS et al., 1997; GILLESPIE et al., 2000; TOJO et al., 2000; VEY et al., 2002).

Machos de *P. distinctus* expostos ao fungo *B. bassiana* nas maiores concentrações de conídios/mL apresentaram maior número de hemócitos e sobrevivência semelhante a fêmeas. Isto demonstra que machos desse percevejo predador necessitam de maior investimento na produção de hemócitos para apresentarem sobrevivência semelhante a suas fêmeas. No entanto, a sobrevivência semelhante e diferenças na dinâmica hemocitária de machos e fêmeas do *P. distinctus*, expostos ao fungo *B. bassiana*, não corroboram com a teoria que fêmeas investem mais em defesas imunitárias (STOEHR & KOKKO, 2006) provando que machos e fêmeas investem em defesa imunológica contra organismos invasores (VAN BOVEN & WEISSING, 2004).

A redução do número de hemócitos de machos e fêmeas de *P. distinctus* após exposição ao fungo *B. bassiana* indica resposta imune celular ativa desse predador a esse fungo. No entanto, essa resposta imune celular após a exposição a  $10^8$  conídios/mL de *B. bassiana* não foi suficiente para manter a sobrevivência de machos e fêmeas de *P. distinctus*.

## **Agradecimentos**

Ao “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)”, a “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)”.

## 5. REFERENCIAS

ABOOD F.; BAJWA G. A.; IBRAHIM Y. B.; SAJAP, A. S. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* against the Tiger Moth, *Atteva scoidoxa* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Journal of Entomology**, v. 7, p. 19-32, 2010.

AJAMHASSANI, M.; SENDI, J. J.; ZIBAEE, A.; ASKARY, H.; FARSI, M. J. Immunological responses of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) to entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Bals.-Cry) and *Isaria farinosae* (Holmsk.) FR. **Journal of Plant Protection Research**, v. 53, p. 110-118, 2013.

ALBERT, S.; GÄTSCHENBERGER, H.; AZZAMI, K.; GIMPLE, O.; GRIMMER, G.; SUMNER, S.; FUJIYUKI, T.; TAUTZ, J.; MUELLER, M. J. Evidence of a novel immune responsive protein in the Hymenoptera. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 968-981, 2011.

AZZAMI, K.; RITTER, W.; TAUTZ, J.; BEIER, H. Infection of honey bees with acute bee paralysis virus does not trigger humoral or cellular immune responses. **Archives of Virology**, v.157, p.689-702, 2012.

BANDANI, A. Effects of *Tolypocladium cylindrosporum* and its secondary metabolites, efrapeptins, on the immune system of *Galleria mellonella* larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v. 15, p. 67-79, 2005.

DUBOVSKIY, I. M.; WHITTEN, M. M.; YAROSLAVTSEVA, O. N.; GREIG, C.; KRYUKOV, V. Y.; GRIZANOVA, E. V.; MUKHERJEE, K.; VILCINSKAS, A.; GLUPOV, V. V.; BUTT, T. M. Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? **Plos One**, v. 8, p. e60248, 2013.

FALABELLA, P.; RIVIELLO, L.; PASCALE, M.; DI LELIO, I.; TETTAMANTI, G.; GRIMALDI, A.; IANNONE, C.; MONTI, M.; PUCCI, P.; TAMBURRO, A. M. Functional amyloids in insect immune response. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p. 203-211, 2012.

GANDARILLA-PACHECO, F. L.; GALÁN-WONG, L. J.; LÓPEZ-ARROYO, J. I.; RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; QUINTERO-ZAPATA, I. Optimization of pathogenicity tests for selection of native isolates of entomopathogenic fungi isolated from citrus growing areas of México on adults of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Florida Entomologist**, v. 96, p. 187-195, 2013.

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, p.429-437, 2000.

HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 293-322, 1994.

IHARA, F.; TOYAMA, M.; MISHIRO, K.; YAGINUMA, K. Laboratory studies on the infection of stink bugs with *Metarhizium anisopliae* strain FRM515. **Applied Entomology and Zoology**, v. 43, p. 503-509, 2008.

KIRKLAND, B. H.; WESTWOOD, G. S.; KEYHANI, N. O. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 705-711, 2004.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 1295-1309, 2002.

