

**DANIELE DE FÁTIMA ALVES VENÂNCIO**

**RESPOSTA IMUNE CELULAR DE *Polybia platycephala* (HYMENOPTERA: VESPIDAE) 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  
2015**

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

T

V448r  
2015  
Venâncio, Daniele de Fátima Alves, 1979-  
Resposta imune celular de *Polybia platycephala*  
(Hymenoptera: Vespidae) desafiado por *Beauveria bassiana* e  
*Metarhizium anisopliae* / Daniele de Fátima Alves Venâncio. –  
Viçosa, MG, 2015.  
ix, 57f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Vespa. 2. *Polybia platycephala*. 3. *Beauveria bassiana*.  
4. *Metarhizium anisopliae*. 5. Hemócitos. 6. Controle biológico.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Animal. Programa de Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 596.798

**DANIELE DE FÁTIMA ALVES VENÂNCIO**

**RESPOSTA IMUNE CELULAR DE *Polybia platycephala* (HYMENOPTERA: VESPIDAE) 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: 26 de fevereiro de 2015

---

Ita de Oliveira e Silva

---

Jackson Victor de Araújo

---

Rosa Angelica Plata Rueda

---

Rosenilson Pinto

---

José Cola Zanuncio  
(Orientador)

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

**Albert Einstein**

## **Dedico**

À minha Mãe, Adelita

Aos meus irmãos, Cristiano e Cátia

Aos meus queridos sobrinhos Lara e Arthur

A todos os meus familiares e amigos.

À minha melhor amiga, Michele Munk.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e iluminar ao longo destes anos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Entomologia pela oportunidade de realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor José Cola Zanuncio, pela orientação e valiosas correções durante a realização do trabalho.

Ao Professor Fábio Prezoto, pelo apoio, incentivo e ensinamentos, imprescindíveis para o meu amadurecimento profissional.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico de Insetos, Francisco, Isabel, José Milton, Júlio, Rafael Guanabens, Rafael Ribeiro, Rosenilson, Toni, pela ajuda durante o experimento, pela amizade e agradável convívio.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Entomologia André, Glenda, Helen, Irina, Paula, Riudo e Talitta pela divertida e saudável convivência, troca de experiências e dificuldades enfrentadas juntos.

As secretárias do Programa de Pós-graduação em Entomologia pela dedicação e presteza.

Ao Humberto e à Michele da Embrapa Gado de Leite pela colaboração nos experimentos do primeiro capítulo.

Aos meus queridos familiares pelo amor, carinho, atenção e esforços, como peças fundamentais para o meu sucesso.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

DANIELE DE FÁTIMA ALVES VENÂNCIO é filha de Milton Antônio Venâncio e Adelita Alves da Costa. Em agosto de 2003, ingressou no curso de graduação em Ciências Biológicas no Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CESJF), graduando-se em julho de 2007.

De fevereiro de 2006 à outubro de 2007 foi bolsista de Iniciação Científica, na Embrapa Gado de Leite, com bolsa do CNPq.

Em março de 2008 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ecologia na Universidade Federal de Juiz de Fora, defendendo a dissertação em abril de 2010.

Em março de 2011, iniciou o Curso de Doutorado em Entomologia no Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se a defesa de tese em fevereiro de 2015.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
INTRODUÇÃO GERAL .....	01
OBJETIVOS .....	04
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	05

### CAPÍTULO 1

#### CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS CELULARES PRESENTES NA HEMOLINFA DE *Polybia platycephala* (HYMENOPTERA: VESPIDAE)

ABSTRACT .....	09
RESUMO .....	10
INTRODUÇÃO .....	11
MATERIAL E MÉTODOS .....	13
RESULTADOS .....	13
DISCUSSÃO .....	14
AGRADECIMENTOS .....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17

### CAPÍTULO 2

#### SOBREVIVÊNCIA E DINÂMICA HEMOCITÁRIA DE *Polybia platycephala* (HYMENOPTERA: VESPIDAE) APÓS INFECÇÃO POR *Metarhizium anisopliae*

ABSTRACT .....	25
RESUMO .....	26
INTRODUÇÃO .....	27
MATERIAL E MÉTODOS .....	28

RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO .....	31
AGRADECIMENTOS.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33

### CAPÍTULO 3

#### SUSCEPTIBILIDADE DE *Polybia platycephala* (HYMENOPTERA: VESPIDAE) AO

#### FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana*

ABSTRACT.....	41
RESUMO .....	42
INTRODUÇÃO .....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS.....	46
DISCUSSÃO .....	47
AGRADECIMENTOS.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
CONCLUSÕES GERAIS .....	57

## RESUMO

VENÂNCIO, Daniele de Fátima Alves, D, Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Resposta imune celular de *Polybia platycephala* (Hymenoptera: Vespidae) desafiado por *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.** Orientador: José Cola Zanuncio. Coorientadores: José Eduardo Serrão, Teresinha Vinha Zanuncio e Fábio Prezoto.

A monocultura reduz o equilíbrio ambiental, o que favorece o surgimento de pragas. O uso de biopesticidas no controle biológico é uma alternativa eficiente, mas pode afetar inimigos naturais, o que tem motivado a busca de métodos seletivos aos organismos alvo. Insetos têm sistema imunológico para combater entomopatógenos, mas a tolerância e a dinâmica do sistema imune em vespas sociais são, ainda, pouco conhecidas. Vespas sociais são predadores importantes no controle biológico e estão em constante contato com organismos entomopatogênicos. O objetivo do trabalho foi caracterizar as células da hemolinfa de fêmeas adultas de *Polybia platycephala* Richards (Hymenoptera: Vespidae) e avaliar o impacto dos fungos *Beauveria bassiana* (isolado ESALQ PL 63) e *Metarhizium anisopliae* (isolado ESALQ E9) na sobrevivência e na resposta hemocitária desta vespa social. A descrição morfológica dos hemócitos foi realizada por meio de microscopia de luz. Alterações na sobrevivência e dinâmica hemocitária de *P. platycephala* foram estudadas em duas categorias: 1) diferentes concentrações de solução fúngica e 2) diferentes intervalos de tempo. Quatro tipos de hemócitos foram identificados durante a descrição da morfologia dessas células: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides. Os hemócitos de *P. platycephala* apresentaram o mesmo padrão morfológico de outras espécies da ordem Hymenoptera. Nas maiores concentrações de *M. anisopliae* no tratamento tópico ( $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  esporos/mL) reduziram a sobrevivência e o número de granulócitos e prohemócitos de *P. platycephala*. O fungo *B. bassiana* foi patogênico em todas as concentrações testadas por contato, diminuindo a sobrevivência e o número de granulócitos de *P. platycephala*. Nos tratamentos por ingestão, *B. bassiana* mostrou-se patogênico com  $1 \times 10^9$  esporos/mL. *Metarhizium anisopliae* (isolado ESALQ E9) não reduziu a sobrevivência das vespas nas concentrações  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  esporos/mL, o que é importante para programas de manejo integrado de pragas. No entanto, o impacto negativo de *B. bassiana* (isolado ESALQ PL 63) em todas as concentrações testadas indica a incompatibilidade deste fungo com *P. platycephala*.

## ABSTRACT

VENÂNCIO, Daniele de Fátima Alves, D, Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Cellular immune response of *Polybia platycephala* (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini) challenged by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*.** Adviser: José Cola Zanuncio. Co-advisers: José Eduardo Serrão, Teresinha Vinha Zanuncio and Fábio Prezoto.

Monoculture reduces the environmental equilibrium, which favors the emergence of pests. The use of biopesticides in biological control is an effective alternative, but can affect natural enemies, which has motivated the search for selective methods to target organisms. Insects have immune system to defend against entomopathogen, but tolerance and the dynamics of the immune system in social wasps are still little known. Social wasps are important predators in biological control and are in constant contact with entomopathogenic organisms. The aim of the study was to identify and characterize the hemolymph cells of adult female *Polybia platycephala* Richards (Hymenoptera: Vespidae) and evaluate the impact of fungi *Beauveria bassiana* (isolated ESALQ PL 63) and *Metarhizium anisopliae* (isolated ESALQ E9) on survival and response hemocyte this social wasp. The morphological description of the hemocytes was performed by light microscopy. The dynamic changes in survival of *P. platycephala* hemocyte were studied in two categories: 1) different concentrations of fungal solution and 2) different time intervals. Four types of hemocytes were identified during the description of the morphology of these cells: prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes and oenocytoids cells. The hemocytes of *P. platycephala* showed the same morphological pattern of other species of Hymenoptera. *M. anisopliae* high concentrations in the topical treatment ( $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  spores/ml) decreased survival and the number of granulocytes and prohemocytes *P. platycephala*. *B. bassiana* is pathogenic at all concentrations by contact, reducing the survival and the granulocyte number of *P. platycephala*. In the treatments if swallowed, *B. bassiana* was shown to be pathogenic to  $1 \times 10^9$  spores/mL. *Metarhizium anisopliae* (isolated ESALQ E9) did not reduce the survival of wasps in low concentrations, which is important for integrated pest management programs. However, the negative impact of *B. bassiana* (isolated ESALQ 63) at all concentrations tested indicates incompatibility this fungus with *P. platycephala*.

## INTRODUÇÃO GERAL

Vespas sociais compreendem mais de 4.500 espécies descritas em 268 gêneros e sete subfamílias (Auko e Silvestre 2013). Esses insetos ocorrem em muitos agroecossistemas (Prezoto e Machado 1999, Auad et al. 2012, De Souza et al. 2012), onde o uso de inseticidas pode limitar a eficiência destes inimigos naturais (Bommarco et al. 2011). Vespas sociais são forrageadores generalistas oportunistas (Prezoto et al. 2006, Figueiredo et al. 2006, Elisei et al. 2010) e fundam colônias em locais com alta diversidade de recursos (presa, abrigo e defesa) (Clouse 2001). Além disso, são abundantes, multiplicam-se e disseminam-se no ambiente (Andrade e Prezoto 2001, Elpino-Campos et al. 2007, De Souza et al. 2012) o que motiva a utilização destes insetos em programas de controle biológico.

A família Vespidae utiliza material vegetal para elaborar os ninhos de maneira independente (Mischocyttarini, Polistini e alguns Ropalidiini) ou por enxameamento (maioria dos Epiponini e Ropalidiini) (Wenzel 1998). Este grupo está distribuído em todo o mundo, mas com maior riqueza nos trópicos (Auko e Silvestre 2013). Vespas sociais do gênero *Polybia* podem ser agentes importantes de controle biológico por predarem herbívoros invertebrados (Prezoto et al. 2005, Picanço et al. 2011, Pereira et al. 2007). *Polybia platycephala* Richards (Hymenoptera: Vespidae) constrói ninhos por fundação enxameante, geralmente em folhas perenes, com vários favos horizontais e cobertos por um envelope protetor (Richards 1978, Somavilla et al 2012). No Brasil, este predador ocorre nos estados de Amazonas, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e encontrado, também em outros países, como Suriname e Peru (Prezoto et al. 2005, Rodríguez et al. 2012).

Insetos predadores exploram relativamente grandes áreas foliares em busca de presas e podem entrar em contato com pesticidas depositados sobre folhas ou diretamente no momento da aplicação (França et al. 2006). A utilização de

microrganismos entomopatogênicos no controle biológico pode minimizar problemas do uso excessivo de produtos químicos (Valicente e Mourao 2008, Pardo-López et al. 2012). O menor impacto ambiental, custos reduzidos, baixo risco no manuseio e uma maior especificidade são vantagens deste método de controle de pragas. No entanto, entomopatógenos podem, também, infectar e causar doenças em hospedeiros não alvo, sendo necessário o desenvolvimento de estudos sobre a seletividade destes biopesticidas.

Os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são utilizados frequentemente no controle biológico (Meyling e Eilenberg 2007). Estes microrganismos infectam insetos praga (Vega et al. 2009) e vetores de doenças humanas (Arruda et al. 2005, Santi et al. 2010, Shapiro-Ilan et al. 2013). O processo de infecção destes fungos começa com a ligação dos esporos na cutícula de hospedeiros e, em resposta aos sinais de superfície, o fungo germina produzindo enzimas que, combinadas com a pressão mecânica, iniciam o processo de penetração nos insetos (Zhang et al. 2012). O potencial inseticida dos patógenos depende da ação dos fatores de virulência sintetizados pelos microrganismos e dos mecanismos dos insetos para reprimir o progresso da infecção (Pascual et al. 2012).

A imunidade dos insetos foi otimizada ao longo de milhões de anos de evolução, resultando na ocupação de praticamente todos os nichos ambientais do mundo (Albert et al. 2011). A cutícula é a primeira linha de defesa dos insetos contra parasitas (Lavine e Strand 2002). Respostas de coagulação e produção de moléculas citotóxicas são ativadas no caso de falhas nesta barreira (Lavine e Strand 2002, Falabella et al. 2012). Os hemócitos, que circulam na hemolinfa realizam fagocitose de pequenos invasores com a interação de receptores de superfície com as moléculas exógenas (Lavine e Strand 2002). Hemócitos adicionais são recrutados quando o número de patógenos é elevado ou quando os parasitas são maiores, podendo levar a encapsulação ou

nodulação do organismo (Schmid-Hempel 2005, Albert et al. 2011).

A função imunológica tem sido estudada, principalmente em insetos solitários das ordens Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera e Mecoptera (Lawniczak et al. 2007). A tolerância e a dinâmica do sistema imune de vespas sociais frente a entomopatógenos é, ainda, pouco conhecida. Dessa forma, o objetivo foi descrever a morfologia dos hemócitos e avaliar o efeito de *M. anisopliae* e *B. bassiana* na sobrevivência e dinâmica hemocitária de *P. platycephala*.

