

**GILBERTO SANTOS ANDRADE**

**INFLUÊNCIA DOS PARASITÓIDES *Palmistichus elaeisis* E *Trichospilus diatraeae* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) NA IMUNIDADE CELULAR DE *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

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  
2010**

**GILBERTO SANTOS ANDRADE**

**INFLUÊNCIA DOS PARASITÓIDES *Palmistichus elaeisis* E *Trichospilus diatraeae*  
(HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) NA IMUNIDADE CELULAR DE *Anticarsia  
gemmatalis* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

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:** 18 de outubro de 2010.

---

Prof. Carlos Ueira Vieira

---

Prof. Dirceu Pratisoli

(Co-orientador)

---

Prof. Hugo José Gonçalves dos Santos Jr.

---

Prof. Gustavo Ferreira Martins

---

Prof. José Eduardo Serrão

(Orientador)

*“Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei...”*

Almir Sater

**À minha mãe, Ana Maria (*in memoriam*);**

**Ao meu pai, Antonio e minha irmã, Terezinha.**

**À minha namorada, Flávia Alves.**

**À minha sobrinha, Camilinha.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que provê tudo aquilo que necessito.

À minha família, Antonio, Terezinha, Camilinha, Celsinho, Seu Geraldo, Dona Naná, Fabiana, Hélia, Áreo Fabiano, Osvaldo, Heitor, pelos momentos felizes.

À minha namorada, Flávia Alves, pelo amor, carinho, apoio, compreensão, incentivo, generosidade e paciência nos inúmeros finais de semana que dediquei à elaboração desta tese.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Biologia Animal e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de realizar esta pesquisa e pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor José Eduardo Serrão, pela orientação, apoio, incentivo, pelas valiosas correções durante a realização do trabalho e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Professor José Cola Zanuncio, pela contribuição na execução desse trabalho e valiosos ensinamentos profissionais.

Aos Professores Gustavo Ferreira Martins e Carlos Ueira Vieira, pelas valiosas contribuições para a apresentação dos resultados.

A Dhiego Azevedo, Dr. Danival de Souza e Leandro Pin Dalvi, os quais foram fundamentais na adequação metodológica do trabalho.

Aos Professores Dirceu Pratisoli, Hugo José Gonçalves dos Santos Junior e Hugo Bolsoni Zago pelas valiosas contribuições na minha vida profissional e principalmente pela grande amizade.

Ao Dr. José Milton Milagres Pereira, Dra. Terezinha Vinha Zanuncio pelo incentivo durante a passagem pelo Laboratório de Controle Biológico de Insetos da UFV.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Entomologia, em especial Prof. Dr. Ângelo Pallini, pela concessão do uso de equipamentos necessários.

Ao professor Alfredo Alcides Goicochera Huerta, pelos ensinamentos e amizade e exemplo de profissionalismo.

Ao Sr. Moacir do Laboratório de Controle Biológico e Monteiro do Laboratório de Biologia Celular pela amizade.

À Dona Paula e Mirian, secretárias do Programa de Pós-graduação em Entomologia, pela atenção e pelos auxílios nos momentos oportunos, sempre com muita paciência.

Aos amigos do laboratório de controle biológico e de biologia celular pela ajuda durante todo o experimento, pela amizade e pelo agradável convívio.

Aos amigos de república Marcelo, Patrik e Wagner e agregados Fabrício (Montanha), Juliano Molino, Alexandre Caju, que estiveram por perto no dia-a-dia, e tornaram meus momentos em Viçosa mais agradáveis e felizes.

Em especial, agradeço ainda a Alexandre Igor, Gustavo, Glauco, Evaldo Pires, Gibran, Ancidériton, Johan, Úrsula, Geraldinho, Giovani, Robson, Robinho, Rosenilson, Marcus, Fábio, Danilo, pela amizade.

Aos amigos distantes Marcela Campanharo, Priscila Alves, Ulysses, Anderson M. Holtz, Arildisson Nunes Ribeiro e Leonardo Mardgan.

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

## **BIOGRAFIA**

GILBERTO SANTOS ANDRADE, filho de Antonio Caetano de Andrade e Ana Maria dos Santos, nasceu na cidade de Bom Jesus do Itabapoana, Rio de Janeiro, Brasil, no dia 21 de novembro de 1980.

Cursou toda sua vida estudantil na rede pública de ensino.

Em março de 1996, ingressou no curso Técnico em Agropecuária pelo Colégio Técnico Agrícola Ildefonso Bastos Borges, formando em novembro de 1998.

Em março de 2000, ingressou no curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES) em Alegre, Espírito Santo, concluindo-o em outubro de 2004.

Entre março de 2002 a setembro de 2004, durante a graduação, foi estagiário do laboratório de Entomologia do CCA-UFES.

Em março de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia Agrícola no Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em Recife, Pernambuco, defendendo a dissertação em fevereiro de 2007.

Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se á defesa de tese em outubro de 2010.

## **CONTEÚDO**

	Página
RESUMO .....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO.....	1
<b>A imunidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i> pode ser suprimida pelo aumento das densidades de seus parasitóides <i>Palmistichus elaeisis</i> e <i>Trichospilus diatraeae</i>.....</b>	<b>5</b>
RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
INTRODUÇÃO.....	8
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
RESULTADOS .....	13
DISCUSSÃO.....	14
CONCLUSÕES.....	17
<b>Resposta imune de <i>Anticarsia gemmatalis</i> parasitada por <i>Trichospilus diatraeae</i> e <i>Palmistichus elaeisis</i> (Hymenoptera: Eulophidae) com diferentes idades .....</b>	<b>22</b>
RESUMO .....	23
ABSTRACT.....	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
RESULTADOS .....	29
DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÕES.....	34
<b>Efeito da idade de <i>Anticarsia gemmatalis</i> na resposta imune do parasitismo de <i>Palmistichus elaeisis</i> e <i>Trichospilus diatraeae</i> (Hymenoptera: Eulophidae).....</b>	<b>41</b>
RESUMO .....	42

ABSTRACT.....	43
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
RESULTADOS .....	48
DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÕES.....	52
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	57
REFERÊNCIAS .....	59

## RESUMO

ANDRADE, Gilberto Santos Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2010. **Influência dos parasitóides *Palmistichus elaeisis* e *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) na imunidade celular de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Orientador: José Eduardo Serrão. Co-orientadores: José Cola Zanuncio e Dirceu Pratisoli.