LING E.; SHIRAI K.; KANEKATSU R.; KIGUCHI K. Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. **Cell and Tissue Research**, v. 320, p. 535-543, 2005.

MEDEIROS, R. S.; RAMALHO, F. S.; LEMOS, W. P.; ZANUNCIO, J. C. Age-dependent fecundity and life-fertility tables for *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 124, p. 319-324, 2000.

MENT, D.; GINDIN, G.; ROT, A.; SOROKER, V.; GLAZER, I.; BAREL, S.; SAMISH M., Novel technique for quantifying adhesion of *Metarhizium anisopliae* conidia to the tick cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 3521-3528, 2010.

MEYLING, N.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. **Biological Control**, v. 43, p. 145-155, 2007.

MOLINA, D. E.; CARBONE, S. S. Toxicity of synthetic and biological insecticides against adults of the Eucalyptus snout-beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 297-305, 2010.

MUSTU, M.; DEMIRCI, F.; KOÇAK E. Mortality effects of *Isaria farinose* (Holm.) and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Sordariomycetes: Hypocreales) on *Aelia rostrata* Boh. (Hemiptera: Pentatomidae). **Türkiye Entomoloji Derneği**, v. 35, p. 559-568, 2011.

NAHLA, M.; EL-AZIZ, A. B. D.; AWAD, H. H. Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections. **Micron**, v. 41, p. 203-209, 2010.

RIBEIRO, C.; BREHÉLIN, M. Insect haemocytes: What type of cell is that? **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 417-429, 2006.

SCHMID-HEMPEL, P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 529-551, 2005.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 413-423, 2003.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MOSCARDI, F. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros*

(Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 115-120, 1998.

STANLEY, D. W.; MILLER, J. S. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 119, p. 1-13, 2006.

STOEHR, A. M.; KOKKO, H. Sexual dimorphism in immunocompetence: what does life-history theory predict? **Behavioral Ecology**, v. 17, p. 751-756, 2006.

THOMAS, D. B. **Taxonomic synopsis of the Asopinae Pentatomidae (Heteroptera) of the Western Hemisphere**. Lanham: Entomological Society of America, p. 156, 1992.

TODOROVA, S. I.; CLOUTIER, C.; CÔTÉ, J. C.; CODERRE, D. Pathogenicity of six isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina, Hyphomycetes) to *Perillus bioculatus* (F) (Hem., Pentatomidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 126, p. 182-185, 2002.

TOJO, S.; NAGANUMA, F.; ARAKAWA, K.; YOKOO, S. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Journal of Insect Physiology**, v.46, p. 1129-1135, 2000.

VAN BOVEN, M.; WEISSING, F. J. The evolutionary economics of immunity. **The American Naturalist**, v. 163, p. 277-294, 2004.

VEGA, F. E.; GOETTEL, M. S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M. A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, M.; MONZON, A.; OWNLEY, B. H.; PELL, J. K.; RANGEL, D. E. N.; ROY, H. E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, p. 149-159, 2009.