A introdução geral e os capítulos desta tese foram redigidos de acordo com as normas do periódico *Journal of Economic Entomology*.

## **OBJETIVOS**

Caracterizar a morfologia dos tipos de hemócitos presentes na hemolinfa de *Polybia. platycephala* Richards (Hymenoptera: Vespidae).

Avaliar as alterações na sobrevivência e dinâmica hemocitária de fêmeas adultas de *Polybia. platycephala* Richards (Hymenoptera: Vespidae) expostas a *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

## REFERÊNCIAS

- Albert, S., Gätschenberger, H., Azzami, K., Gimble, O., Grimmer, G., Sumner, S., Fujiyuki, T., Tautz, J., and Mueller, M. J. 2011.** Evidence of a novel immune responsive protein in the Hymenoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41: 968-981.
- Andrade, F. R., and Prezoto, F. 2001.** Horários de atividade forrageadora e material coletado por *Polistes ferreri* Saussure, 1853 (Hymenoptera, Vespidae), nas diferentes fases de seu ciclo biológico. *Rev. Bras. Zooc.* 3: 117-128.
- Arruda, W., Lubeck, I., Schrank, A., and Vainstein, M. H. 2005.** Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 37:231-244.
- Auad, A. M., Resende, T. T., Silva, D. M., and Fonseca, M. G. 2012.** Hymenoptera (Insecta: Hymenoptera) associated with silvopastoral systems. *Agroforest Syst.* 85: 113-119.
- Auko, T. H., and Silvestre, R. 2013.** Composição faunística de vespas (Hymenoptera: Vespoidea) na floresta estacional do Parque Nacional da Serra da Bodoquena, Brasil. *Biota Neotrop.* 13: 291-299.
- Bommarco, R., Miranda, F., Bylund, H., and Björkman, C. 2011.** Insecticides suppress natural enemies and increase pest damage in cabbage. *J. Econ. Entomol.* 104: 782-791.
- Clouse, R. 2001.** Some effects of group size on the output of beginning nests of *Mischocyttarus mexicanus* (Hymenoptera: Vespidae). *Florida Entomol.* 84: 418-425.
- De Souza, A. R., Venâncio, D. F. A., Zanuncio, J. C., and Prezoto, F. 2012.** Social wasps (Hymenoptera: Vespidae) nesting in Eucalyptus plantations in Minas Gerais, Brazil. *Florida Entomol.* 95: 1000-1002.
- Elisei, T., Nunes, J. V., Ribeiro-Junior, C., Fernandes-Junior, A. J., and Prezoto, F. 2010.** Uso da vespa social *Polistes versicolor* no controle de desfolhadores de eucalipto. *Pesq. Agropec. Bras.* 45: 958-964.
- Elpino-Campos, A., Del-Claro, K., and Prezoto, F. 2007.** Diversity of social wasps (Hymenoptera: Vespidae) in cerrado fragments of Uberlândia, Minas Gerais state, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 36: 685-692.
- Falabella, P., Riviello, L., Pascale, M., Di Lelio, I., Tettamanti, G., Grimaldi, A., Iannone, C., Monti, M., Pucci, P., and Tamburro, A. M. 2012.** Functional amyloids in insect immune response. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42: 203-211.
- Figueiredo, M. L. C., Martins-Dias, A. M. P., and Cruz, I. 2006.** Relação entre a lagarta-

do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. *Pesq. Agropec. Bras.* 41: 1693-1698.

**França, I. W. B., Marques, E. J., Torres, J. B., and Oliveira, J. V. 2006.** Efeitos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotrop. Entomol.* 35: 349-356.

**Lavine, M. D., and Strand, M. R. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:1295-1309.

**Lawniczak, M. K. N., Barnes, A. I., Linklater, J. R., Boone, J. M., Wigby, S., and Chapman, T. 2007.** Mating and immunity in invertebrates. *Trends Ecol. Evol.* 22: 48-55.

**Meyling, N. V., and Eilenberg, J. 2007.** Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biol Control* 43: 145-155.

**Pardo-López, L., Soberón, M., and Bravo, A. 2012.** *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol. Re.* 33: 1574-6976.

**Pascual, L., Jakubowska, A. K., Blanca, J. M., Cañizares, J., Ferré, J., Gloeckner, G. Vogel, H., and Herrero, S. 2012.** The transcriptome of *Spodoptera exigua* larvae exposed to different types of microbes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42: 557-570.

**Pereira, E. J. G., Picanço, M. C., Bacci, L., Crespo, A. L. B., and Guedes, R. N. C. 2007.** Seasonal mortality factors of the coffee leafminer, *Leucoptera coffeella*. *Bull. Entomol. Res.* 97: 421-432.

**Picanço, M. C., Bacci, L., Queiroz, R. B., Silva, G. A., Miranda, M. M. M., Leite, G. L. D., and Suinaga, F. A. 2011.** Social wasp predators of *Tuta absoluta*. *Sociobiology* 58: 621-633.

**Prezoto, F., and Machado, V. L. L. 1999.** Ação de *Polistes (Aphanilopterus) simillimus* Zikán (Hymenoptera, Vespidae) no controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). *Rev. Bras. Zool.* 16: 841-850.

**Prezoto, F., Lima, M. A. P., and Machado, V. L. L. 2005.** Survey of preys captured and used by *Polybia platycephala* (Richards) (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini). *Neotrop. Entomol.* 34: 849-851.

**Prezoto, F., Santos-Prezoto, H. H., Machado, V. L. L., and Zanuncio, J. C. 2006.** Prey captured and used in *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae) nourishment. *Neotrop. Entomol.* 35: 707-709.

- Richards, O. W. 1978.** The social wasps of the Americas excluding the Vespinae. London, British Museum (Natural History), 580p.
- Rodríguez, F. A., Barros, L. C., Caroline, P., Serrão, J. E., and Zanuncio, J. C. 2012.** Nidification of *Polybia platycephala* and *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae) on plants of *Musa* spp. in Minas Gerais state, Brazil. *Sociobiology* 59: 457-461.
- Santi, L., Beys da Silva, W. O., Berger, M., Guimares, J. A., Schrank, A., and Vainstein, M. H. 2010.** Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon* 55: 874-880.
- Schmid-Hempel, P. 2005.** Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 529-551.
- Shapiro-Ilan, D. I., Gardner W. A., Wells, L., Cottrell, T. E., Behle, R. W., and Wood, B. W. 2013.** Effects of entomopathogenic fungus species, and impact of fertilizers, on biological control of pecan weevil (Coleoptera:Curculionidae). *Environm. Entomol.* 42: 253-261.
- Somavilla, A., Oliveira, M. L. D., and Silveira, O. T. 2012.** Identification guide for nests of social wasps (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae) in reserva Ducke, Manaus, Amazonas, Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* 56: 405-414.
- Valicente, F. H., and Mourao, A. H. C. 2008.** Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. *Neotrop. entomol.* 37: 702-708.
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Koike, M., Maniania, M., Monzo'n, A., Ownley, B. H., Pell, J. K., Rangel, D. E. N., and Roy, H. E. 2009.** Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol.* 2:149-159.
- Wenzel, J. W. 1998.** A generic key to the nests of hornets, yellowjackets, and paper wasps worldwide (Vespidae: Vespinae, Polistinae). *Am. Mu. Novit.* 3224:1-39.
- Zhang, S., Widemann, E., Bernard, G., Lesot, A., Pinot, F., Pedrini, N., and Keyhani, N. O. 2012.** CYP52X1, representing new cytochrome P450 subfamily, displays fatty acid hydroxylase activity and contributes to virulence and growth on insect cuticular substrates in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Biol. Chem.* 287:13477-13486.

## **CAPÍTULO 1**

### **CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS CELULARES PRESENTES NA HEMOLINFA DE *Polybia platycephala* (HYMENOPTERA: VESPIDAE)**

**ABSTRACT.** The hemocytes are cells responsible for recognizing foreign bodies that invade the hemolymph of insects. The morphological characterization of hemocytes is still controversial because of the great variety of forms and functions observed between species. The aim of this study was to describe the morphology of the hemocytes present in the hemolymph of the social wasp *Polybia platycephala* Richards (Hymenoptera: Vespidae). The morphological analysis and the size of the hemocytes was carried out by light microscopy with ImageJ software. The hemolymph of *P. platycephala* presented different morphological types of hemocytes. The prohemocytes are cells with size of  $0.5 \pm 0.10 \mu\text{m}$ , spherical shape and cytoplasm occupying a small area around of a large and central nucleus. Plasmacytes are polymorphic cells of varying sizes, with an average of  $0.5 \pm 0.10 \mu\text{m}$  in spherical shapes and  $0.6 \pm 0.11 \mu\text{m}$  of length per  $0.4 \pm 0.09 \mu\text{m}$  of width in ovals shapes. Granulocytes exhibited size of  $0.7 \pm 0.09 \mu\text{m}$  in spherical shape, with many cytoplasmic granules round central nucleus. The oenocytoids cells were the highest observed cells ( $1.0 \pm 0.11 \mu\text{m}$ ) with spherical shape and cytoplasm with strongly stained punctuations. Four types of hemocytes were identified: prohemocytes, plasmacytes, granulocytes and oenocytoids cells. Prohemocytes in mitosis and with intermediate characteristics between prohemocytes and plasmacytes suggest cell differentiation.

**KEYWORDS:** cell differentiation, hemocytes, morphology, social wasp.

**RESUMO.** Os hemócitos são células responsáveis pelo reconhecimento de corpos estranhos que invadem a hemolinfa dos insetos. A caracterização dos hemócitos é, ainda, controversa em virtude da grande variedade de formas e funções observada entre as espécies. Assim, o objetivo do presente estudo foi descrever a morfologia dos hemócitos presentes na hemolinfa da vespa social *Polybia platycephala* Richards (Hymenoptera: Vespidae). A análise morfológica e a do tamanho dos hemócitos foram realizados por microscopia de luz com auxílio do programa ImageJ. A hemolinfa de *P. platycephala* apresentou diferentes morfotipos de hemócitos. Os prohemócitos foram células com tamanho de  $0,5 \pm 0,10 \mu\text{m}$ , forma esférica e citoplasma ocupando uma pequena área em torno de um núcleo grande e central. Os plasmatócitos foram células polimórficas de tamanhos variados, com média de  $0,5 \pm 0,10 \mu\text{m}$  nas formas esféricas e  $0,6 \pm 0,11 \mu\text{m}$  de comprimento por  $0,4 \pm 0,09 \mu\text{m}$  nas formas ovais. Os granulócitos exibiram tamanho de  $0,7 \pm 0,09 \mu\text{m}$  na forma esférica com diversos grânulos citoplasmáticos e núcleo central arredondado. Os oenocitóides foram as maiores células observadas ( $1,0 \pm 0,11 \mu\text{m}$ ), com formato esférico e citoplasma com pontuações fortemente coradas. Quatro tipos de hemócitos foram identificados: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides. Prohemócitos em mitose e com características intermediárias entre prohemócitos e plasmatócitos, sugerem diferenciação celular.

**PALAVRAS-CHAVES:** diferenciação celular, hemócitos, morfologia, vespa social.

## INTRODUÇÃO

Os hemócitos são células morfologicamente distintas que circulam livremente na hemolinfa (Strand 2008, Hillyer e Strand 2014) e possuem grande variedade de tamanho, formas e funções entre as espécies de insetos (Lavine e Strand 2002). Estas células reconhecem corpos estranhos por interação direta de receptores de superfície com moléculas exógenas, ou indiretamente por receptores humorais que se ligam na superfície do invasor (Lavine e Strand 2002). Hemócitos de insetos desempenham funções como fagocitose, nodulação, encapsulação e melanização (Ribeiro et al. 2006, Avulova e Rosengaus 2011, Amaral et al. 2010). Estes processos atuam como respostas imunes em conjunto para eliminar patógenos da hemolinfa (Marmaras e Lampropoulou 2009).

Diversos tipos de hemócitos são tradicionalmente identificados por características morfológicas, histoquímicas e funcionais (Amaral et al. 2010, Tan et al. 2013, Kato et al. 2014). Os tipos mais comuns são prohemócitos, granulócitos, plasmatócitos esferulócitos e oenocitóides (Browne et al. 2013, Stoepler et al. 2013, Manachini et al. 2011). Estas células foram relatadas em diversas espécies de insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Isoptera, Lepidoptera, Orthoptera e Thysanura (Siddiqui e Al-Khalifa 2012, Pal e Kumar 2014). No entanto, estudos sobre hemócitos de himenópteros sociais são escassos (Manfredini et al. 2008, Amaral et al. 2010), sendo relatados prohemócitos, granulócitos, plasmatócitos e oenocitóides.

*Polybia platycephala* Richards (Hymenoptera: Vespidae), vulgarmente conhecida como marimbondo-chumbinho, se destaca entre as espécies de vespas sociais por ser abundante em agroecossistemas e ambientes urbanos. A importância econômica deste inseto se deve a sua atividade predadora sobre imaturos de Lepidoptera, Diptera, Hemiptera e Coleoptera (Prezoto et al. 2005). A biologia de *P. platycephala* foi estudada (Lima e Prezoto 2003, Rodríguez et al. 2012, De Souza et al. 2012), mas a

morfologia dos seus hemócitos não foi descrita.

O objetivo foi caracterizar morfologicamente os tipos de hemócitos na hemolinfa de fêmeas adultas de *P. platycephala*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material biológico.** Os dois ninhos de *P. platycephala* utilizados nos ensaios foram coletados no campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. Pupas e larvas presentes nos favos foram mantidas em estufa climatizada (B.O.D.) a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  de umidade relativa (UR) e 12 horas de fotofase.