Diversas alterações fisiológicas ocorrem em hospedeiros parasitados para favorecer o desenvolvimento de formas imaturas de parasitóides. O objetivo do trabalho foi avaliar a defesa celular de pupas do hospedeiro alternativo, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitadas por *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle ou *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae). Três situações distintas foram utilizadas para avaliar as alterações no sistema imunológico de *A. gemmatalis*: 1) Diferentes densidades de parasitóides/pupa; 2) Diferentes idades dos parasitóides; 3) Diferentes idades do hospedeiro. Na avaliação do efeito da densidade de parasitóides, o número total de hemócitos e a encapsulação foram menores com o aumento do número de parasitóides por pupa, devido ao menor número de granulócitos e de plasmatócitos circulantes na hemolinfa de pupas de *A. gemmatalis*, sendo que pupas parasitadas por *P. elaeisis* apresentaram maior redução de hemócitos que às parasitadas por *T. diatraeae*. Na avaliação do efeito da idade dos parasitóides, o aumento da idade dos parasitóides promoveu a absorção dos ovócitos formados. No entanto, essa absorção não sugeriu uma redução quantitativa e/ou qualitativa de possíveis substâncias presentes no ovário de fêmeas dos parasitóides que poderiam estar envolvidos na supressão da imunidade do hospedeiro. O número total de hemócitos na hemolinfa de *A. gemmatalis* reduziu após o parasitismo por *T. diatraeae* com 24 ou 48 horas de idade. Fato semelhante ocorreu em pupas de *A. gemmatalis* após o parasitismo por *P. elaeisis* com 72 ou 96 horas de idade. O número de granulócitos circulantes em

pupas de *A. gemmatalis* somente reduziu após serem parasitadas por *T. diatraeae* com 24 horas de idade ou por *P. elaeisis* com 72 ou 96 horas de idade. No entanto, o número de plasmatócitos reduziu pelo parasitismo de *T. diatraeae* com 24 ou 48 horas de idade. A maior redução de plasmatócitos ocorreu em pupas parasitadas por *P. elaeisis* com 72 e 96 horas de idade. A encapsulação de *A. gemmatalis* foi semelhante em pupas parasitadas ou não independentemente da idade de *T. diatraeae* ou de *P. elaeisis*. Na avaliação da idade do hospedeiro, pupas com 24 horas parasitadas por *T. diatraeae* tiveram menor número de granulócitos em relação às pupas não parasitadas e menor redução de plasmatócitos também em pupas com essa idade. O número de plasmatócitos em pupas com 48 horas parasitadas por *T. diatraeae* foi menor que às não parasitadas nesta mesma idade. A encapsulação de pupas com 24 horas parasitadas por *P. elaeisis* foi menor somente que às não parasitadas com 48 horas. Por outro lado, pupas parasitadas com 24 horas por *T. diatraeae* tiveram menor encapsulação que pupas parasitadas e não parasitadas com 48 horas. Os resultados indicam que os parasitóides *P. elaeisis* e *T. diatraeae* afetam o número de hemócitos do hospedeiro *A. gemmatalis*. Esses resultados podem contribuir para o melhor entendimento das interações entre parasitóide-hospedeiro, possibilitando otimizar a produção massal de inimigos naturais para o controle de insetos-praga em programas de controle biológico.

## ABSTRACT

ANDRADE, Gilberto Santos Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2010. **Influence of parasitoid *Palmistichus elaeisis* and *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) on cellular immunity of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Advisor: José Eduardo Serrão. Co-advisors: José Cola Zanuncio and Dirceu Pratissoli.

Several physiological changes occur in parasitized hosts to promote the development of immature parasitoids. The objective of this work was to evaluate the cellular defense of the alternative host pupae, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitized by *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle or *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae). Three situations were used to assess changes in the immune system of *A. gemmatalis*: 1) Effect of densities of parasitoid per pupa, 2) Parasitoid age effect on alternative host cellular defense 3) Host age effect on the ability of parasitoids to suppress the host cellular defense. In evaluating the effect of the density of parasitoids, the total number of hemocytes and encapsulation were lower with increasing the number of parasitoids per pupa, due to lower number of circulating plasmatocytes and granulocytes in the hemolymph of *A. gemmatalis* pupae, and parasitized pupae by *P. elaeisis* showed greater reduction of hemocytes than the parasitized by *T. diatraeae*. In evaluating the parasitoid age effect, the increasing parasitoids age promoted the absorption of oocytes formed. However, this absorption did not suggest a quantitatively or qualitatively reduction in possible substances from the ovary of female parasitoids that could be involved in host immune suppression. The total number of hemocytes in the hemolymph of *A. gemmatalis* reduced after parasitism by 24 or 48 hours old *T. diatraeae*. A similar phenomenon occurred in pupae of *A. gemmatalis* after parasitism by 72 or 96 hours old *P. elaeisis*.

The number of circulating granulocytes in *A. gemmatalis* pupae only reduced after being parasitized by 24 hours old *T. diatraeae* or by 72 or 96 hours old *P. elaeisis*. However, the number of plasmatocytes in *A. gemmatalis* pupae reduced with 24 or 48 hours old *T. diatraeae*. The largest reduction occurred in plasmatocytes in pupae parasitized by 72 and 96 hours old *P. elaeisis*. The encapsulation of parasitized or not parasitized *A. gemmatalis* pupae was similar regardless of age of *T. diatraeae* or *P. elaeisis*. In the evaluation of host age, parasitized 24 hours old pupae had fewer granulocytes in relation to unparasitized pupae by *T. diatraeae* and a smaller reduction of plasmatocytes. The number of plasmatocytes in parasitized 48 hours old pupae was lower than those unparasitized by *T. diatraeae*. The encapsulation in 24 hours old pupae after parasitism by *P. elaeisis* was lower only than the unparasitized 48 hours old pupae. Moreover, 24 hours old pupae after parasitism by *T. diatraeae* showed lower encapsulation than parasitized and not parasitized 48 hours old pupae. The results indicate that both species *P. elaeisis* and *T. diatraeae* affect the number of hemocytes from the host *A. gemmatalis*. These results may contribute to understanding the interactions between parasitoid-host, enabling the optimization of mass production of natural enemies to control insect pests in biological control programs.

## INTRODUÇÃO

A restrição do crescimento populacional de insetos é um dos preceitos do manejo integrado de pragas, sendo que controle biológico é preconizado como tática importante para manter pragas abaixo do limiar de dano econômico (Cullen et al., 2008; Jonsson et al., 2008). No entanto, a eficiência do controle de pragas com inimigos naturais varia devido aos fatores bióticos e abióticos (Wang et al., 2009; Andrade et al., 2009).