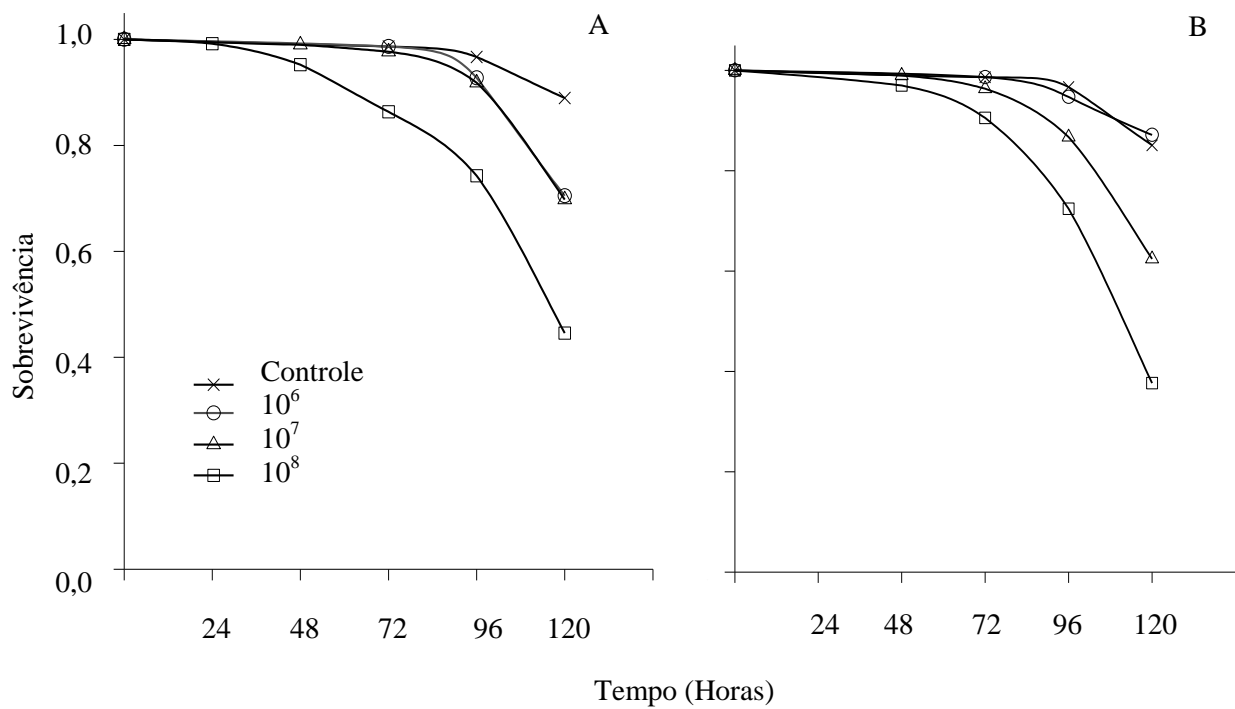
VEY, A.; MATHA, V.; DUMAS, C. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, p. 177-187, 2002.

VILCINSKAS, A. Evolutionary plasticity of insect immunity. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, p. 123-129, 2013.

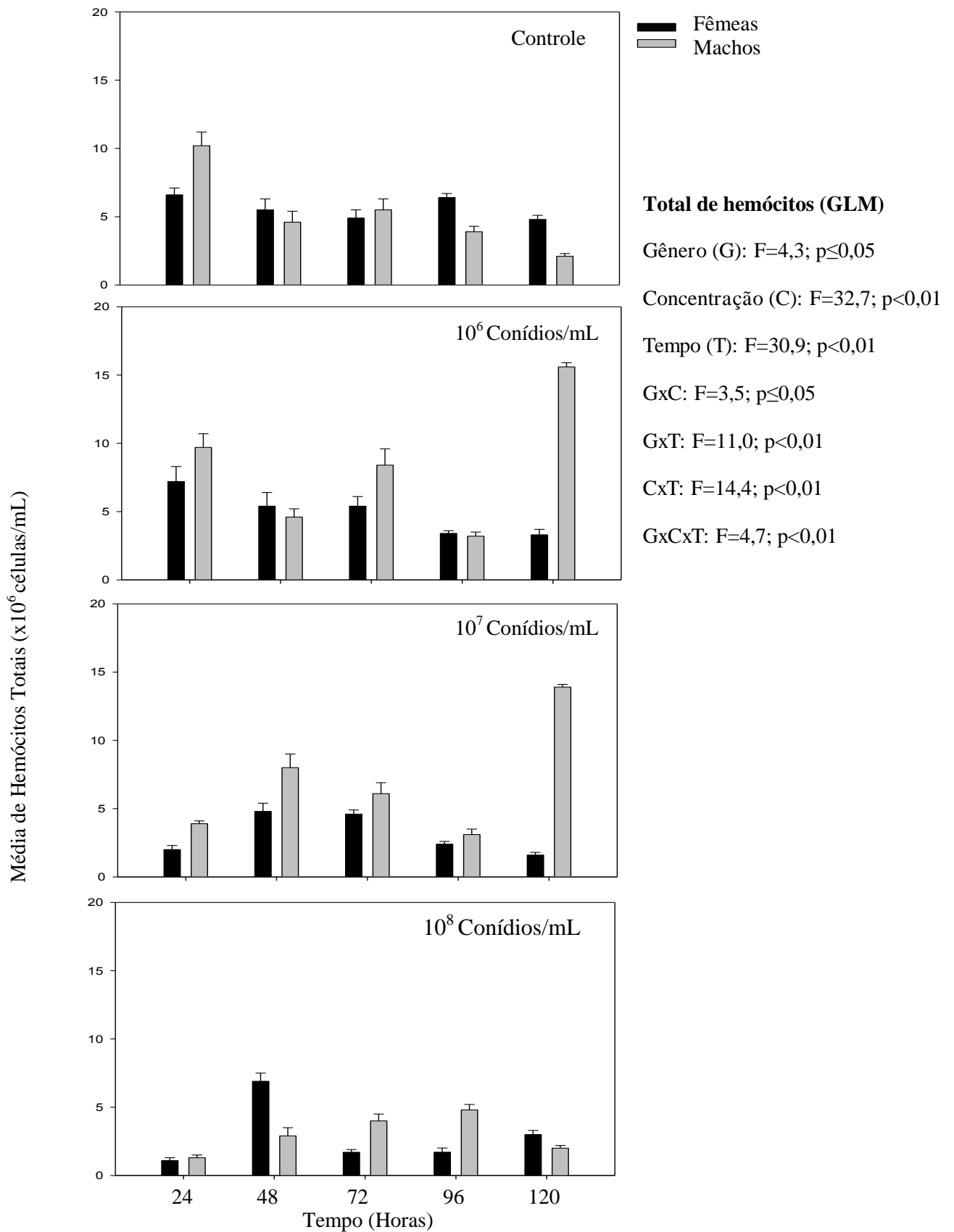
VILCINSKAS, A.; MATHA, V.; GÖTZ, P. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, p. 475-483, 1997.