**Coleta da hemolinfa.** A cabeça de fêmeas recém emergidas foi retirada e a hemolinfa foi coletada no tórax das mesmas. Cinco microlitros de hemolinfa de fêmeas de *P. platycephala* foram diluídos em solução salina tamponada (PBS; 0,1M; pH 7,4; Nutricell) na proporção de 1:1. Esfregaços com uma gota de  $10 \mu\text{m}$  de hemolinfa foram realizados. Em seguida, os esfregaços foram mantidos a temperatura ambiente por 20 minutos para adesão dos hemócitos à lâmina. As células foram então fixadas em metanol por 10 minutos (Amaral et al. 2010). Após secagem, o fixador foi removido com água destilada e os hemócitos corados com Giemsa (Sigma Chemical) diluído a 10% em PBS por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada para a remoção do corante residual.

**Análise morfométrica.** A caracterização morfométrica dos hemócitos foi realizada em microscópio de luz com aumento de 400x (Carl Zeiss Axio Vert.A1) equipado com câmera digital AxioCam ICc 1 (Carl Zeiss). Cem hemócitos de cada tipo foram mensurados por meio das imagens computadorizadas utilizando-se o software ImageJ (versão 1.48v). As características morfológicas utilizadas como critério para distinguir os três tipos de hemócitos foram baseadas na literatura (Ribeiro e Brehélin 2006, Avulova e Rosengaus 2011, Amaral et al. 2010).

## RESULTADOS

Quatro tipos de hemócitos: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides (Fig. 1), foram observados nos esfregaços da hemolinfa de *P.*

platycephala.

**Prohemócitos.** Os prohemócitos tem formato esférico com diâmetro de  $0,5 \pm 0,10 \mu\text{m}$  (0,24 a  $0,86 \mu\text{m}$ ) e núcleo central volumoso ocupando a maior parte da célula (Fig. 1A). O núcleo dessa célula apresenta coloração roxa escura e o citoplasma azul (basofílico). Diversas células com características intermediárias entre prohemócitos e plasmatócitos foram observadas. Os prohemócitos foram os únicos tipos de hemócitos com figuras sugestivas de mitose (Fig. 1D).

**Plasmatócitos.** Hemócitos com diferentes tamanhos e formas. Os esféricos medem  $0,5 \pm 0,10 \mu\text{m}$  (0,35 a  $0,77 \mu\text{m}$ ) de diâmetro. As formas ovais e irregulares apresentam comprimento de  $0,6 \pm 0,11 \mu\text{m}$  e largura de  $0,4 \pm 0,09 \mu\text{m}$ . O núcleo pode ser oval ou esférico com coloração roxa escura (Fig. 1B). O citoplasma possui coloração rósea com prolongamentos citoplasmáticos nas formas irregulares. Inclusões citoplasmáticas neutrófilas foram observadas (Fig. 1B, seta).

**Granulócitos.** Os granulócitos são células esféricas de tamanhos variáveis com média de  $0,7 \pm 0,09 \mu\text{m}$  (0,49 a  $0,85 \mu\text{m}$ ) de diâmetro. O núcleo é central, arredondado e acidofílico (Fig. 1C). O citoplasma apresenta numerosos grânulos neutrofílicos.

**Oenocitoides.** Os oenocitoides foram as maiores células detectadas na hemolinfa, sendo caracterizado pelo formato esférico com  $1,0 \pm 0,11 \mu\text{m}$  (0,8 a  $1,25 \mu\text{m}$ ) de diâmetro. O núcleo é pequeno e excêntrico, sempre com mais citoplasma de um lado que de outro (Fig.1E). O citoplasma apresenta pontuações fortemente coradas em azul nos esfregaços.

## DISCUSSÃO

A forma semelhante dos prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitoides da hemolinfa de *P. platycephala* com outras espécies indica que estas células apresentam morfologia padrão entre os insetos (Manfredini et al. 2008, Amaral

et al. 2010, Kwon et al. 2014). No entanto, o tamanho médio dos hemócitos foi menor quando comparado a outros estudos (Tabela 1) e pode estar relacionado com quantidades reduzidas de regiões não codificantes do DNA (introns) (Kozłowski et al. 2003). Células com pequeno genoma são menores e têm maior taxa metabólica para se dividir rapidamente (Kozłowski et al. 2003). As respostas de defesa celular nos insetos dependem do tamanho dos hemócitos, pois quanto maior o tamanho das partículas invasoras em relação a essas células, maior o recrutamento de novos hemócitos para a formação de nódulos (Gunnarsson e Lackie 1985). Esse processo é o início do estímulo das reações de diferenciação celular e se o hospedeiro não possuir número suficiente de hemócitos para controlar infecções, os órgãos hematopoiéticos podem ser estimulados para formarem novas células (Ling et al. 2005, Rodrigues et al. 2010).

Os diversos hemócitos observados com características intermediárias entre prohemócitos e plasmatócitos suportam a teoria da “célula múltipla” de que uma única linhagem de células imutáveis denominadas prohemócitos originam outros tipos celulares (Akai e Sato 1973, Gupta 1985, Grigorian e Hartenstein, 2013). Os prohemócitos de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera) são capazes de se diferenciar em plasmatócitos e granulócitos (Yamashita e Iwabuchi 2001). *Polybia platycephala* apresentou muitos prohemócitos em mitose como verificado para *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera: Tephritidae), *Sarcophaga ruficornis* Fab. (Sarcophagidae: Diptera), *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) e *Chrysomya megacephala* Fab. (Diptera: Calliphoridae) (Silva et al. 2002, Pal e Kumar 2014) indicando sua capacidade de gerar novas células. As células filhas de prohemócitos oriundos da divisão mitótica tornam-se outros tipos celulares como plasmatócitos, granulócitos e esferulócitos, confirmando assim sua multipotencialidade (Yamashita e Iwabuchi 2001).

Plasmatócitos, hemócitos com enorme variação morfológica em *P. platycephala*, foram descritos como ovais, arredondados ou irregulares em espécies de Lepidoptera,

Diptera e Hymenoptera (Ribeiro e Brehélin 2006, Araújo et al. 2008, Amaral et al. 2010). Estas células podem se aderir aos corpos estranhos e são os principais hemócitos envolvidos na encapsulação (Hillyer e Christensen 2002, Giulianini et al. 2003, Hori et al. 2013). Adicionalmente, a secreção de proteínas anti-microbianas e de reconhecimento indicam que os plasmatócitos desempenham várias funções, contudo seu papel na imunidade humoral é, em grande parte, desconhecido (Nakahara et al. 2009).

Os diversos grânulos proteicos observados no citoplasma dos granulócitos, quando liberados no meio extracelular, aglutinam microrganismos formando cápsulas e nódulos ao redor de patógenos (Manachini et al. 2011). Os granulócitos são os principais hemócitos envolvidos na fagocitose de corpos estranhos (Kwon et al. 2014), mas vasos demasiadamente grandes podem ser encapsulados por esta célula e por plasmatócitos (Nakahara et al. 2009).

Os hemócitos caracterizados como oenocitóides em *P. platycephala* também foram descritos em *Culex quinquefasciatus* Say, *Rhodnius prolixus* Stal e *Melipona scutellaris* Latreille (Brayner et al. 2007, Borges et al. 2008, Amaral et al. 2010). O teor dos numerosos grânulos citoplasmáticos deste hemócito corresponde provavelmente a profenoloxidase liberada na hemolinfa quando invasores são detectados pelo sistema imune dos hospedeiros (Borges et al. 2008). Os oenocitóides não possuem capacidade de se aderir a corpos estranhos (Lavine e Strand 2002, Manachini et al. 2011), contudo sintetizam precursores da enzima profenoloxidase com papel importante na melanização e encapsulação de corpos estranhos (Nakahara et al. 2009). Além disso, proteínas de reconhecimento são comumente expressas em oenocitóides, sugerindo que estas células reconhecem infecções microbianas (Nakahara et al. 2009).

O estudo contribuiu para a caracterização inédita dos hemócitos circulantes na hemolinfa de *P. platycephala*. Quatro tipos de hemócitos foram encontrados na

hemolinfa de *P. platycephala*: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides. Os prohemócitos em mitose e com características intermediárias entre prohemócitos e plasmatócitos, sugerem uma possível diferenciação celular na hemolinfa de *P. platycephala*.

## 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)”.

## REFERÊNCIAS

- Akai, H., and Sato, S. 1973.** Ultrastructure of the larval haemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* (L) (Lepidoptera, Bombycidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 2: 207-231.
- Amaral, I. M. R., Neto, J. F. M., Pereira, G. B., Franco, M. B., Beletti, M. E., Kerr, W. E., Bonetti, A. M., and Ueira-Vieira, C. 2010.** Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis. *Micron* 41: 123-129.
- Araújo, H. C. R., Cavalcanti, M. G. S., Santos, S. S., Alves, L. C., and Brayner, F. A. 2008.** Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* Diptera: Culicidae). *Micron* 39: 184-189.
- Avulova, S., and Rosengaus, R. B. 2011.** Losing the battle against fungal infection: suppression of termite immune defenses during mycosis. *J. Insect Physiol.* 57: 966-971.
- Borges, A. R., Santos, P. N., Furtado, A. F., and Figueiredo, R. C. B. Q. 2008.** Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Micron* 39: 486-494.

- Brayner, F. A., Araújo, H. R. C., Cavalcanti, M. G. S., Alves, L. C., and Peixoto, C. A. 2005.** Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Micron* 36: 359-367.
- Brayner, F. A., Araújo, H. R. C., Santos, S. S., Cavalcanti, M. G. S., Alves, L. C., Souza, J. R. B. and Peixoto, C. A. 2007.** Haemocyte population and ultrastructural changes during the immune response of the mosquito *Culex quinquefasciatus* to microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. *Med. Vet. Entomol.* 21: 112-120.
- Browne, N., Heelan, M., and Kavanagh, K. 2013.** An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* 4: 597-603.
- Caselín-Castro, S., Llanderal-Cázares, C., de Jesús Méndez-Gallegos, S., Ramírez-Cruz, A., and de la Cruz Hernández-Hernández, F. 2010.** Hemocytes of the cochineal insect: ultrastructure. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 73: 176-192.
- De Souza, A. D., Venâncio, D. F. A, Prezoto, F., and Zanuncio, J. C. 2012.** Social wasps (Hymenoptera: Vespidae) nesting in eucalyptus plantations in Minas Gerais, Brazil. *Florida Entomol.* 95: 1000-1002.
- Giglio, A., Battistella, S., Talarico, F. F., Brandmayr, T. Z., and Giulianini, P. G. 2008.** Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae): Cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self-challenge. *Micro* 39: 552-558.
- Giulianini, P. G., Bertolo, F., Battistella, S., and Amirante, G. A. 2003.** Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in vivo phagocytosis. *Tissue Cell* 35: 243-251.
- Grigorian, M., and Hartenstein, V. 2013.** Hematopoiesis and hematopoietic organs in arthropods. *Dev. Genes Evol.* 223: 103-115.

- Gunnarsson, S. G. S., and Lackie, A. M. 1985.** Hemocytic aggregation in *Schistocerca gregaria* and *Periplaneta americana* as a response to injected substances of microbial origin. *J. Invert Pathol.* 46: 312-319.
- Gupta, A. P. 1985.** Cellular elements in the hemolymph. *Comprehensive insect physiology. Biochem. Pharmacol.* 3: 401-451.
- Hillyer, J. F., and Christensen, B. M. 2002.** Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochem. Cell. Biol.* 117: 431-440.
- Hillyer, J. F., and Strand, M. R. 2014.** Mosquito hemocyte-mediated immune responses. *Curr. Opin. Insect Sci.* 3: 14-21.
- Hori, T., Kiuchi, T., Shimada, T., Nagata, M., and Katsuma, S. 2013.** Silkworm plasmatocytes are more resistant than other hemocyte morphotypes to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. *J. Invertebr. Pathol.* 112: 102-104.
- Huang, F., Yang, Y. Y., Shi, M., Li, J. Y., Chen, Z. Q., Chen, F. S., and Chen, X. X. 2010.** Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Plutella xylostella* larva: cell types and their role in phagocytosis. *Tissue Cell.* 42: 360-364.
- Kato, Y., Yoshida, T., Miura, K., Tanaka, T., Nakamatsu, Y., and Ochiai, M. 2014.** A novel type of hemocytes localizing melanization with high-spreading behavior in *Mythimna separata*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 86: 220-239.
- Kozłowski, J., Konarzewski, M., and Gawelczyk, A. T. 2003.** Cell size as a link between noncoding DNA and metabolic rate scaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 14080-14085.
- Kwon, H., Bang, K., and Cho, S. 2014.** Characterization of the hemocytes in larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis*: involvement of granulocyte-mediated phagocytosis. *PLoS ONE* 9: e103620.
- Lavine, M. D., and Strand, M. R. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect*

Biochem. Mol. Biol. 32:1295-1309.