A identificação de hospedeiros alternativos para criação de inimigos naturais em escala comercial é um dos pontos básicos para liberação massal desses em programas de manejo integrado de pragas. Dentre os inimigos naturais, predadores e parasitóides têm sido avaliados para o controle de pragas agrícolas e florestais (Soares et al., 2009; Holtz et al., 2010; Andrade et al., 2010). O sucesso de parasitóides implica na compatibilidade com seus hospedeiros (Strand e Pech, 1995; Strand, 2008). Além da produção massal, hospedeiros alternativos permitem compreender a habilidade do inimigo natural em controlar a população de pragas (Pratissoli et al., 2005; Soares et al., 2007).

O uso e o sucesso reprodutivo de inimigos naturais estão relacionados à capacidade de reconhecer hospedeiros potenciais e de controlar aspectos fisiológicos para seu desenvolvimento como tática de controle biológico de pragas (Bae & Kim, 2004).

Parasitóides, especialmente os Hymenoptera, regulam populações de diferentes insetos-praga (Pennacchio & Strand, 2006). A interação Hymenoptera parasitóides com seus hospedeiros ocorre por diversas alterações fisiológicas para o desenvolvimento adequado de sua prole (Strand & Pech, 1995; Richard & Edwards, 2000; Beckage & Gelman, 2004). No entanto, isso depende da capacidade do hospedeiro em atender exigências nutricionais do parasitóide e a habilidade desse inimigo natural de evitar o

sistema imunológico do hospedeiro, pois a reação contra o parasitismo é determinada por fatores genéticos, pela capacidade inata do hospedeiro de reagir contra a invasão e pela história de vida do parasitóide (Strand & Pech, 1995; Abdel-Latief & Hilker, 2007; Yamamoto et al., 2007).

Hospedeiros possuem defesas contra parasitóides e patógenos por reações celulares e humorais (Narayanan, 2004; Reed et al., 2007). Os hemócitos são células circulantes na hemolinfa dos insetos responsáveis pela defesa seja por fagocitose, formação de nódulos e encapsulação, como pela produção de moléculas como peptídeos, intermediários reativos de oxigênio ou nitrogênio e aqueles envolvidos no processo de melanização (Ribeiro & Brehélin, 2006; Carton et al., 2008; Hegazi & Khafagi, 2008). Esses compostos da defesa humoral modificam a estrutura de células provocando sua destruição ou distúrbios funcionais (Ribeiro & Brehélin, 2006; Carton et al., 2008; Cerenius et al., 2008). Por outro lado, a divisão da resposta imunológica em celular e humoral é utilizada, apenas, para se entender o processo bioquímico de defesa imunológica dos insetos, pois ambos os eventos são interligados uma vez que fatores humorais podem ser produzidos por hemócitos e as funções celulares podem ser desencadeadas por moléculas do sistema humoral (Lavine & Strand, 2002; Strand, 2008; Schmidt et al., 2008).

Parasitóides desenvolveram diferentes estratégias para aproveitar os recursos nutricionais do hospedeiro, permitindo o desenvolvimento destes até a fase adulta ou bloqueando o desenvolvimento de seus hospedeiros no momento do parasitismo (Li & Mills 2004; Zang et al., 2004; Kaeslin et al., 2005; Imbrahin & Kim, 2006). No segundo modelo, o parasitismo pode ser associado com polydnavirus, cuja transcrição no hospedeiro favorece as formas imaturas do parasitóide (Pfister-Wilhelm & Lanzrein, 2009). Além disso, substâncias produzidas no ovário de parasitóides podem bloquear a

defesa, provocar a morte ou paralisia do hospedeiro ou proteger os ovos contra o sistema imune (Li et al., 2007). Células ao redor do embrião de algumas espécies de parasitóides se dispersam na hemolinfa e aumentam de tamanho, modificando a fisiologia dos hospedeiros e favorecendo os embriões (Firlej et al., 2007; Falabella et al., 2009). O parasitismo pode também provocar alterações nos títulos de hormônio juvenil, ecdisteróides e neuropeptídeos no hospedeiro (Strand & Pech, 1995).

O parasitóide pode provocar uma resposta imediata do hospedeiro, principalmente pela produção de hemócitos que atuam na encapsulação (CARTON et al., 2008). Essas células são responsáveis pelo reconhecimento de invasores e podem ser conhecidas por sua morfologia (Lavine & Strand, 2002; Theopold et al., 2004; Ribeiro & Brehélin, 2006), sendo que granulócitos e plasmatócitos possuem um papel-chave na imunidade de espécies de lepidópteros (Lavine & Strand, 2002).

Microesferas de sephadex ou filamentos de náilon têm sido utilizadas como indicativo de encapsulação em insetos *in vivo* (Renault et al., 2002) pela relação entre a capacidade de encapsulação de materiais abióticos e habilidade de reconhecer e encapsular organismos invasores (Renault et al., 2002; Rantala & Roff., 2007). Por outro lado, a utilização de microfilamentos de náilon é o mais apropriado para pupas, pois não exige a injeção de líquido no organismo em avaliação e provoca menor dano ao invólucro pupal (Renault et al., 2002), assim como para insetos com a cutícula mais rígida (Vainikka et al., 2007, Rantala et al., 2010).

*Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) parasita pupas de lepidópteros e de coleópteros (Pereira et al., 2005; Zanuncio et al., 2008), enquanto *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae), também, apresenta hábito polífago e desenvolvimento satisfatório em pupas de lepidópteros (Paron & Berti-Filho, 2000; Pereira et al., 2008). Pesquisas básicas têm

sido conduzidas com esses inimigos naturais para o controle de pragas de culturas agrícolas e florestais (Zanuncio et al., 2008; Pereira et al., 2008, Pereira et al., 2009; Soares et al., 2009; Pereira et al., 2010).

A adequação da densidade de parasitóides por hospedeiro é utilizada para equilibrar o número e qualidade de parasitóides produzidos, o que é atribuído aos recursos nutricionais para o desenvolvimento dos mesmos (Pereira et al., 2010). Quantidades de parasitóides acima do suportado pelo hospedeiro podem reduzir rapidamente os recursos nutricionais, devido ao superparasitismo e baixas, podem favorecer a defesa do hospedeiro (Strand & Pech 1995).

Apesar de *P. elaeisis* e *T. diatraeae* serem parasitóides de pupas, o sucesso de parasitismo tem sido estágio dependente, pois esses parasitóides possuem melhor taxa de parasitismo e desenvolvimento em pupas jovens. Isso pode ser devido à maior capacidade de defesa celular e encapsulação do hospedeiro com o avanço do desenvolvimento (Hegazi & Khafagi, 2008).