YAMASHITA, M.; IWABUCHI, K. *Bombyx mori* prohemocytes division and differentiation in individual microcultures. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 325-331, 2001.

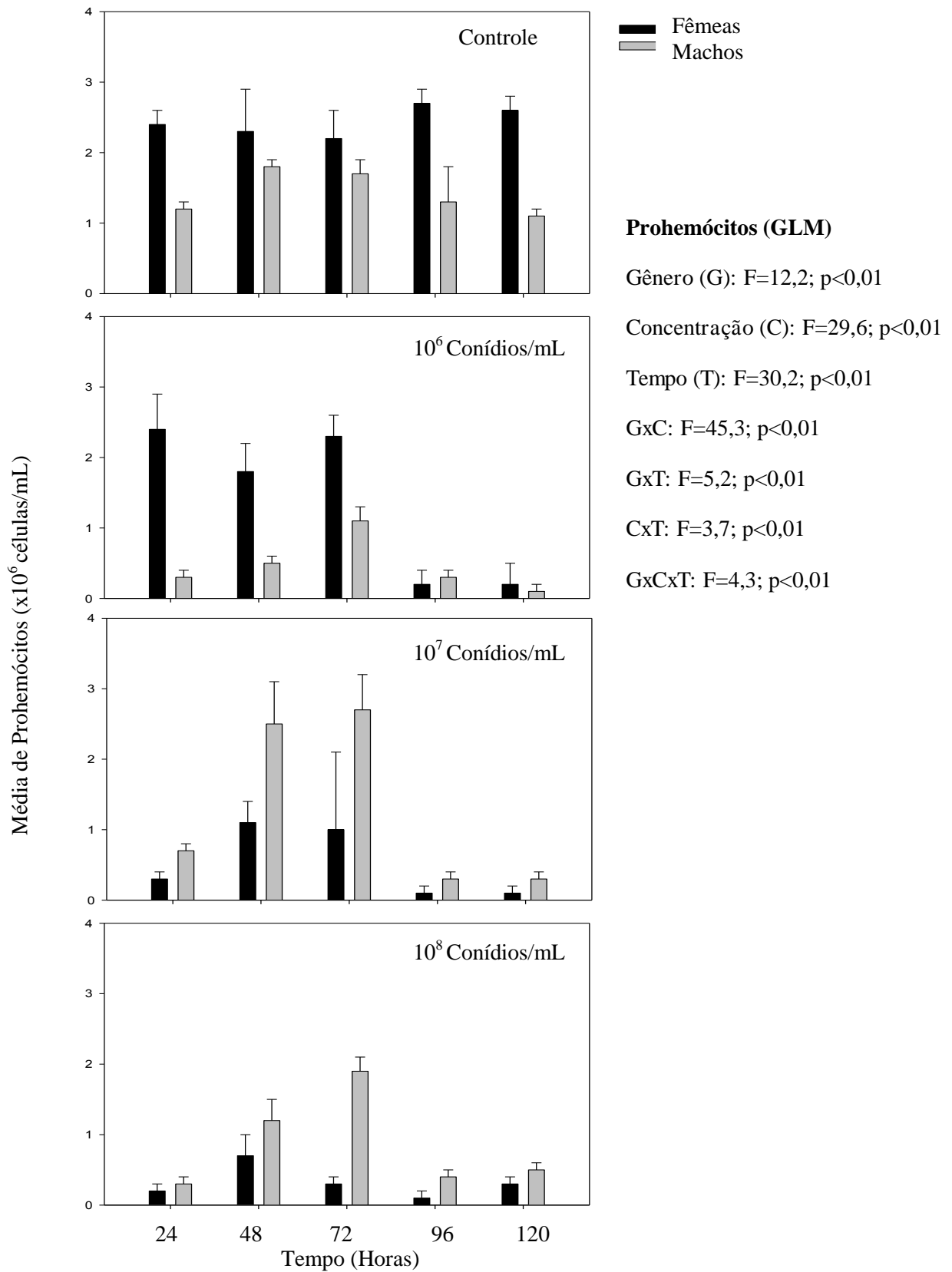
ZANUNCIO, J. C.; ALVES, J. B.; ZANUNCIO, T. V.; GARCIA, J. F. Hemipterous predators of eucalypt defoliators caterpillars. **Forest Ecology and Management**, v. 65, p. 65-73, 1994.