- Lima, M. A. P., and Prezoto, F. 2003.** Foraging activity rhythm in the Neotropical swarm-founding wasp *Polybia platycephala sylvestris* Richards, 1978 (Hymenoptera: Vespidae) in different seasons of the year. *Sociobiology* 42: 745-752.
- Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R., and Kiguchi, K. 2005.** Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. *Cell. Tissue Res.* 320: 535-543.
- Manachini, B., Arizza, V., Parrinello, D., and Parrinello, N. 2011.** Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 106: 360-365.
- Manfredini, F., Dallai, R., and Ottaviani, E. 2008.** Circulating hemocytes from larvae of the paper wasp *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae). *Tissue Cell* 40: 103-112.
- Marmaras, V. J., and Lampropoulou, M. 2009.** Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal.* 21: 186-195.
- Nakahara, Y., Shimura, S., Ueno, C., Kanamori, Y., Mita, K., Kiuchi, M., and Kamimura, M. 2009.** Purification and characterization of silkworm hemocytes by flow cytometry. *Dev. Comp. Immunol.* 33: 439-448.
- Pal, R., and Kumar, K. 2014.** A comparative study of haemocytes in three cyclorrhaphous dipteran flies. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 34: 207-216.
- Prezoto, F., Lima, M. A. P., and Machado, V. L. L. 2005.** Survey of preys captured and used by *Polybia platycephala* (Richards) (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini). *Neotrop. Entomol.* 34: 849-851.
- Ribeiro, C., and Brehélin, M. 2006.** Insect haemocytes: what type of cell is that?. *J. Insect Physiol.* 52: 417-429.
- Rodrigues, J., Brayner, F. A., Alves, L. C., Dixit, R., and Barillas-Mury, C. 2010.**

Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* 329: 1353-1355.

**Rodríguez, F. A., Barros, L. C., Caroline, P., Serrão, J. E., and Zanuncio, J. C. 2012.**

Nidification of *Polybia platycephala* and *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae) on plants of *Musa* spp. in Minas Gerais State, Brazil. *Sociobiology* 59: 457-461.

**Siddiqui, M. I., and Al-Khalifa, M. S. 2012.** Circulating haemocytes in insects: phylogenetic review of their types. *Pak. J. Zool.* 44: 1743-1750.

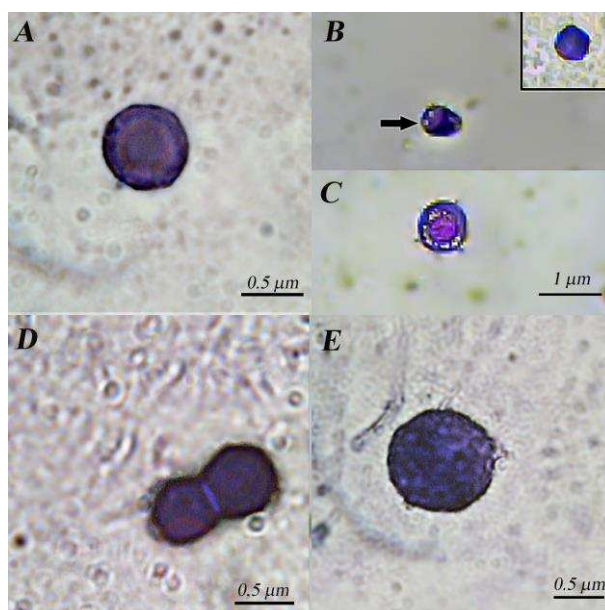
**Silva, J. E. B., Boleli, I. C., and Simoes, Z. L. P. 2002.** Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. *Braz. J. Biol.* 62: 689-699.

**Stoepler, T. M., Castillo, J. C., Lill, J. T., and Eleftherianos, I. 2013.** Hemocyte density increases with developmental stage in an immune-challenged forest caterpillar. *PLoS ONE* 8: e70978

**Strand, M. R. 2008.** The insect cellular immune response. *Insect Sci.* 15: 1-14.

**Tan, J., Xu, M., Zhang, K., Wang, X., Chen, S., Li, T., Xiang, Z., and Cui, H. 2013.** Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 59: 595-603.

**Yamashita, M., and Iwabuchi, K. 2001.** *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *J. Insect Physiol.* 47: 325-331.



**Fig. 1.** Morfologia de diferentes hemócitos de *Polybia platycephala* (Hymenoptera:Vespidae). (A) prohemócito, (B) plasmatócitos, (C) granulócito, (D) prohemócitos em mitose, (E) oenocitoide. Seta indica inclusões citoplasmáticas neutrofílicas.

**Tabela 1.** Tamanho médio dos hemócitos ( $\mu\text{m}$ ) de diferentes espécies de insetos. Pr (prohemócito), Pl (plasmatócito), Gr (granulócito), Oe (oenocitoide).

Espécie	Pr	Pl	Gr	Oe	Referência
<i>Plutella xylostella</i> L. (Lepidoptera:Plutellidae)	5,7	8,4	7,7	10,4	Huang et al. 2010
<i>Melipona scutellaris</i> Latreille (Hymenoptera: Apidae)	8,6	10,9	19,1	20,2	Amaral et al. 2010
<i>Protaetia brevitarsis seulensis</i> (Kolbe) (Coleoptera: Cetoniidae)	6,6	6,7	11,0	18,0	Kwon et al. 2014
<i>Culex quinquefasciatus</i> Say (Diptera: Culicidae)	5,0	6,0	8,0	6,0	Brayner et al. 2005
<i>Rhynchophorus ferrugineus</i> (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae)	5,6	16,3	22,2	38,0	Manachini et al. 2011
<i>Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei</i> Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae)	8,0	15,0	13,0	10,0	Giglio et al. 2008
<i>Dactylopius coccus</i> Costa (Hemiptera: Dactylopiidae)	4,9	11,9	10,8	7,0	Caselin-Castro et al. 2010

## **CAPÍTULO 2**

### **SOBREVIVÊNCIA E DINÂMICA HEMOCITÁRIA DE *Polybia platycephala* (HYMENOPTERA: VESPIDAE) APÓS INFECÇÃO POR *Metarhizium anisopliae***

**ABSTRACT.** Entomopathogens are popularly used in the biological control of insect herbivores, but the effect of their pathogenicity in natural enemies is not completely understood. Therefore, a measurement of risks of the microbial biocontrol agent toward predatory insects is crucial. We investigated the survival and dynamics hemocytes of the neotropical social wasp *Polybia platycephala* (Richards) after exposure to biopesticide *Metarhizium anisopliae* strain ESALQ E9 (Metarril® WP). Exposure of *P. platycephala* to lower concentrations of this fungus ( $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  spores/mL) was safe. However, high spore concentrations ( $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  spores/mL) reduced the survival and the number of granulocytes and prohemocytes of *P. platycephala* and indicates that the biological control with *M. anisopliae* may reduce populations of this natural enemy in agroecosystems. The isolated *M. anisopliae* ESALQ E9 showed a negative interaction with *P. platycephala* at concentrations of  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  spores/mL. However, *M. anisopliae* can interact with *P. platycephala* at concentrations of  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  spores/ml without compromising the survival or number of hemocyte this predator.

**KEY WORDS.** biological control, entomopathogens, predator, fungi

**RESUMO.** Entomopatógenos são utilizados no controle biológico de insetos herbívoros, mas o seu impacto em inimigos naturais é pouco compreendido. Isto torna importante se medir os riscos dos agentes microbianos em insetos predadores. A sobrevivência e a dinâmica hemocitária da vespa social neotropical *Polybia platycephala* Richards (Hymenoptera: Vespidae) após a exposição ao biopesticida *Metarhizium anisopliae* isolado ESALQ E9 (Metarril® WP), foi avaliada. A exposição de *P. platycephala* a baixas concentrações deste fungo ( $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  spores/mL) foi segura. No entanto, altas concentrações ( $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  spores/mL) reduziram a sobrevivência e o número de granulócitos e prohemócitos de *P. platycephala* e indica que o controle biológico com *M. anisopliae* pode reduzir as populações deste inimigo natural em agroecossistemas. O isolado *M. anisopliae* ESALQ E9 apresentou interação negativa com *P. platycephala* nas concentrações de  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  esporos/mL. Contudo, *M. anisopliae* pode interagir com *P. platycephala* em concentrações de  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  esporos/mL sem comprometer a sobrevivência ou o número de hemócitos desse predador.

**PALAVRAS-CHAVE:** controle biológico, entomopatógenos, fungos, predador.

## INTRODUÇÃO

Vespas sociais são insetos predadores generalistas oportunistas (Richter, 2000). *Polybia platycephala* Richards (Hymenoptera: Vespidae) tem potencial para o controle biológico de imaturos de Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera e Diptera (Prezoto et al. 2005, Rodríguez et al. 2012, Jacques et al. 2012). Ninhos desta vespa são construídos em agroecossistemas com alta diversidade de presas (Clouse 2001, Auad et al. 2012, De Souza et al. 2012), onde inseticidas podem reduzir suas populações (Bommarco et al. 2011). A utilização integrada de predadores com biopesticidas comerciais pode aumentar a eficácia do controle de pragas, diminuindo o uso de inseticidas químicos.

O fungo generalista *Metarhizium anisopliae* Sorokin, frequentemente utilizado no controle biológico de pragas, pode infectar uma variedade de insetos (Morjan et al. 2002, Roy et al. 2006, Dubovskiy et al. 2013). Este agente microbiano se dispersa passivamente pelo vento, chuva ou por hospedeiros infectados que morrem ou migram para outros locais (Hajek e Leger 1994, Meyling e Ellenberg 2007).

Apesar da segurança ambiental, aplicações inundativas de *M. anisopliae* em agroecossistemas podem causar mortalidade de espécies não-alvo. Insetos predadores podem ser infectados no momento da aplicação no campo ou por contato com os esporos dos fungos nas folhas (França et al. 2006). Vespas sociais podem ser infectados por fungos entomopatogênicos (Rose et al., 1999, Madden et al. 2012) principalmente pela manipulação de presas infectadas (Harris et al. 2000), mas a interação entre vespas sociais e *M. anisopliae* precisa ser melhor estudada (Harris et al. 2000, Merino et al. 2007). O objetivo deste estudo foi avaliar as concentrações de esporos de *M. anisopliae* isolado ESALQ E9 (Metarril) compatíveis com a vespa social *P. platycephala*. A hipótese é de que *M. anisopliae* em baixas concentrações de esporos não compromete a sobrevivência ou o número de hemócitos presentes na hemolinfa da vespa predadora *P. platycephala*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Coleta de *Polybia platycephala*.** Onze ninhos de *P. platycephala* foram coletados no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Pupas e larvas presentes nos favos foram mantidas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  de UR e 12 horas de fotofase, enquanto os adultos foram removidos e descartados.

**Sobrevivência.** Suspensões com o bioinseticida Metarril® WP (*M. anisopliae*, isolado ESALQ E9) em água destilada e Tween 80® a 0,01%, na concentração recomendada para aplicação no campo ( $1 \times 10^9$  esporos/mL) foram preparadas e posteriormente diluídas em  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  esporos/mL. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (quatro concentrações do fungo e o controle) em cinco repetições, cada uma com cinco fêmeas recém-emergidas de *P. platycephala*, totalizando 25 indivíduos por tratamento. A mortalidade das vespas foi analisada por 10 dias. Os insetos mortos foram incubados a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  de UR e 12 horas de fotofase, para confirmar a esporulação do fungo.

Dois métodos de inoculação de esporos foram testados. (1) inoculação tópica: uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  da suspensão de esporos foi inoculada sobre a superfície ventral do tórax de cada fêmea recém-emergida de *P. platycephala* (James et al., 2012). O controle teve 1  $\mu\text{L}$  de água destilada com o Tween 80® a 0,01%. As vespas foram individualizadas em placa de Petri (9,0 x 1,2 cm) e receberam diariamente 1 mL de mel a 50% como alimento. (2) Inoculação por ingestão: uma solução de 50:50 (v/v) de suspensão de esporos/mel foi preparada por concentração (Harris et al., 2000). Fêmeas de *P. platycephala* recém-emergidas foram individualizadas em placas de Petri e alimentadas com 1 mL da solução. O tratamento controle recebeu diariamente 1 mL de mel 50%.

**Hemócitos contados.** O bioinseticida Metarril® WP (*M. anisopliae*, isolado ESALQ E9) foi diluído em água destilada e Tween 80® a 0,01%, nas concentrações de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  conídios/mL. Vinte fêmeas adultas recém emergidas de *P. platycephala* foram expostas ao fungo entomopatogênico *M. anisopliae* por tratamento e no controle. Uma alíquota de 1  $\mu$ L da suspensão de esporos desse fungo foi inoculada sobre a superfície ventral do tórax das vespas e, posteriormente, os indivíduos foram individualizados em placas de Petri (9,0 x 1,2 cm). Essas fêmeas adultas foram expostas ao fungo durante 24, 48 e 72 horas e, após esse período, limpas em álcool 70% por cinco segundos antes da coleta de hemolinfa.

A coleta de 1  $\mu$ L de hemolinfa foi realizada com micropipeta a partir de incisão no tórax, e transferido para 9  $\mu$ L de solução anticoagulante (98 mM de NaOH, 186 mM de NaCl, 17mM de Na<sub>2</sub>EDTA e 41mM de ácido cítrico, pH 4,5) para evitar a agregação dos hemócitos (Ibrahim e Kim, 2006). As amostras de hemolinfa foram coradas com 3  $\mu$ L Giemsa e o total de prohemócitos, plasmatócitos e granulócitos quantificado (Ribeiro e Brehélin 2006, Avulova e Rosengaus 2011) em microscópio de luz com câmara de Neubauer. As seguintes características morfológicas foram utilizadas como critério para distinguir os três tipos de hemócitos: prohemócitos possuem núcleos grandes e roxo escuro, citoplasma ocupa uma área estreita em torno do núcleo; plasmatócitos são células altamente polimórficas com citoplasma apresentando pequenos vacúolos claros, os núcleos podem ser esféricos ou ovais; granulócitos contém numerosos grânulos no citoplasma, têm um pequeno núcleo que geralmente ocupa uma posição central (Ribeiro e Brehélin 2006, Avulova e Rosengaus 2011, Amaral et al. 2010).