## **OBJETIVOS**

Este estudo avaliou as alterações no número de hemócitos circulantes na hemolinfa e a taxa de encapsulação de pupas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) parasitadas por *P. elaeisis* ou *T. diatraeae* em diferentes densidades e idades desses parasitóides e hospedeiro alternativo, contribuindo para a compreensão das estratégias utilizadas por esses parasitóides para suprimir a defesa celular do hospedeiro alternativo. Além disso, a absorção dos ovos do parasitóide com o envelhecimento também foi avaliada, para compreender a implicação desse fator na interação com seu hospedeiro.

## CAPÍTULO 1

**A imunidade de *Anticarsia gemmatalis* pode ser suprimida pelo aumento das densidades de seus parasitóides *Palmistichus elaeisis* e *Trichospilus diatraeae***

**RESUMO** – Interações dos parasitóides *Palmistichus elaeisis* e *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) com seu hospedeiro alternativo *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) podem afetar o sucesso ou o fracasso da produção em massal desses parasitóides para uso em programas de manejo de pragas integrado. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações na defesa celular e capacidade de encapsulação de pupas de *A. gemmatalis* contra *P. elaeisis* ou *T. diatraeae* em densidades de adultos do parasitóide de um, três, cinco, sete, nove, 11 ou 13 parasitóides/pupa. O aumento da densidade do parasitóide reduziu o número total de hemócitos na hemolinfa e a taxa de encapsulação de pupas parasitadas. Densidades de *P. elaeisis* acima de cinco parasitóides/pupa causou a maior redução no número total de hemócitos. A taxa de encapsulação foi menor com o aumento da densidade dos parasitóides. No entanto, ambas as espécies de parasitóides induziram respostas semelhantes. A redução da capacidade de defesa de *A. gemmatalis* está relacionada com o ajuste da densidade dos parasitóides para o seu desenvolvimento neste hospedeiro. Assim, a importância da densidade de *P. elaeisis* ou *T. diatraeae* por pupa é devido a supressão induzida das defesas celulares e encapsulamento do hospedeiro. Esses resultados podem prever o sucesso de *P. elaeisis* e *T. diatraeae* no controle de pragas pelo uso da imunologia como ferramenta de avaliação dos inimigos naturais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Parasitóides de pupa, biologia celular, imunidade de insetos, hospedeiro alternativo, controle biológico.

ABSTRACT – Interactions of the parasitoids *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle and *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) with its alternative host *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) affect the success or failure of the mass production of these parasitoids for use in integrated pest management programs. The aim of this study was to evaluate changes in the cellular defense and encapsulation ability of *A. gemmatalis* pupae against *P. elaeisis* or *T. diatraeae* in adult parasitoid densities of 1, 3, 5, 7, 9, 11 or 13 parasitoids/pupae. We evaluated the total quantity of circulating hemocytes and the encapsulation rate *versus* density. Increasing parasitoid density reduced the total number of hemocytes in the hemolymph and the encapsulation rate by parasitized pupae. Furthermore, densities of *P. elaeisis* above 5 parasitoids/pupae caused higher reduction in total hemocyte numbers. The encapsulation rate fell with increasing parasitoid density. However, parasitic invasion by both species induced generally similar responses. The reduction in defensive capacity of *A. gemmatalis* is related to the adjustment of the density of these parasitoids to their development in this host. Thus, the role of the density of *P. elaeisis* or *T. diatraeae* by pupa is induced suppression of cellular defense and encapsulation of the host. These findings can predict the success of *P. elaeisis* and *T. diatraeae* in the control of insect pests through the use of immunology as a tool for evaluation of natural enemies.

**KEYWORDS**- Hemocyte, hemolymph, biological control, insect immunity.

## INTRODUÇÃO

O parasitismo e o desenvolvimento dos parasitóides dependem da capacidade dos hospedeiros em satisfazer as necessidades nutricionais e da habilidade do inimigo natural em superar a resposta imune do hospedeiro (Strand & Pech, 1995; Strand, 2008). Além disso, fatores genéticos e a capacidade inata do hospedeiro para responder à invasão do parasitóide determinam o grau de resistência do hospedeiro ao parasitismo (Strand & Pech, 1995, Abdel-latif & Hilker, 2007; Yamamoto et al., 2007). Portanto, o parasitismo depende do potencial de suprimir as defesas celulares e humorais do hospedeiro (Bae & Kim, 2004).

Os hemócitos são as principais células de defesa dos insetos e se originam durante o desenvolvimento embrionário e na fase imatura, embora a manutenção e diferenciação celular de prohemócitos mantenham a produção dessas células circulantes na hemolinfa nos insetos adultos (Strand, 2008). Receptores nas membranas dos hemócitos são responsáveis pelo reconhecimento dos invasores e as reações celulares subsequentes ao reconhecimento ocorrem por fagocitose, nodulação e encapsulação (Ribeiro & Brehélin, 2006). De maneira geral, os hemócitos são divididos em prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e enocitóides, embora variações dessa classificação possam ser reconhecidas em diferentes insetos (Lavine & Strand, 2002; Theopold et al., 2004; Ribeiro & Brehélin, 2006).

O uso de monofilamentos de náilon ou microinjeções de esferas látex são dois métodos para estimar o encapsulamento de insetos *in vivo* (Renault et al., 2002), porque a capacidade de encapsular o material abiótico está relacionada com a habilidade de encapsular organismos invasores (Rantala & Roff, 2007). O método mais adequado para bioensaios em pupas foi o uso de implantes de monofilamentos de náilon, porque

microinjeções de líquido em pupas com microesferas latex podem danificar a pupa (Renault et al., 2002).

Proteínas e peptídeos, também, sinalizam a invasão organismos invasores ao aderirem e modificarem as propriedades moleculares da membrana ou parede celular dos mesmos (Cheng et al., 2008). Isso leva à produção de moléculas proteolíticas que matam parasitóides, bactérias e fungos por intoxicação (Jiravanichpaisal et al., 2006).

A melanina é o produto final da cascata de reações de profenoloxidase que induz a morte de invasores (Jiravanichpaisal et al., 2006). A melanogênese gera compostos intermediários do oxigênio e nitrogênio que danificam a estrutura de proteínas e DNA, sendo fatal para os organismos invasores. Se o organismo invasor precisa, primeiramente, suprimir essas defesas do hospedeiro para sobreviver e desenvolver (Strand & Pech, 1995, Richard & Edwards, 2000, Beckage & Gelman, 2004; Narayanan, 2004; Reed et al., 2007).