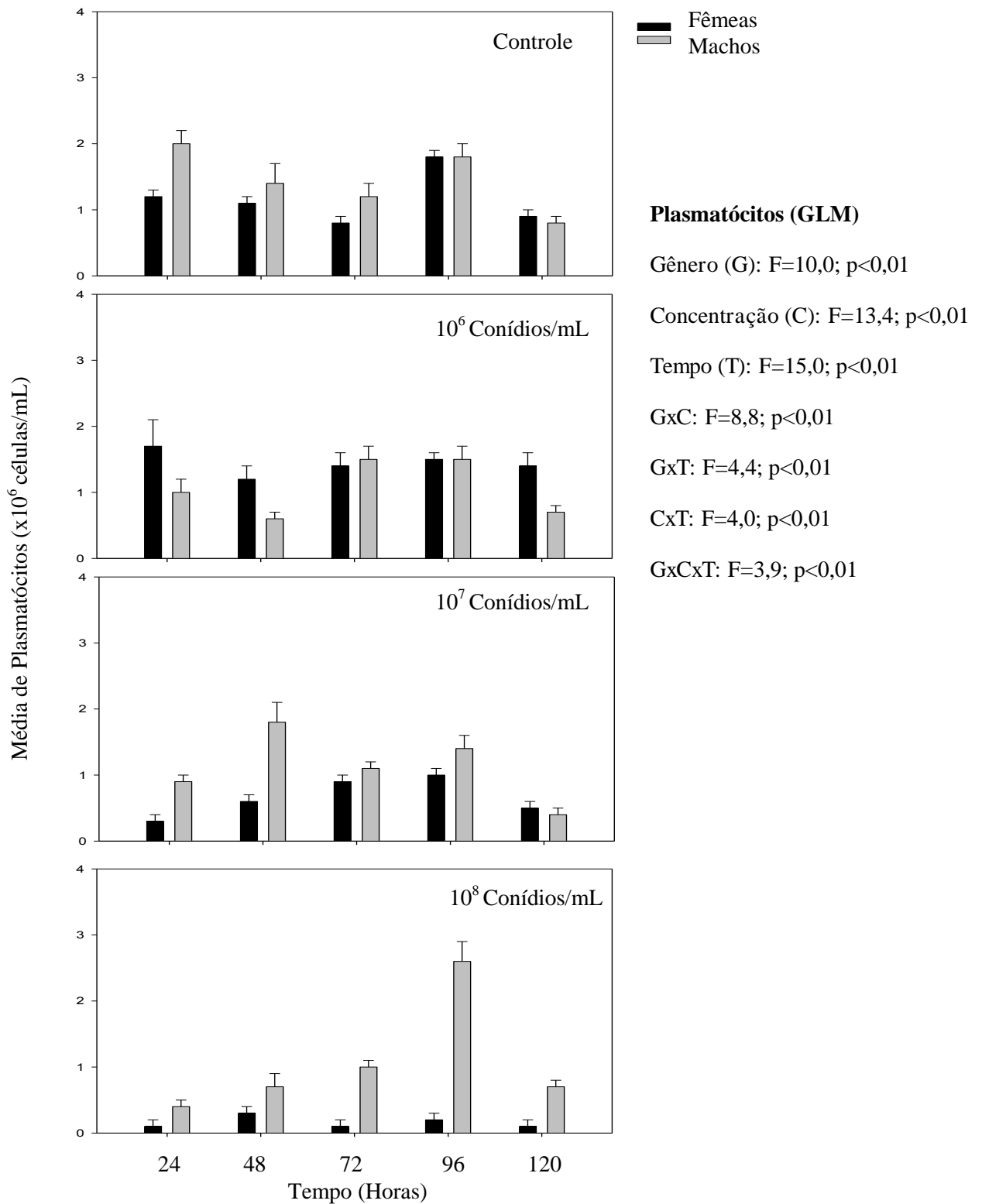
**Figura 1.** Curvas de sobrevivência de fêmeas (A) e machos (B) adultos de *Podisus distinctus* (Heteroptera: Pentatomidae) tratados topicamente com *Beauveria bassiana* nas concentrações de 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> conídios/mL.