**Análise Estatística.** As curvas de sobrevivência de fêmeas adultas de *P. platycephala* foram geradas pelo método Kaplan-Meier e comparadas pelo teste Log-Rank a 5% de probabilidade. O número de hemócitos, nas diferentes concentrações do

fungo e intervalos de tempo, foi submetido à análise de variância do tipo fatorial 4x3, considerando os tratamentos (controle e *M. anisopliae* nas concentrações  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  conídios/mL) e três intervalos de tempo (24, 48, e 72h). A contribuição independente de cada variável na densidade hemocitária e as interações potenciais entre as variáveis foram analisadas. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e transformados em log 10. As médias foram avaliadas pelo teste de Tukey a  $p < 0.05$  (LSMEANS) para múltiplas comparações com GLM (fatorial ANOVA).

## RESULTADOS

**Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* na sobrevivência da vespa social neotropical *Polybia platycephala*.** O fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, nas concentrações de  $1 \times 10^6$  ( $\chi^2 = 0.02$ ;  $P = 0.88$ ) ou  $1 \times 10^7$  ( $\chi^2 = 0.33$ ;  $P = 0.56$ ) esporos/mL, não afetou a sobrevivência das vespas (Fig. 1A). No entanto, a sobrevivência dessa vespa foi menor nas concentrações de  $1 \times 10^8$  ( $\chi^2 = 7.00$ ;  $P = 0.008$ ) e  $1 \times 10^9$  esporos/mL ( $\chi^2 = 7.46$ ;  $P = 0.006$ ). O início da esporulação do fungo foi no aparelho bucal, entre as articulações das pernas e dobras intersegmentares, se espalhando gradualmente para outras partes do corpo nos cadáveres de *P. platycephala*. O fungo *M. anisopliae* não reduziu a sobrevivência ou esporulou nas vespas quando administrado por ingestão (Fig. 1b).

### **Contagem de hemócitos em *P. platycephala* após infecção com *M. anisopliae*.**

A contagem dos tipos de hemócitos circulantes na hemolinfa de *P. platycephala* variou após a inoculação tópica com *M. anisopliae*. Vespas tratadas apresentaram menor número de prohemócitos que aquelas do controle ( $F = 39.80$ ;  $P < 0.0001$ ). O número de prohemócitos foi semelhante ao longo do tempo ( $F = 2.54$ ;  $P = 0.08$ ). O número de granulócitos foi menor com  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  esporos/mL após 24h de exposição ao fungo *M. anisopliae* ( $F = 4.61$ ;  $P < 0.0001$ ) comparado ao controle (Fig. 2). O número

de plasmatócitos foi estatisticamente igual em todos os tratamentos ( $F = 1.61$ ;  $P = 0.4043$ ).

O número total das células circulantes na hemolinfa de fêmeas adultas de *P. platycephala* foi menor após 24h da exposição a *M. anisopliae* com  $1 \times 10^9$  esporos/mL que no controle ( $F = 12.37$ ;  $P = 0.005$ ). A contagem total de hemócitos foi menor após 72h nas concentrações de  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^9$  esporos/mL desse fungo (Fig. 2).

## DISCUSSÃO

A menor sobrevivência de *P. platycephala* confirma a virulência de *M. anisopliae* para esta vespa social. O início da esporulação no aparelho bucal, entre as articulações das pernas e dobras intersegmentares de *P. platycephala* é, provavelmente, favorecido pelo fato da cutícula ser menos esclerotizada nessas regiões, sendo mais vulneráveis à penetração de fungos como relatado para *Anoplophora glabripennis* Motsch. (Wang et al. 2009).

A sobrevivência semelhante de fêmeas adultas de *P. platycephala* nas concentrações de  $10^6$  e  $10^7$  esporos/mL de *M. anisopliae* e no controle sugerem reduzida virulência desse fungo em baixas concentrações em aplicação tópica. No entanto, este fungo superou as respostas imunológicas e causou mortalidade de *P. platycephala* quando os insetos foram expostos topicamente às concentrações  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  esporos/mL, devido à maior probabilidade de conídios se aderirem à cutícula (Kirkland et al. 2004, Ment et al. 2010). A melanização ou encapsulação também podem ter controlado os baixos níveis de infecção com *M. anisopliae*, como observado para *Reticulitermes flavipes* (Isoptera) e *Lasius neglectus* (Hymenoptera) (Chouvenc et al. 2009, Konrad et al. 2012).

A ausência de infecção após a ingestão de *M. anisopliae* indica que o trato digestivo de *P. platycephala* não favoreceu a colonização deste patógeno e confirma o

fato de fungos entomopatogênicos terem maior ação quando penetram no hospedeiro, principalmente através do tegumento (Chouvenc et al. 2009, Ansari et al. 2010). A flora microbiana (Dillon e Charnley 1986), moléculas anti-fúngicas no intestino (Chouvenc et al. 2009) e o curto tempo de contato com a parede intestinal (Ansari et al. 2010) podem impedir a penetração de fungos no intestino. Além disso, a membrana peritrófica é uma barreira eficaz à infecção por patógenos (Feng 1951, Brandi et al. 1978, Levy et al. 2011).

A redução do número de prohemócitos sugere a diferenciação destas células em plasmatócitos e/ou granulócitos para agir na resposta imune de *P. platycephala* desafiado por *M. anisopliae*. Os prohemócitos são células multipotentes que podem se diferenciar em todos os outros tipos de células circulantes na hemolinfa (Ling et al. 2005, Nakahara et al. 2010, Grigorian e Hartenstein 2013), contribuindo para a defesa contra microrganismos patogênicos (Borges et al. 2008, Rodrigues et al. 2010, Zibae et al. 2011).

O menor número de granulócitos em *P. platycephala* após 24 h de exposição a altas concentrações de *M. anisopliae* ( $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  esporos/mL) demonstra o recrutamento desses hemócitos para reações de defesa imunitária celular. A diminuição da densidade de granulócitos na hemolinfa está relacionada com o envolvimento destas células para formar a camada de melanina quando hifas de fungos penetram na cutícula lesionada (Lai et al. 2002, Chouvenc et al. 2009).

Os números estatisticamente iguais de plasmatócitos em todos os tratamentos indicam que estas células não desempenham papel importante nos mecanismos de defesa imunitária celular de *P. platycephala* contra *M. anisopliae*. Plasmatócitos são recrutados para formar cápsulas em torno de partículas estranhas (Lai et al. 2002, Stoepler et al. 2013), mas os granulócitos são as células que primeiro entram em contato com os invasores (Lai et al. 2002).

A redução do número total de hemócitos durante a infecção por *M. anisopliae* sugere que metabolitos citotóxicos liberados pelo fungo ou a pressão mecânica de hifas podem ter induzido a agregação de células circulantes na hemolinfa de *P. platycephala*. A redução de hemócitos, após infecção por fungos (Avulova e Rosengaus 2011, Sahayaraj et al. 2014), indica a ativação do sistema imunitário (Anggraeni e Putra 2011) ou a susceptibilidade de hemócitos para metabolitos fúngicos tóxicos (Han et al. 2013).

O isolado *M. anisopliae* ESALQ E9 apresentou interação negativa com *P. platycephala*. A exposição a esse fungo entomopatogênico, nas concentrações de  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  esporos/mL, reduziu a sobrevivência e o número de hemócitos circulantes em *P. platycephala*. No entanto, *M. anisopliae* pode interagir com *P. platycephala* em concentrações de  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  esporos/mL sem comprometer a sobrevivência ou o número de hemócitos desse predador.

## 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)”.

## REFERENCIAS

- Amaral, I. M. R., Neto, J. F. M., Pereira, G. B., Franco, M. B., Beletti, M. E., Kerr, W. E., Bonetti, A. M., and Ueira-Vieira, C. 2010.** Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis. *Micron* 41: 123-129.
- Anggraeni, T., and Putra, R. E. 2011.** Cellular and humoral immune defenses of *Oxya japonica* (Orthoptera: Acrididae) to entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*. *Entomol. Res.* 41: 1-6.

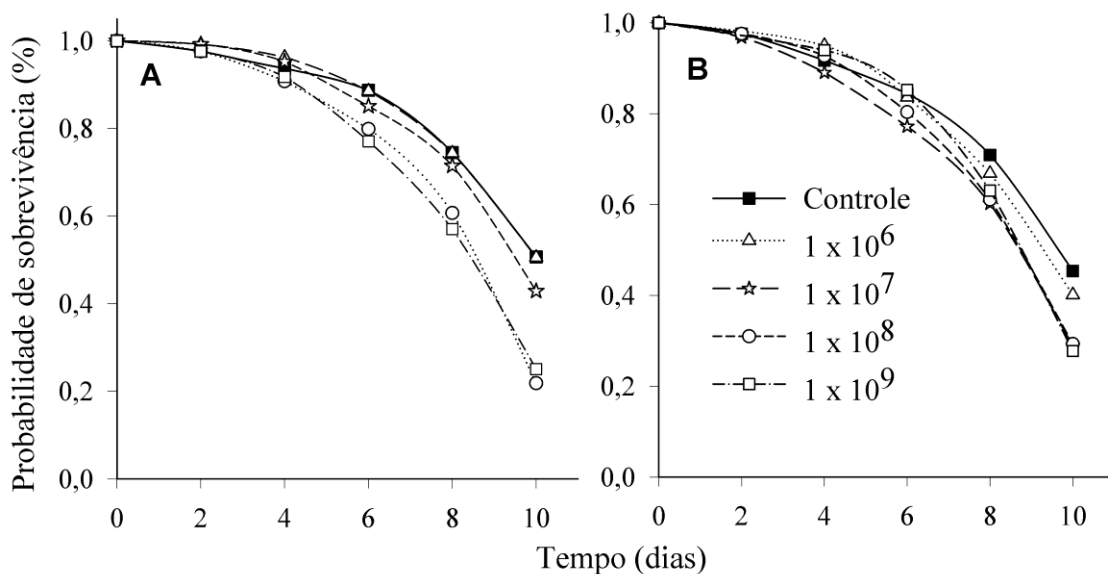
- Ansari, M. A., Carpenter, S., and Butt, T. M. 2010.** Susceptibility of *Culicoides* biting midge larvae to the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Prospects for bluetongue vector control. *Acta Trop.* 113: 1-6.
- Auad, A. M., Resende, T. T., Silva, D. M., and Fonseca, M. G. 2012.** Hymenoptera (Insecta: Hymenoptera) associated with silvopastoral systems. *Agroforest Syst.* 85: 113-119.
- Avulova, S., and Rosengaus, R. B. 2011.** Losing the battle against fungal infection: suppression of termite immune defenses during mycosis. *J. Insect. Physiol.* 57: 966-971.
- Bommarco, R., Miranda, F., Bylund, H., and Björkman, C. 2011.** Insecticides suppress natural enemies and increase pest damage in cabbage. *J. Econ. Entomol.* 104: 782-791.
- Borges, A. R., Santos, P. N., Furtado, A. F., and Figueiredo, R. C. B. Q. 2008.** Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Micron* 39: 486-494.
- Brandi, C. R., Adang, M. J., and Spence, K. D. 1978.** The peritrophic membrane: ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgia pseudotsugata*. *J. Invert. Pathol.* 32: 12-24.
- Chouvenc, T., SU, N. Y., and Robert, A. 2009.** Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 101: 234-241.
- Clouse, R. 2001.** Some effects of group size on the output of beginning nests of *Mischocyttarus mexicanus* (Hymenoptera: Vespidae). *Florida Entomol.* 84: 418-425.
- De Souza, A. D., Venâncio, D. F. A, Prezoto, F., and Zanuncio, J. C. 2012.** Social wasps (Hymenoptera: Vespidae) nesting in eucalyptus plantations in Minas Gerais, Brazil. *Florida Entomol.* 95: 1000-1002.

- Dillon, R. J., and Charnley, A. K. 1986.** Inhibition of *Metarhizium anisopliae* by the gut bacterial flora of the desert locust *Schistocerca gregaria*: Evidence for an antifungal toxin. *J. Invertebr. Pathol.* 47: 350-360.
- Dubovskiy, I. M., Whitten, M. M., Yaroslavtsev, O. N., Greig, C., Kryukov, V. Y., Grizanov, E. V., Mukherjee, K., Vilcinskas, A., Glupov, V. V., and Butt, T. M. 2013.** Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi?. *PLoS ONE* 8: e60248.
- França, I. W. B., Marques, E. J., Torres, J. B., and Oliveira, J. V. 2006.** Efeitos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotrop. Entomol.* 35: 349-356.
- Feng, L. C. 1951.** The role of the peritrophic membrane in leishmania and trypanosome infection of sandflies. *Peking Nat. Hist. Bull.* 19 (Pts. 2/3): 327-334.
- Grigorian, M., and Hartenstein, V. 2013.** Hematopoiesis and hematopoietic organs in arthropods. *Dev. Genes Evol.* 223: 103-115.
- Hajek, A. E., and S.T. Leger, R. J. 1994.** Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 293-322.
- Han, P., Jin, F., Dong, X., Fan, J., Qiu, B., and Ren, S. 2013.** Transcript and protein profiling analysis of the destruxin A-induced response in larvae of *Plutella xylostella*. *PLoS ONE* 8: e60771.
- Harris, R. J., Harcourt, S. J., Glare, T. R., Rose, E. A. F., and Nelson, T. J. 2000.** Susceptibility of *Vespula vulgaris* (Hymenoptera: Vespidae) to generalist entomopathogenic fungi and their potential for wasp control. *J. Invertebr. Pathol.* 75: 251-258.
- Ibrahim, A., and Kim, Y. 2006.** Parasitism by *Cotesia plutellae* alters the hemocyte population and immunological function of the diamondback moth *Plutella xylostella*. *J. Insect Physiol.* 52: 943-950.