Parasitóides tais como os da família Eulophidae (Hymenoptera) podem ser utilizados para regular populações de pragas (Pennacchio & Strand, 2006; Mendel et al., 2007). No entanto, o êxito do uso de inimigos naturais em programas de manejo integrado de pragas depende de estudos biológicos básicos (Andrade et al., 2009; Pratisoli et al., 2009), pois a produção massal de inimigos naturais depende do desenvolvimento adequado em hospedeiros para obter insetos com qualidade satisfatória (Pratisoli et al., 2005).

*Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) parasita pupas de Bombycidae, Noctuidae, Arctiidae e Tenebrionidae (Zanuncio et al., 2008). *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) parasita pupas de Noctuidae e Crambidae (Paron & Berti Filho, 2000; Pereira et al., 2008). Ambos os parasitóides têm sido estudados para o controle de pragas de culturas

agrícolas e florestais (Zanuncio et al., 2008; Pereira et al., 2008, Pereira et al., 2009; Soares et al., 2009).

O entendimento da resposta imune permite predizer o sucesso de parasitóides em hospedeiros alternativos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a defesa celular de pupas de *A. gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) e sua habilidade de melanizar quando expostas a diferentes densidades de *P. elaeisis* e *T. diatraeae*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Criação do hospedeiro

Ovos de *A. gemmatalis* foram acondicionados em potes plásticos de 1100 mL e, após a eclosão, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial *ad libitum* (Greene et al., 1976) à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 14 horas. Lagartas no final do quinto estágio foram transferidas para potes de 1100 mL com 1/5 de seu volume com areia esterilizada à  $150^\circ\text{C}$  por duas horas, utilizada como local de pupação. As pupas foram transferidas para gaiolas de madeira (30 x 30 x 30 cm) com solução nutritiva para a alimentação dos adultos (10,5 g de mel, 60 g de sacarose, 1,05 g de nipagin e 1,05 g de ácido ascórbico diluídos em 1,05 L de água destilada) embebida em algodão. Posturas deste Lepidoptera foram coletadas em folhas de papel branco dispostas no interior das gaiolas de madeira e transferidas para os potes de criação com a dieta artificial.

### Criação dos parasitóides

*Palmistichus elaeisis* e *T. diatraeae* foram obtidos da criação estoque do Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais nas seguintes condições climáticas:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 14 horas. Seis fêmeas de *P. elaeisis*, 72 h após a

emergência e oito recém-emergidas de *T. diatraeae* receberam uma pupa de *A. gemmatalis* por 24 h em tubos de vidro (14 × 2,2 cm) contendo gotículas de mel para alimentação.

### **Contagem dos hemócitos do hospedeiro**

Quinze pupas de *A. gemmatalis* ( $229,72 \pm 5,12$  mg e 24 h de idade) foram expostas a um, três, cinco, sete, nove, 11 ou 13 parasitóides por 24 horas para testar o efeito da densidade de parasitóides na resposta imune do hospedeiro. Essas pupas foram expostas às fêmeas acasaladas de *P. elaeisis* com 72 h de idade (Pereira et al., 2009) ou recém-emergidas e acasaladas de *T. diatraeae*. Após esse período, essas pupas foram limpas com solução de hipoclorito de sódio a 1% por cinco segundos e lavadas em água destilada. Quatro  $\mu\text{L}$  de hemolinfa das pupas foram coletados com micropipetas a partir de uma pequena incisão no tórax e transferido para 20  $\mu\text{L}$  de solução anticoagulante (98 mM NaOH, 186 mM NaCl, 17 mM Na<sub>2</sub> EDTA e 41 mM de ácido cítrico, pH 4,5), para evitar a agregação dos hemócitos (Ibrahim & Kim, 2006).

As amostras de hemolinfa de *A. gemmatalis* foram coradas com 4  $\mu\text{L}$  de Giemsa e o total de hemócitos, granulócitos, plasmatócitos e outros tipos de hemócitos (Ibrahim & Kim, 2006; Ribeiro & Brehélin, 2006) quantificados em microscópio de luz (objetiva de 40 x) com câmara de Neubauer.

### **Encapsulação**

Filamentos de náilon (2,0 x 0,2 mm) foram esterilizados com solução de hipoclorito de sódio a 1%, lavados em água destilada e implantados em pupas de *A. gemmatalis* (Renault et al., 2002). Vinte pupas foram individualizadas em tubos de vidro (14,0 × 2,2 cm) e expostas a um, três, cinco, sete, nove, 11 ou 13 fêmeas acasaladas de *P. elaeisis* ou *T. diatraeae*, por 24 horas. Pupas não expostas aos

parasitóides foram utilizadas como controle. Os implantes permaneceram inseridos nas pupas por 48 horas e foram removidos, montados em lâminas e observados em microscópio de luz (Renaut et al., 2002).

As imagens dos filamentos de náilon foram digitalizadas com câmera fotográfica Canon PowerShot™ A640 e trabalhadas no programa de computador RemoteCapture Task™ nas seguintes configurações: *white balance: day light; exposure compensation: +1; flash exposure level: zero; metering mode: evaluative; ISSO speed: auto; AE mode: program AE.*

Os valores médios da encapsulação dos filamentos de náilon implantados nas pupas foram obtidos com o programa de processamento de imagens imageJ 1.37v (linguagem de programação java) de domínio público desenvolvido pelo US National Institutes of Health (Barboriak et al., 2005, Souza et al., 2009). O valor médio de absorbância foi adotado como medida da taxa de encapsulação com valores de zero a 255 (Rantala & Kortet, 2004; Souza et al., 2008; Souza et al., 2009). A média da absorbância das amostras foi subtraída de 255 para ajuste do gráfico, assim o maior escurecimento foi assumido como a maior taxa de encapsulação em unidades artificiais (Rantala & Kortet, 2004; Souza et al., 2008; Souza et al., 2009). Os valores arbitrários dos implantes foram ajustados descontando o “background” (Souza et al., 2008; Souza et al., 2009).

### **Análise dos dados**

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado. A comparação da quantidade de hemócitos no hospedeiro alternativo entre as espécies de parasitóides foi realizada por análise não-paramétrica empregando o teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ) na mesma densidade. Os valores dos hemócitos em diferentes densidades de cada parasitóide foi analisada por regressão com os dados plotados usando o programa

SigmaPlot 10.0 ( $p < 0,05$ ). Os valores adimensionais para a taxa de encapsulação foram comparados por análise de regressão ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Resposta imune celular do hospedeiro

Os hemócitos foram classificados em granulócitos, plasmatócitos e outros (prohemócitos, oenocitóides e células vermiformes) (Figura 1).