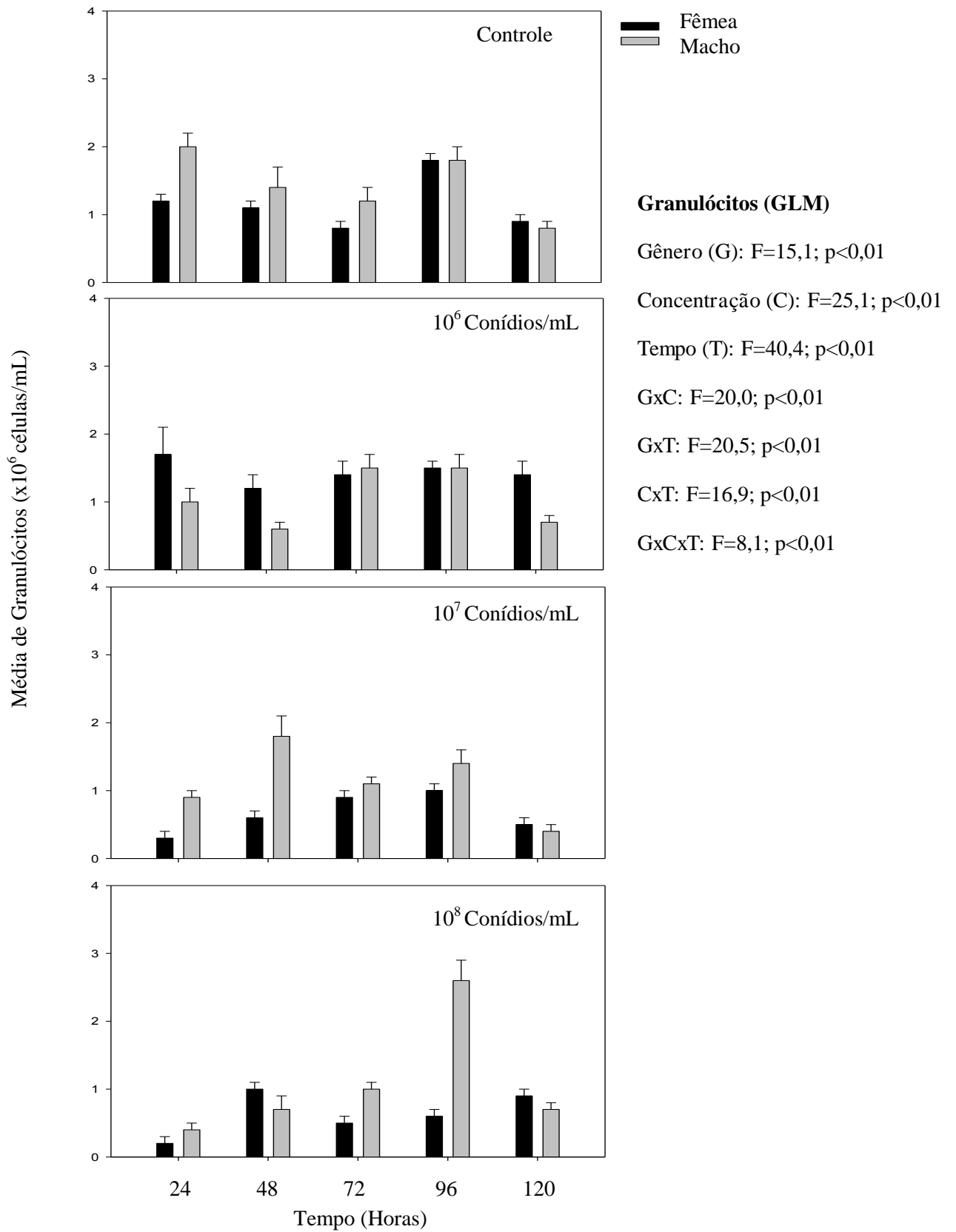
**Figura 2.** Número de hemócitos totais (células  $\times 10^6$ /mL  $\pm$  SE) em fêmeas e machos de *Podisus distinctus* expostos a *Beauveria bassiana*.