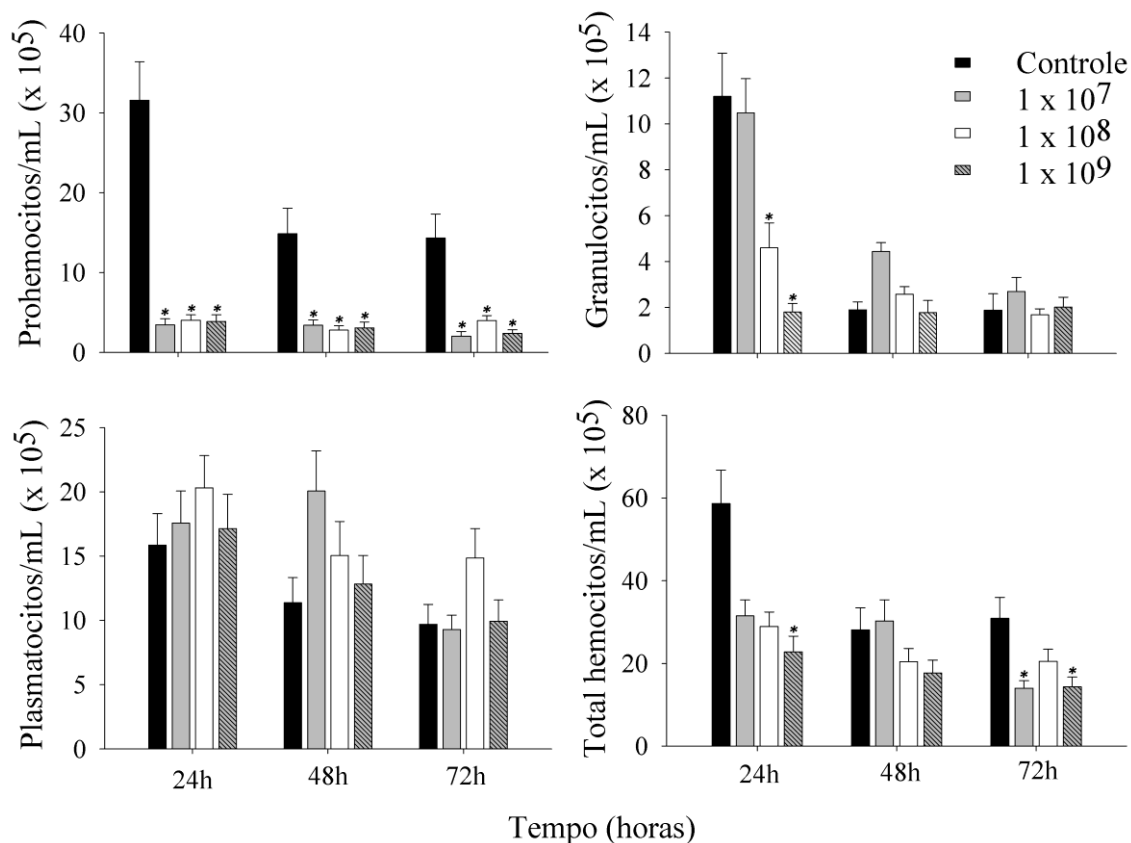
- James, R. R., Mcguire, M. R., and Leland, J. E. 2012.** Susceptibility of adult alfalfa leafcutting bees<sup>1</sup> and honey bees<sup>2</sup> to a microbial control agent, *Beauveria bassiana*. *Southwest Entomol.* 37: 13-21.
- Kirkland, B. H., Westwood, G. S., and KeyhanI, N. O. 2004.** Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *J. Med. Entomol.* 41: 705-711.
- Konrad, M., Vyleta, M. L., Theis, F. J., Stock, M., Tragust, S., Klatt, M., Drescher, V., Marr, C., Ugelvig, L. V. and Cremer, S. 2012.** Social transfer of pathogenic fungus promotes active immunisation in ant colonies. *PLoS Biol.* 10: e1001300.
- Lai, S. C., Chen, C. C., and Hou, R. F. 2002.** Immunolocalization of prophenoloxidase in the process of wound healing in the mosquito *Armigeres subalbatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 39: 266-274.
- Levy S. M., Falleiros A. M., Moscardi F., and Gregorio E. A. 2011.** The role of peritrophic membrane in the resistance of *Anticarsia gemmatalis* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) during the infection by its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). *Arthropod. Struct. Dev.* 40: 429-434.
- Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R., and Kiguchi, K. 2005.** Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. *Cell Tissue Res.* 320: 535-543.
- Madden, A. A., Stchigel, A. M., Guarro, J., Sutton, D. A., and Starks, P. T. 2012.** *Mucor nidicola* sp. nov., a novel fungal species isolated from an invasive paper wasp nest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 1710-1714.
- Ment, D., Gindin, G., Glazer, I., Perl, S., Elad, D., and Samish, M. 2010.** The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. *Fungal Biol.* 114: 49-56.

- Meyling, N. V., and Eilenberg, J. 2007.** Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biol Control* 43: 145-155.
- Merino, L., France, A., and Gerding, M. 2007.** Selection of native fungi strains pathogenic to *Vespa germanica* (Hymenoptera: Vespidae). *Agric. Téc.* 67: 335-342.
- Morjan, W. E., Pedigo, L. P., and Lewis, L. C. 2002.** Fungicidal effects of glyphosate and glyphosate formulations on four species of entomopathogenic fungi. *Environ. Entomol.* 31: 1206-1212.
- Nakahara, Y., Kanamori, Y., Kiuchi, M., and Kamimura, M. 2010.** Two hemocyte lineages exist in silkworm larval hematopoietic organ. *PLoS ONE* 5: e11816.
- Prezoto, F., Lima, M. A. P., and Machado, V. L. L. 2005.** Survey of preys captured and used by *Polybia platycephala* (Richards) (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini). *Neotrop. Entomol.* 34: 849-851.
- Ribeiro, C., and Brehélin, M. 2006.** Insect haemocytes: what type of cell is that?. *J. Insect Physiol.* 52: 417-429.
- Richter, M. R. 2000.** Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behavior. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 121-150.
- Rodrigues, J., Brayner, F. A., Alves, L. C., Dixit, R., and Barillas-Mury, C. 2010.** Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* 329: 1353-1355.
- Rodríguez, F. A., Barros, L. C., Caroline, P., Serrão, J. E., and Zanuncio, J. C. 2012.** Nidification of *Polybia platycephala* and *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae) on plants of *Musa* spp. in Minas Gerais State, Brazil. *Sociobiology* 59: 457-461.
- Rose, E. A. F., Harris, R. A., Glare, T. R. 1999.** Possible pathogens of social wasps (Hymenoptera: Vespidae) and their potential as biological control agents. *New Zeal. J. Zool.* 26: 179-190.

- Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E., and Pell, J. K. 2006.** Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 331-357.
- Sahayaraj, K., Borgio, J. F., and Lucini, L. 2014.** Route of infection and hematological effect of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on *Dysdercus cingulatus* (Fab.) adult. *J. Basic Microbiol.* 54: 6-17.
- Stoepler, T. M., Castillo, J. C., Lill, J. T., and Eleftherianos, I. 2013.** Hemocyte density increases with developmental stage in an immune-challenged forest caterpillar. *PLoS ONE* 8: e70978.
- Wang, B., Zheng, J., Huang, D., Wang, D., Han, X., and Wang, X. 2009.** Symptoms and histopathological study of *Anoplophora glabripennis* larvae infected with *Metarhizium* (Metsch.) Sorokin MS01. *Front. Agric. China* 3: 152-158.
- Zibae, A., Bandani, A. R., Talaei-Hassanlouei, R., and Malagoli, D. 2011.** Cellular immune reactions of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*, to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and its secondary metabolites. *J. Insect. Sci.* 11: 1-16.



**Figura 1.** Probabilidade de sobrevivência de fêmeas adultas de *Polybia platycephala* (Hymenoptera: Vespidae) expostas ao fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. (A) tratamento tópico e (B) tratamento por ingestão, em diferentes concentrações.



**Figure 2.** Dinâmica hemocitária de fêmeas adultas de *Polybia platycephala* (Hymenoptera: Vespidae) tratadas topicamente com *M. anisopliae* em diferentes concentrações ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  conídios/mL) em função do tempo (24, 48, 72 horas). Diferenças significativas entre os tratamentos e o controle são indicados por \* (P < 0,05).

## **CAPÍTULO 3**

### **SUSCEPTIBILIDADE DE *Polybia platycephala* (HYMENOPTERA: VESPIDAE) AO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana***

**ABSTRACT.** Biopesticides in biological control can affect natural enemies. The pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* Vuillemin on *Polybia platycephala* (Richards) (Hymenoptera: Vespidae) was evaluated. Newly emerged females of this wasp were treated with a one  $\mu$ l of the biopesticide Boveril® WP suspension (*B. bassiana*, isolated ESALQ PL 63). The control received one  $\mu$ l of distilled water. All treatments contained Tween 80® (0.01%). The fungus *B. bassiana*, at all concentrations tested, decreased the lifetime, increased the number of plasmatocytes and reduced the granulocytes number of *P. platycephala*.

**KEYWORDS:** haemocytes, predator, social wasps.

**RESUMO.** Biopesticidas no controle biológico podem afetar inimigos naturais. A patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana* Vuillemin sobre *Polybia platycephala* (Richards) (Hymenoptera: Vespidae) foi avaliada. Fêmeas recém emergidas dessa vespa foram tratadas com um µl de suspensão do biopesticida Boveril® WP e espalhante adesivo Tween 80® a 0,01% (*B. bassiana*, isolado ESALQ PL 63). O controle recebeu um µl de água destilada e espalhante adesivo Tween 80® a 0,01%. O fungo *B. bassiana*, em todas as concentrações testadas, diminuiu a sobrevivência e aumentou o número de granulócitos de *P. platycephala*.

**PALAVRAS-CHAVES:** hemócitos, predador, vespas sociais.

## INTRODUÇÃO

Entomopatógenos são inimigos naturais de artrópodes e podem reduzir a necessidade de uso de produtos químicos (Valicente e Mourão 2008, Vega et al. 2009, Pardo-López et al. 2012). O fungo *Beauveria bassiana* Vuillemin infecta pragas agrícolas (Shapiro-Ilan et al. 2013) e, também, hospedeiros não alvo (Vergel et al. 2011, Garrido-Jurado et al. 2011).

Fungos entomopatogênicos podem estar presentes em ninhos de vespas sociais, principalmente, pela manipulação de presas infectadas (Harris et al. 2000). Insetos predadores também podem ser infectados no momento da aplicação no campo ou pelo contato com esporos de fungos sobre as folhas (França et al. 2006).

A família Vespidae inclui as subfamílias de vespas sociais Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae (Carpenter 2003). Esses insetos são predadores generalistas (Richter 2000) e, uma vez introduzidos, se multiplicam e disseminam no ambiente, favorecendo o controle biológico (Prezoto e Machado 1999, Andrade e Prezoto 2001, Elpino-Campos et al. 2007). Vespas sociais fundam seus ninhos em muitos agroecossistemas com alta diversidade de presas (Clouse, 2001, Auad et al. 2012, De Souza et al. 2012), onde inseticidas podem reduzir suas populações (Bommarco et al. 2011).

O gênero *Polybia* (Hymenoptera: Vespidae) se alimenta de herbívoros invertebrados (Wyckhuys e O'Neil 2006, Picanço et al. 2011, Pereira et al. 2007). *Polybia platycephala* Richards é uma vespa de fundação enxameante (Somavilla et al. 2012) e com ocorrência na América do Sul (Prezoto et al. 2005, Rodríguez et al. 2012). A importância dessa espécie para o controle biológico é, ainda, pouco conhecida (Prezoto et al. 2005, De Souza et al. 2012) em razão de seus ninhos serem cobertos por um envelope protetor que dificulta o estudo da sua biologia, ecologia e comportamento (Prezoto et al. 2005). A tolerância e a dinâmica do sistema imune de vespas sociais à

entomopatógenos precisam ser conhecidos para a conservação destas espécies e o equilíbrio biológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do biopesticida Boveril® WP (isolado ESALQ PL 63) na sobrevivência e na resposta imune celular de *Polybia platycephala* (Hymenoptera, Vespidae) em laboratório.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Local e condição do experimento.** A pesquisa foi realizada no Laboratório de Controle Biológico de Insetos (LCBI) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil. Os onze ninhos de *P. platycephala* foram coletados no campus da Universidade Federal de Viçosa. Pupas e larvas dessa vespa nos favos foram mantidas em estufa climatizada (B.O.D.) a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  de UR e 12 horas de fotofase e seus adultos removidos e descartados.

**Sobrevivência.** Suspensões com o bioinseticida Boveril® WP (*B. bassiana*, isolado ESALQ PL 63) em água destilada e Tween 80® a 0,01%, nas concentrações  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  esporos/mL foram preparadas. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (quatro concentrações do fungo e o controle) e cinco repetições. Cada repetição teve cinco fêmeas adultas de *P. platycephala*, totalizando 25 indivíduos por tratamento. A mortalidade das vespas foi observada por 10 dias. Os insetos mortos foram incubados em B.O.D. a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  de UR e 12 horas de fotofase, para confirmar a esporulação do fungo. Os métodos de inoculação de esporos foram: (1) tópico: fêmeas recém emergidas de *P. platycephala* foram individualizadas em placas de Petri (9,0 x 1,2 cm) para garantir que todos os indivíduos tivessem a mesma idade. Uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  da suspensão de esporos foi inoculada sobre a superfície ventral do tórax de cada uma (James et al. 2012). As vespas do controle foram inoculadas com

1  $\mu\text{L}$  de água destilada contendo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01% e cada uma recebeu diariamente 1 mL de mel 50%. (2) ingestão: uma solução de 50:50 (v/v) de suspensão de esporos/mel foi preparada por concentração de *B. bassiana* (Harris et al. 2000). Cada fêmea de *P. platycephala* recém emergida foi individualizada em placas de Petri com 1 mL da solução. O tratamento controle recebeu diariamente 1 mL de mel 50%.