O aumento da densidade de *P. elaeisis* reduziu o total de hemócitos na hemolinfa de pupas de *A. gemmatalis* ( $F=68,6945$ ;  $P<0,01$ ) com variação de  $117,13 \times 10^4$  e  $45,85 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  entre a menor e maior densidade de parasitóides por pupa, respectivamente (Figura 2). O parasitismo por *T. diatraeae* também reduziu o total de hemócitos na hemolinfa de *A. gemmatalis* de  $116,3 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  para  $72,8 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  na maior e menor densidade desses parasitóides, respectivamente ( $F=49,2905$ ;  $P<0,001$ ). A redução no total de hemócitos circulantes foi maior com o parasitismo de *P. elaeisis* nas densidades de cinco, sete, nove, 11 e 13 ( $P<0,05$ ) (Figura 2).

O número de granulócitos de pupas de *A. gemmatalis* também apresentou redução linear em função das densidades de *P. elaeisis* de  $63,35 \times 10^4$  para  $11,32 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  ( $F=25,2121$ ;  $P<0,01$ ) e de *T. diatraeae* de  $62,77 \times 10^4$  para  $27,65 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  ( $F=55,1502$ ;  $P<0,01$ ) nas menores e maiores densidades de parasitóides, respectivamente (Figura 3). *P. elaeisis* apresentou maior capacidade de reduzir granulócitos circulantes na hemolinfa de *A. gemmatalis* em comparação com *T. diatraeae* nas densidades acima de cinco parasitóides/pupa ( $p<0,05$ ).

A quantidade de plasmatócitos circulantes diminuiu com o aumento da densidade de *P. elaeisis* ( $F=63,3011$ ;  $P< 0,01$ ) e *T. diatraeae* ( $F=19,6201$ ;  $P<0,01$ )

(Figura 4). *P. elaeisis* apresentou maior capacidade para reduzir plasmatócitos circulantes na hemolinfa de *A. gemmatalis* nas densidades de cinco, nove e 13 parasitóides/pupa ( $P < 0,05$ ) e houve uma tendência de estabilizar essa redução a partir de cinco fêmeas por pupa. Por outro lado, *T. diatraeae* mostrou uma redução linear da quantidade de plasmatócitos circulantes na hemolinfa de *A. gemmatalis* (Figura 4).

O aumento da densidade de parasitóides não causou a redução dos outros tipos de células circulantes na hemolinfa de *A. gemmatalis* (Figura 5). A quantidade dessas células foi maior com o parasitismo por *P. elaeisis* que por *T. diatraeae* nas densidades de cinco e sete parasitóides/pupa.

### **Encapsulação**

O aumento da densidade dos parasitóides diminuiu a melanização de 65,24 unidades em pupas não parasitadas para 44,44 e 42,22 unidades nas maiores densidades de *P. elaeisis* e *T. diatraeae*, respectivamente (Figura 6), com deposição de células seguida de escurecimento dos implantes injetados nas pupas de *A. gemmatalis* (Figura 7). A densidade de sete parasitóides/pupa ocasionou maior melanização em pupas parasitadas por *P. elaeisis* comparado a *T. diatraeae* (Figura 6).

## **DISCUSSÃO**

As modificações no total de hemócitos circulantes na hemolinfa e na melanização de pupas de *A. gemmatalis* indicam a influência dos parasitóides na supressão da defesa celular do hospedeiro alternativo, sugerindo que essas mudanças são importantes para permitir que formas imaturas do parasitóide desenvolvam no hospedeiro. Essas estratégias parecem ser também importantes para o parasitismo em pupas de *Acrolepiopsis assectella* (Zeller) (Lepidoptera: Yponomeutidae) (Renault et al., 2002).

A maior redução do número de granulócitos em pupas parasitadas ocorreu com cinco ou mais *P. elaeisis* diferindo de *T. diatraeae*, sugerindo que a defesa do hospedeiro pode variar de acordo com a espécie de parasitóide envolvida. Entretanto, a taxa de encapsulação semelhante para ambos os parasitóides, sugere que há uma relação entre o número de hemócitos, resposta humoral e a influência do parasitóide (Cotter et al., 2004; Hoch et al., 2004).

Modificações no número total de hemócitos circulantes em pupas de *A. gemmatalis* parasitadas por *P. elaeisis* ou *T. diatraeae* foram semelhantes às relatadas em lagartas de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) parasitadas por *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Braconidae) (Ibrahim & Kim, 2006). O endoparasitóide larval polífago *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae) também induziu modificações no número de hemócitos de seu hospedeiro (Suzuki & Tanaka, 2007), indicando que essa é via comum de supressão da imunidade por parasitóides. Os meios pelos quais parasitóides alteram o número de hemócitos circulantes na hemolinfa têm sido discutidos. Braconidae injetam veneno associado à teratócitos (Suzuki & Tanaka, 2007), enquanto Eulophidae injetam veneno durante a oviposição (Uckan et al., 2004). A redução no número de hemócitos circulantes assegura um ambiente favorável ao desenvolvimento de larvas de parasitóides e previne a produção da profenoxidase pelo hospedeiro, formas reativas de oxigênio e nitrogênio e melanina (Pech and Strand 1996; Carton et al. 2008).

Diferenças na supressão da resposta imune pela alteração no número de hemócitos circulantes de *A. gemmatalis* por *P. elaeisis* e *T. diatraeae*, indicam que esses parasitóides podem utilizar estratégias diferentes para suprimir a imunidade do hospedeiro, como aquelas utilizadas por outros parasitóides que induzem a morte dos hemócitos ou modificação de suas propriedades de aderência (Strand & Pech, 1995;

Asgari et al., 1997; Shelby & Webb, 1999; Amaya et al., 2005; Ibrahim & Kim, 2006). Essas diferenças podem ser devido a substâncias tóxicas dos fluidos ovarianos, ricos em proteínas que induzem mudanças nos hemócitos, liberadas pelos parasitóides durante a oviposição (Wu et al., 2008). O aumento na concentração de fluidos injetados durante a oviposição pode induzir modificações fisiológicas em hemócitos do hospedeiro (Nalini et al., 2009), o que pode explicar a diminuição de hemócitos circulantes e a capacidade de encapsulação por pupas de *A. gemmatalis* parasitadas.