**Figura 3.** Número de Prohemócitos (células x 10<sup>6</sup>/mL ± SE) em fêmeas e machos de *Podisus distinctus* expostos a *Beauveria bassiana*.



**Figura 4.** Número de Plasmatócitos (células x 10<sup>6</sup>/mL ± SE) em fêmeas e machos de *Podisus distinctus* expostos a *Beauveria bassiana*.



**Figura 5.** Número de Granulócitos (células x 10<sup>6</sup>/mL ± SE) em machos e fêmeas de *Podisus distinctus* expostos a *Beauveria bassiana*.

## CONCLUSÕES GERAIS

O primeiro capítulo evidenciou menor sobrevivência em ninfas do terceiro instar de *P. distinctus* expostas as soluções fúngicas de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Adultos do predador oriundos de ninfas expostas aos fungos tiveram menor peso. A redução do peso de *P. distinctus* impactou no aumento do período de pré-oviposição, redução do número de posturas, ovos e ninfas.

O segundo capítulo mostrou que machos adultos de *P. distinctus* foram mais susceptíveis que fêmeas expostas às soluções de *M. anisopliae*. Adultos do percevejo predador respondem imunologicamente a presença do fungo. No entanto, a medida que ocorre o aumento da concentração de conídios/mL a resposta imune celular não é suficiente para garantir a sobrevivência *P. distinctus*.

No terceiro capítulo adultos do percevejo predador expostos a *B. bassiana* tiveram menor porcentagem de sobrevivência quando expostos a concentração de  $10^8$  conídios/mL, sem diferença entre machos e fêmeas. O número de hemócitos foi maior em machos do percevejo predador, apesar disso, apresentaram mortalidade semelhante a fêmeas.

Os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* apesar de serem eficazes no controle de insetos praga podem afetar inimigos naturais. Ninfas e adultos do percevejo predador *P. distinctus* foram afetados negativamente quando expostos aos fungos. O impacto negativo dos parâmetros avaliados nesse trabalho reforça a característica de amplo espectro de hospedeiros desses fungos. Isso sugere cuidadoso critério no uso desses fungos em conjunto com o percevejo predador *P. distinctus* quando se deseja manter a eficácia do controle exercido por ambos.