**Resposta imune celular.** Uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  da suspensão de esporos de *B. bassiana* foi inoculada sobre a superfície ventral do tórax de *P. platycephala* e posteriormente esses indivíduos foram individualizados em placas de Petri (9,0 x 1,2 cm). O bioinseticida Boveril<sup>®</sup> WP (*B. bassiana*, isolado ESALQ PL 63) foi diluído em água destilada e Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%, nas concentrações  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  esporos/mL. Vinte fêmeas adultas dessa vespa, por tratamento, foram expostas ao fungo durante 24, 48 e 72 horas. Após esse período, foram limpas em álcool 70% por cinco segundos para a coleta da hemolinfa.

A coleta de 1  $\mu\text{L}$  de hemolinfa foi realizada com micropipeta em incisão no tórax de *P. platycephala* após a retirada da cabeça e transferido para 9  $\mu\text{L}$  de solução anticoagulante (98 mM de NaOH, 186 mM de NaCl, 17mM de Na<sub>2</sub>EDTA e 41mM de ácido cítrico, pH 4,5) para evitar a agregação dos hemócitos (Ibrahim e Kim, 2006). As amostras de hemolinfa foram coradas com 3  $\mu\text{L}$  Giemsa e o total de granulócitos, plasmatócitos e prohemócitos quantificados (Ribeiro e Brehélin 2006, Avulova e Rosengaus 2011) em microscópio de luz (objetiva de 40x) com câmara de Neubauer.

**Análise Estatística.** As curvas de sobrevivência das fêmeas adultas de *P. platycephala* foram geradas pelo método Kaplan-Meier e comparadas pelo teste Log-Rank a 5% de probabilidade. A contagem de granulócitos, plasmatócitos e prohemócitos, nas diferentes concentrações do fungo e intervalos de tempo, foi submetida à análise de variância do tipo fatorial 4x3, considerando os tratamentos (controle, *B. bassiana* nas concentrações  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  esporos/mL) e três intervalos de

tempo (24, 48, e 72h). A contribuição independente de cada variável na densidade hemocitária e as interações potenciais entre as variáveis foram analisadas. Após teste de normalidade, os dados foram transformados em log 10. As médias foram avaliadas pelo teste de Tukey a  $p < 0.05$  (LSMEANS) para múltiplas comparações, utilizando PROC GLM (fatorial ANOVA).

## RESULTADOS

A sobrevivência de *P. platycephala*, exposta topicamente a *B. bassiana* nas concentrações  $1 \times 10^6$  ( $\chi^2=23,71$ ;  $p < 0,001$ ),  $1 \times 10^7$  ( $\chi^2=29,52$ ;  $p < 0,001$ ),  $1 \times 10^8$  ( $\chi^2=33,93$ ;  $p < 0,001$ ) e  $1 \times 10^9$  esporos/mL ( $\chi^2=49,98$ ;  $p < 0,001$ ), foi menor que no controle (Figura 1A). As fêmeas adultas de *P. platycephala* tiveram menor sobrevivência com dieta contendo *B. bassiana* na concentração de  $1 \times 10^9$  esporos/mL ( $\chi^2=43,90$ ;  $p < 0,001$ ), que nos demais tratamentos (Figura 1B).

O número de prohemócitos de *P. platycephala* apresentaram média maior no controle que nos tratamentos com *B. bassiana* ( $F=39.80$ ,  $p < 0.0001$ ), com redução mais acentuada na concentração  $1 \times 10^9$  esporos/mL (Figura 2).

O número de granulócitos de *P. platycephala* foi menor após exposição ao fungo *B. bassiana* ( $F=12.76$ ,  $p < 0.0001$ ) nos diferentes tempos de exposição ( $F = 33.82$ ,  $p < 0.0001$ ). A quantidade destas células foi menor após 24 horas de tratamento com *B. bassiana* a  $1 \times 10^9$  esporos/mL (Figura 2). No período de 72 horas de exposição, número de granulócitos foi maior que o controle em todas as concentrações de *B. bassiana* ( $p < 0.05$ ). O número de plasmatócitos de *P. platycephala* no controle foi menor que nos tratamentos com *B. bassiana* ( $F=9.70$ ,  $p < 0.0001$ ). No período de 48 horas, o número de plasmatócitos com *B. bassiana* a  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  esporos/mL foi maior que o controle ( $F=4.72$ ,  $p=0.01$ ). *Beauveria bassiana* não afetou o número total de células circulantes na hemolinfa de *P. platycephala* (Figura 2).

## DISCUSSÃO

A menor sobrevivência de fêmeas adultas de *P. platycephala* após tratamento tópico com *B. bassiana* concorda com o fato de vespas serem susceptíveis a este fungo, embora com poucos registros de ocorrência em colônias desses insetos (Rose et al. 1999, Madden et al. 2012). Microrganismos patogênicos de insetos, como *B. bassiana*, produzem enzimas, incluindo proteases, quitinases, esterases e de assimilação de hidrocarbonetos para decompor a cutícula (Pedrini et al. 2013, Ying et al. 2014) e infectar os hospedeiros (Zimmermann 2007, Pathan et al. 2007). Resultados semelhantes foram relatados para *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae), *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) e *Metamasius spinolae* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae) (Lohmeyer e Miller 2006, Godonou et al. 2009, Orduño-Cruz et al. 2011).

A infecção por ingestão de *B. bassiana* na dieta com  $1 \times 10^9$  esporos/mL indica que uma concentração elevada desse patógeno favoreceu a colonização no trato digestório de *P. platycephala*. Substâncias produzidas por *B. bassiana* são semelhantes a toxinas bacterianas, sugerindo o potencial para toxicidade oral deste fungo (Xiao et al. 2012). No entanto, a germinação de, apenas, 37% de esporos de *B. bassiana* no intestino de *Solenopsis richteri* (Hymenoptera: Formicidae) (Broome et al. 1976) mostra baixa virulência desse fungo por essa via de infecção. Moléculas antifúngicas (Chouvenc et al. 2009), a flora microbiana (Dillon e Charnley 1986) e o pH (Broome et al. 1976) podem diminuir a capacidade de penetração dos esporos no intestino dos insetos.

Modificações na densidade de prohemócitos, granulócitos e plasmatócitos de *P. platycephala* podem refletir a susceptibilidade deste predador aos metabólitos tóxicos liberados por *B. bassiana* (Quesada-Moraga e Vey 2004, Zibae et al. 2011). Esse fungo pode invadir a hemocele e produzir uma massa de blastosporos que proliferam e liberam substâncias tóxicas nos tecidos internos, destruindo os mecanismos de defesa celular do

hospedeiro (Xiong et al. 2013). Além disso, *B. bassiana* pode limitar o reconhecimento pelos hemócitos com hifas mascaradas por paredes celulares modificados que impedem a detecção do invasor (Quesada-Moraga e Vey 2004, Wojda et al. 2009, Zibae et al. 2011).

O menor número de prohemócitos na hemolinfa de *P. platycephala* indica a diferenciação destas células em plasmatócitos e/ou granulócitos para atuarem na resposta imune dessa vespa. Prohemócitos podem dar origem a todos os outros tipos de hemócitos que circulam na hemolinfa dos insetos (Gupta 1985, Nakahara et al. 2010, Grigorian e Hartenstein 2013). Este processo de diferenciação celular contribui para a defesa contra microrganismos patogênicos, pois diferentes hemócitos podem realizar funções variadas como fagocitose, nodulação, encapsulação e melanização (Borges et al. 2008, Rodrigues et al. 2010, Zibae et al. 2011).

A menor densidade de granulócitos em *P. platycephala* após 24 horas confirma o recrutamento destas células em vespas expostas a altas concentrações de *B. bassiana*. A diminuição do número de hemócitos está relacionada com a formação de nódulos quando hifas de fungos penetram na cutícula do hospedeiro (Chouvenec et al. 2009), o que poderia explicar as menores densidades de granulócitos em *P. platycephala* exposta ao fungo *B. bassiana*.

A elevada densidade de plasmatócitos e granulócitos após 72 horas em vespas expostas a *B. bassiana* indica reconhecimento do fungo pelo sistema imune, pois receptores na membrana de hemócitos induzem a regulação e liberação das células de defesa na hemolinfa (Strand 2008). Contudo, o maior número de plasmatócitos e granulócitos evidencia a incapacidade destas células em fagocitar ou encapsular *B. bassiana*. Esse fungo pode produzir toxinas que inibem o encapsulamento e a atividade fagocitária dos hemócitos como relatado para *Galleria mellonella* Fabricius (Lepidoptera) e *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera) (Fuguet e Vey 2004, Zibae et al. 2011).

et al. 2011). Reações imunológicas causam a agregação e morte de células de defesa com a diminuição de sua densidade na hemolinfa dos insetos (Avulova e Rosengaus 2011, Wieloch et al. 2011). Isto não foi observado para *P. platycephala*, provavelmente devido ao mecanismo de imunossupressão de *B. bassiana* que pode ter impedido seus hemócitos de encapsular as hifas fúngicas (Quesada-Moraga e Vey 2004, Zibae et al. 2011).

O fungo *B. bassiana* (isolado ESALQ PL 63) não é compatível com *P. platycephala*. Esse fungo reduziu a sobrevivência e suprimiu a resposta imunológica dessa vespa predadora, especialmente em concentrações de  $1 \times 10^9$  esporos/mL. A característica generalista de *B. bassiana* mostra a necessidade de utilização desse fungo com critério para preservar o controle exercido por vespas predadoras.

### 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)”.

### REFERÊNCIAS

- Andrade, F. R., and Prezoto, F. 2001.** Horários de atividade forrageadora e material coletado por *Polistes ferreri* Saussure, 1853 (Hymenoptera, Vespidae), nas diferentes fases de seu ciclo biológico. *Rev. Bras. Zooc.* 3: 117-128.
- Auad, A. M., Resende, T. T., Silva, D. M., and Fonseca, M. G. 2012.** Hymenoptera (Insecta: Hymenoptera) associated with silvopastoral systems. *Agroforest. Syst.* 85: 113-119.
- Avulova, S., and Rosengaus, R. B. 2011.** Losing the battle against fungal infection: suppression of termite immune defenses during mycosis. *J. Insect Physiol.* 57: 966-971.

- Bommarco, R., Miranda, F., Bylund, H., and Björkman, C. 2011.** Insecticides suppress natural enemies and increase pest damage in cabbage. *J. Econ. Entomol.* 104: 782-791.
- Broome, J. R., Sikorowski, P. P., and Norment, B. R. 1976.** A mechanism of pathogenicity of *Beauveria bassiana* on larvae of the imported fire ant, *Solenopsis richteri*. *J. Invertebr. Pathol.* 28: 87-91.
- Borges, A. R., Santos, P. N., Furtado, A. F., and Figueiredo, R. C. B. Q. 2008.** Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Micron* 39: 486-494.
- Carpenter, J. . 2003.** On “Molecular phylogeny of Vespidae (Hymenoptera) and the evolution of sociality in wasps”. *Am. Mus. Novit.* 3389: 1-20.
- Chouvenc, T., SU, N. Y., and Robert, A. 2009.** Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 101: 234-241.
- Clouse, R. 2001.** Some effects of group size on the output of beginning nests of *Mischocyttarus mexicanus* (Hymenoptera: Vespidae). *Florida Entomol.* 84: 418-425.
- De Souza, A. D., Venâncio, D. F. A, Prezoto, F., and Zanuncio, J. C. 2012.** Social wasps (Hymenoptera: Vespidae) nesting in eucalyptus plantations in Minas Gerais, Brazil. *Florida Entomol.* 95: 1000-1002.
- Dillon, R. J., and Charnley, A. K. 1986.** Inhibition of *Metarhizium anisopliae* by the gut bacterial flora of the desert locust *Schistocerca gregaria*: Evidence for an antifungal toxin. *J. Invertebr. Pathol.* 47: 350-360.
- Elpino-Campos, A., Del-Claro, K., and Prezoto, F. 2007.** Diversity of social wasps (Hymenoptera: Vespidae) in cerrado fragments of Uberlândia, Minas Gerais state, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 36: 685-692.
- França, I. W. B., Marques, E. J., Torres, J. B., and Oliveira, J. V. 2006.** Efeitos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o

percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). Neotrop. Entomol. 35: 349-356.

**Fuguet, R., and Vey, A. 2004.** Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp.: in vivo studies. J. Invertebr. Pathol. 85, 152-167.

**Garrido-Jurado, I., Ruano, F., Campos, M., and Quesada-Moraga, E. 2011.** Effects of soil treatments with entomopathogenic fungi on soil dwelling non-target arthropods at a commercial olive orchard. Biol Control 59: 239-244.

**Godonou, I., James, B., Atcha-Ahowé, C., Vodouhè, S., Kooyman, C., Ahanchédé, A., Korie, S. 2009.** Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L.(Lepidoptera: Plutellidae). Crop Prot. 28: 220-224.

**Grigorian, M., and Hartenstein, V. 2013.** Hematopoiesis and hematopoietic organs in arthropods. Dev. Genes Evol. 223: 103-115.

**Gupta, A.P. 1985.** Cellular elements in the hemolymph. Comprehensive insect physiology. Biochem. Pharmacol. 3: 401-451.

**Harris, R. J., Harcourt, S. J., Glare, T. R., Rose, E. A. F., and Nelson, T. J. 2000.** Susceptibility of *Vespula vulgaris* (Hymenoptera: Vespidae) to generalist entomopathogenic fungi and their potential for wasp control. J. Invertebr. Pathol. 75: 251-258.