A menor melanização dos implantes de náilon pelas pupas de *A. gemmatalis* com as maiores densidades dos parasitóides indicam a importância do aumento do número desses inimigos naturais sobre a redução de hemócitos circulantes, os quais participam do processo inicial de reconhecimento de vasos e desencadeiam as defesas humorais. A maior densidade de parasitóides permite que mais ovos desenvolvam pela menor capacidade do hospedeiro em encapsular todos eles (van Alphen & Visser, 1990). A oviposição de grande número de ovos no mesmo hospedeiro pode suplantar uma alta taxa mortalidade dos estágios imaturos do parasitóide pelo sistema imune do hospedeiro e resultar em maior sucesso reprodutivo de parasitóides gregários quando comparados aos solitários (van Alphen & Visser, 1990). A redução das defesas humorais e celulares de pupas de *A. gemmatalis* parasitadas indica a importância do hábito gregário para o sucesso reprodutivo de *P. elaeisis* e *T. diatraeae*. Isso condiz com uma maior progênie em *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) quando superparasitada por *Oomyzus sokolowskii* (Hymenoptera: Braconidae) (Silva-Torres et al., 2009). Nesse caso, o sistema imune dos hospedeiros é o principal fator de mortalidade da fase imatura do parasitóide e o grau da encapsulação tem forte implicação no sucesso reprodutivo desses inimigos naturais (Lavine & Strand, 2002; Carton et al., 2008; Tena et al., 2008). Por outro lado, o aumento da competição por

recursos nutricionais do hospedeiro superparasitado pode reduzir a qualidade de parasitóides e mostra a importância da densidade de parasitóides por hospedeiro (Pereira et al., 2004; Moreira et al., 2009).

## CONCLUSÕES

Fêmeas dos parasitóides *P. elaeisis* e *T. diatraeae* reduziram a resposta imune do hospedeiro alternativo, *A. gemmatalis*, por redução do número de hemócitos circulantes no hospedeiro através do aumento do número de parasitóides.

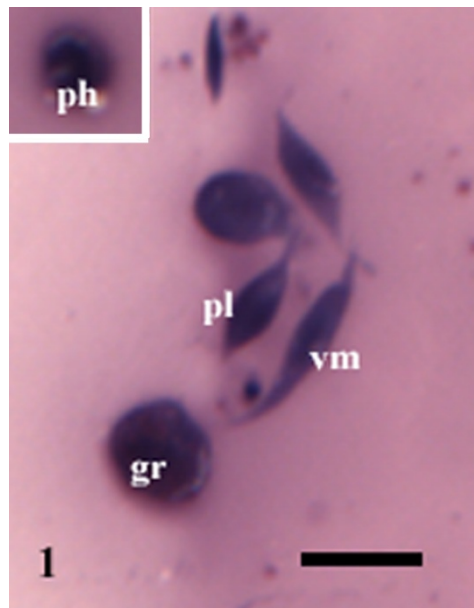
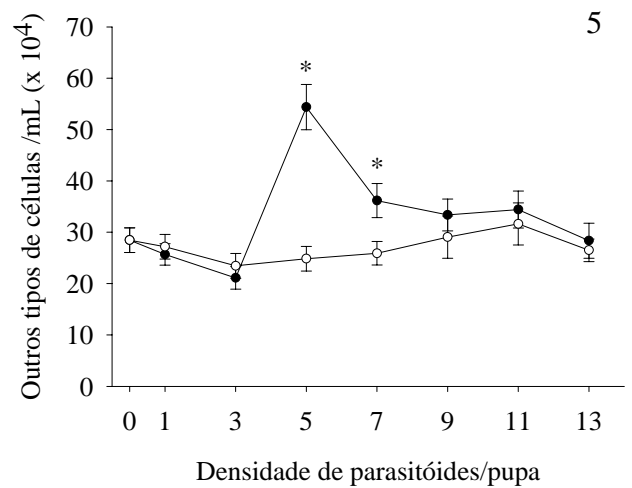
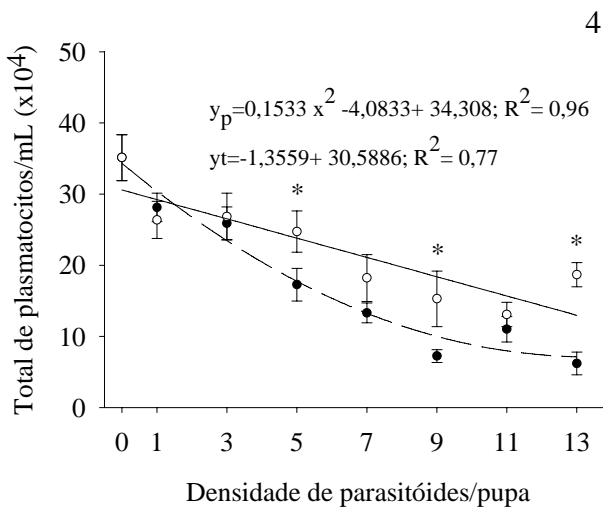
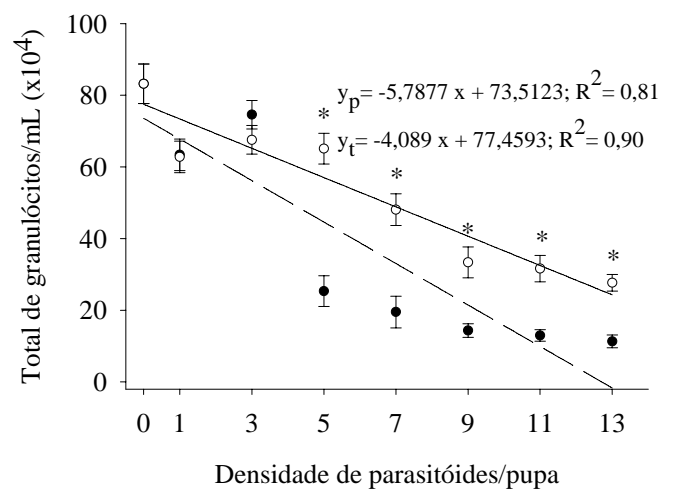
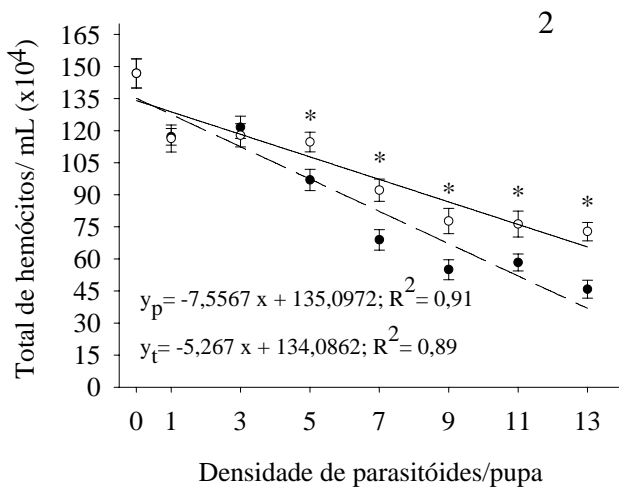


Figura1- Granulócitos (gr), plasmatócito (pl) e outros tipos de células circulantes (ph- pró-hemócito e vm- célula vermiforme) na hemolinfa de pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Bar: 10  $\mu$ m.