**Ibrahim, A., and Kim, Y. 2006.** Parasitism by *Cotesia plutellae* alters the hemocyte population and immunological function of the diamondback moth *Plutella xylostella*. J. Insect. Physiol. 52: 943-950.

**James, R. R., Mcguire, M. R., and Leland, J. E. 2012.** Susceptibility of adult alfalfa leafcutting bees<sup>1</sup> and honey bees<sup>2</sup> to a microbial control agent, *Beauveria bassiana*. Southwest Entomol. 37: 13-21

- Lohmeyer, K. H., and Miller, J. A. 2006.** Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 99: 1943-1947.
- Madden, A. A., Stchigel, A. M., Guarro, J., Sutton, D. A., and Starks, P. T. 2012.** *Mucor nidicola* sp. nov., a novel fungal species isolated from an invasive paper wasp nest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 1710-1714.
- Nakahara, Y., Kanamori, Y., Kiuchi, M., and Kamimura, M. 2010.** Two hemocyte lineages exist in silkworm larval hematopoietic organ. *PLoS ONE* 5: e11816.
- Orduño-Cruz, N., Guzmán-Franco, A. W., Rodríguez-Leyva, E., López-Collado, J., Valdéz-Carrasco, J. M., and Mora-Aguilera, G. 2011.** Susceptibility of the cactus weevil *Metamasius spinolae* to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* under laboratory and field conditions. *J. Appl. Microbiol.* 111: 939-948.
- Pardo-López, L., Soberón, M., and Bravo, A. 2012.** *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 1574-6976.
- Pathan, A. A. K., Uma Devi, K., Vogel, H., and Reineke, A. 2007.** Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. *Fungal Genet. Biol.* 44: 1231-1241.
- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonnet, C., Zhang, S., and Keyhani, N. O. 2013.** Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Front. Microbiol.* 4: 24
- Pereira, E. J. G., Picanço, M. C., Bacci, L., Crespo, A. L. B., and Guedes, R. N. C. 2007.** Seasonal mortality factors of the coffee leafminer, *Leucoptera coffeella*. *Bull. Entomol. Res.* 97: 421-432.

- Picanço, M. C., Bacci, L., Queiroz, R. B., Silva, G. A., Miranda, M. M. M., Leite, G. L. D., and Suinaga, F. A. 2011.** Social wasp predators of *Tuta absoluta*. *Sociobiology* 58: 621-633.
- Prezoto, F., Lima, M. A. P., and Machado, V. L. L. 2005.** Survey of preys captured and used by *Polybia platycephala* (Richards) (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini). *Neotrop. Entomol.* 34: 849-851.
- Prezoto, F., and Machado, V. L. L. 1999.** Ação de *Polistes* (*Aphanilopterus*) *simillimus* Zikán (Hymenoptera, Vespidae) no controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). *Rev. Bras. Zool.* 16: 841-850.
- Quesada-Moraga, E., and Vey, A. 2004.** Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.* 108: 441-452.
- Ribeiro, C., and Brehélin, M. 2006.** Insect haemocytes: what type of cell is that?. *J. Insect Physiol.* 52: 417-429.
- Richter, M. R. 2000.** Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behavior. *Annu. Ver. Entomol.* 45: 121-150.
- Rodrigues, J., Brayner, F. A., Alves, L. C., Dixit, R., and Barillas-Mury, C. 2010.** Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* 329: 1353-1355.
- Rodríguez, F. A., Barros, L. C., Caroline, P., Serrão, J. E., and Zanuncio, J. C. 2012.** Nidification of *Polybia platycephala* and *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae) on plants of *Musa* spp. in Minas Gerais State, Brazil. *Sociobiology* 59: 457-461.
- Rose, E. A. F., Harris, R. A., Glare, T. R. 1999.** Possible pathogens of social wasps (Hymenoptera: Vespidae) and their potential as biological control agents. *New Zeal. J. Zool.* 26: 179-190.
- Shapiro-Ilan, D. I., Gardner, W. A., Wells, L., Cottrell, T. E., Behle, R. W., and Wood, B. W. 2013.** Effects of entomopathogenic fungus species, and impact of fertilizers, on

biological control of pecan weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environm. Entomol.* 42: 253-261.

**Somavilla, A., Oliveira, M. L. D., and Silveira, O. T. 2012.** Identification guide for nests of social wasps (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae) in reserva Ducke, Manaus, Amazonas, Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* 56: 405-414

**Strand, M. R. 2008.** The insect cellular immune response. *Insect Sci.* 15: 1-14.

**Valicente, F. H., and Mourao, A. H. C. 2008.** Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. *Neotrop. Entomol.* 37: 702-708.

**Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Koike, M., Maniania, M., Monzo'n, A., Ownley, B. H., Pell, J. K., Rangel, D. E. N., and Roy, H.E. 2009.** Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol.* 2:149-159.

**Vergel, S. J. N., Bustos, R. A., Rodríguez, C. D., and Cantor, R. F. 2011.** Laboratory and greenhouse evaluation of the entomopathogenic fungi and garlic-pepper extract on the predatory mites, *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus* and their effect on the spider mite *Tetranychus urticae*. *Biol Control* 57: 143-149.

**Xiao, G., Ying, S. H., Zheng, P., Wang, Z. L., Zhang, S., Xie, X. Q., Shang, Y., Leger, R. J. St., Zhao, G. P., Wang, C. and Feng, M. G. 2012.** Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci. Rep.* 2: 483.

**Xiong, Q., Xie, Y., Zhu, Y., Xue, J., Li, J., and Fan, R. 2013.** Morphological and ultrastructural characterization of *Carposina sasakii* larvae (Lepidoptera: Carposinidae) infected by *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae). *Micron* 44: 303-311.

**Wieloch, W., Boguś, M. I., Ligęza, M., Koszela-Piotrowska, I., and Szewczyk, A. 2011.** Coronatin-1 isolated from entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* kills

*Galleria mellonella* hemocytes in vitro and forms potassium channels in planar lipid membrane. *Toxicon*. 58: 369-379.

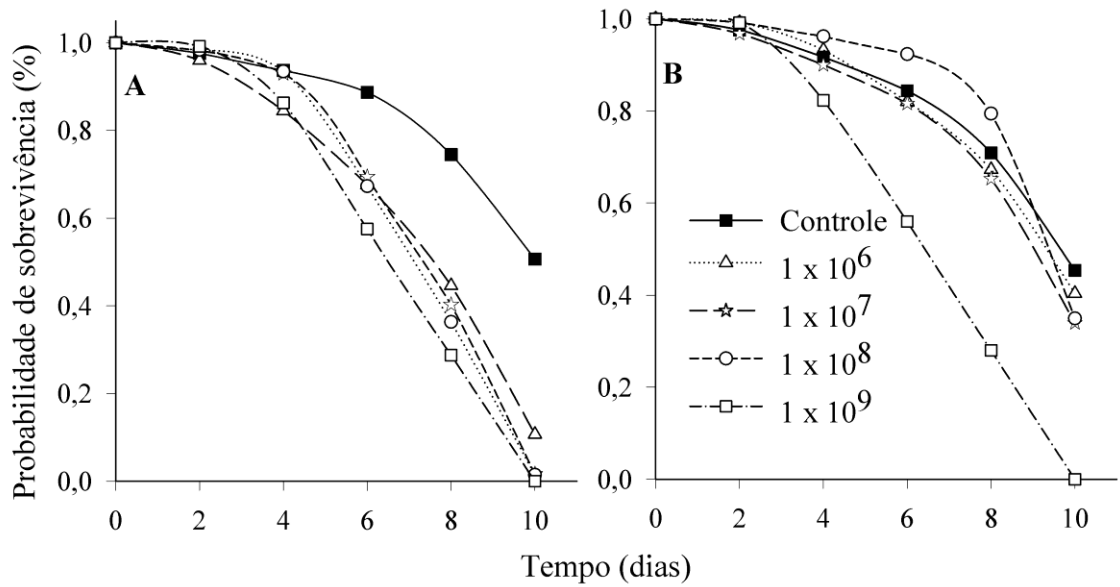
**Wojda, I., Kowalski, P., and Jakubowicz, T. 2009.** Humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae after infection by *Beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions. *J. Insect Physiol.* 55: 525-531.

**Wyckhuys, K. A. G., and O'Neil, R. J. 2006.** Population dynamics of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) and associated arthropod natural enemies in Honduran subsistence maize. *Crop Prot.* 25: 1180-1190.

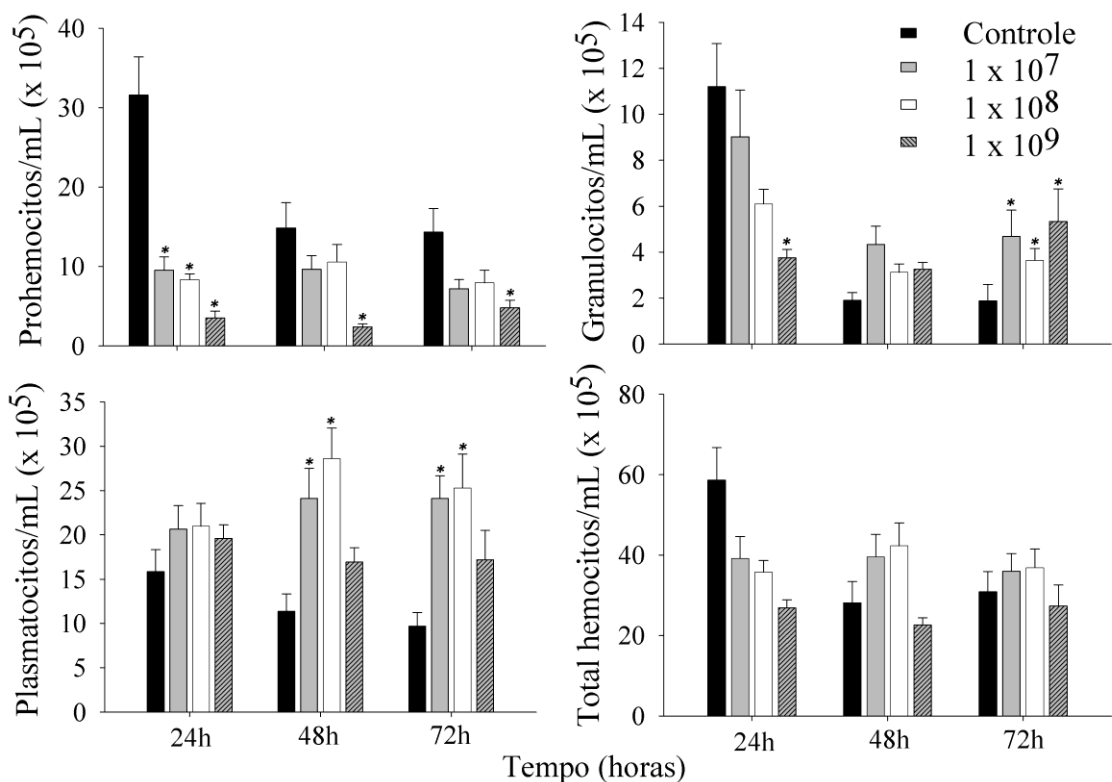
**Ying, S. H., Ji, X. P., Wang, X. X., Feng, M. G., and Keyhani, N. O. 2014.** The transcriptional co-activator multiprotein bridging factor 1 from the fungal insect pathogen, *Beauveria bassiana*, mediates regulation of hyphal morphogenesis, stress tolerance and virulence. *Environ. Microbiol.* 16: 1879-1897.

**Zibae, A., Bandani, A. R., Talaei-Hassanlouei, R., and Malagoli, D. 2011.** Cellular immune reactions of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*, to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and its secondary metabolites. *J. Insect Sci.* 11: 1-16.

**Zimmermann, G. 2007.** Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Technol.* 17: 553-596.



**Figura 1.** Probabilidade de sobrevivência de fêmeas adultas de *Polybia platycephala* (Hymenoptera: Vespidae) expostas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. (A) tratamento tópico e (B) tratamento por ingestão, em diferentes concentrações.



**Figure 2.** Dinâmica hemocitária de fêmeas adultas de *Polybia platycephala* (Hymenoptera: Vespidae) tratadas topicamente com *Beauveria bassiana* em diferentes concentrações ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  conídios/mL) em função do tempo (24, 48, 72 horas). Diferenças significativas entre os tratamentos e o controle são indicados por \* (P < 0,05).

## CONCLUSÕES GERAIS

Os hemócitos de *Polybia platycephala* apresentam o mesmo padrão morfológico daqueles de outros insetos da ordem Hymenoptera, mas com menor tamanho. Quatro tipos de hemócitos estão presentes na hemolinfa desta espécie de vespa social: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides. Prohemócitos possuem núcleo grande e roxo escuro com o citoplasma ocupando uma pequena área em torno do núcleo. Plasmatócitos são altamente polimórficos com pequenos vacúolos claros citoplasmáticos e núcleo esférico ou oval. Granulócitos contém numerosos grânulos no citoplasma e núcleo esférico e central. Oenocitóides possuem núcleo pequeno e citoplasma com pontuações fortemente coradas.

O fungo *M. anisopliae* não reduziu a sobrevivência e a dinâmica hemocitária de *P. platycephala* em baixas concentrações ( $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  esporos/mL) nos tratamentos tópico ou por ingestão. No entanto, o impacto negativo deste fungo nas concentrações  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  esporos/mL nos tratamentos tópicos, indica que o controle biológico de pragas com *M. anisopliae* pode reduzir as populações deste inimigo natural.

O fungo *B. bassiana* foi altamente patogênico para *P. platycephala* em todas as concentrações por contato e nos tratamentos de ingestão com  $1 \times 10^9$  esporos/mL.