3



- *Palmistichus elaeisis*
- *Trichospilus diatraeae*
- — — Estimativa para *Palmistichus elaeisis*
- — — Estimativa para *Trichospilus diatraeae*

Figura 2-5. Hemócitos circulantes  $\pm$  EP na hemolinfa de pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitadas por diferentes densidades dos parasitóides *Palmistichus elaeisis* ou *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). 2- Total de hemócitos. 3- Total de granulócitos. 4- Total de plasmatócitos. 5- Outras células circulantes. \* Diferenças significativas entre espécies na mesma densidade pelo teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

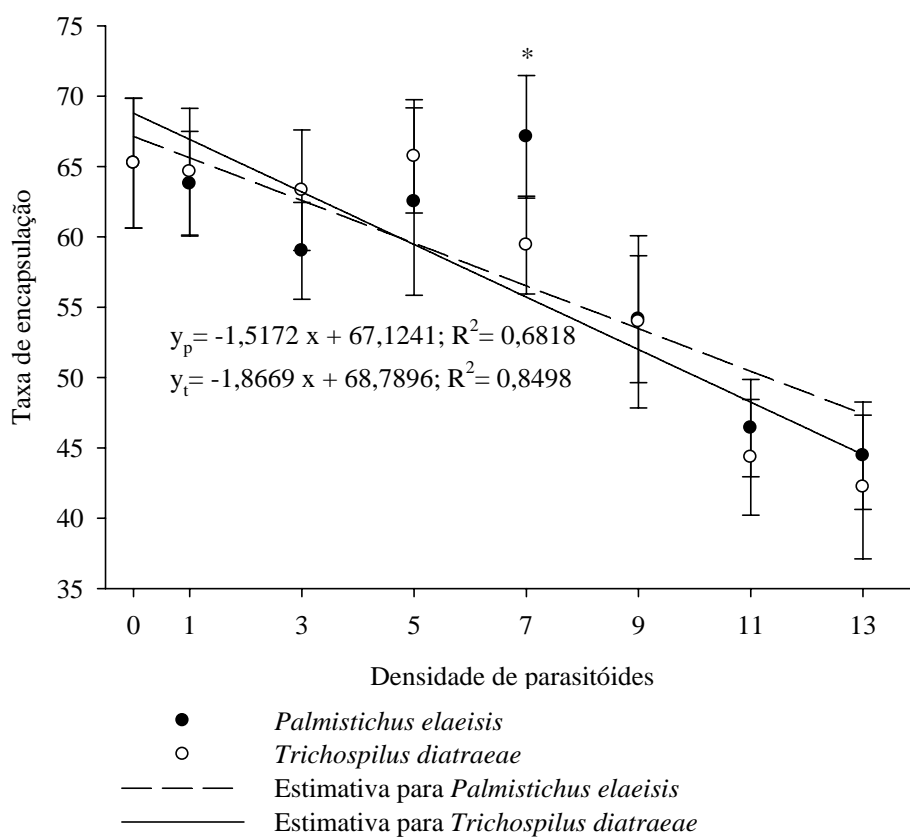


Figura 6- Encapsulação (valores estimados por unidade arbitrária de implantes escuros) de pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitadas por diferentes densidades de *Palmistichus elaeisis* ou *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). \* Diferença significativa entre espécies na mesma densidade pelo teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

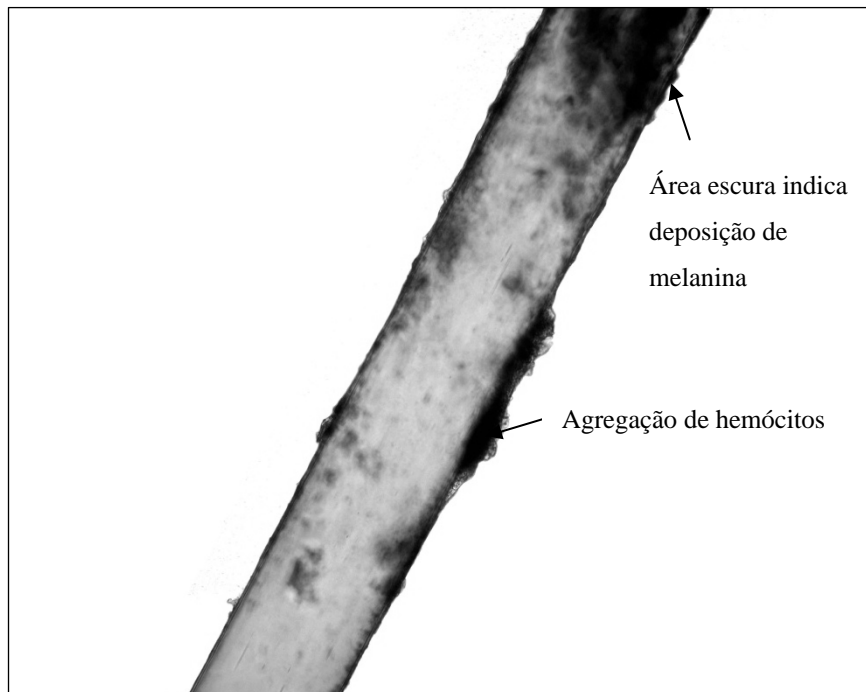


Figura 7- Deposição de hemócitos e melanogênese de implantes de náilon em pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae).

## CAPÍTULO 2

**Resposta imune de *Anticarsia gemmatalis* parasitada por *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) com diferentes idades**

**RESUMO** – O conhecimento do desempenho de parasitóides com o passar do tempo é importante para a criação e para sua liberação de massa desses inimigos naturais. Este estudo teve como objetivo avaliar a supressão da imunidade celular e encapsulação de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitados por *Trichospilus diatraeae* com 24, 48 ou 72 horas ou por *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) com 48, 72 e 96 horas. A histologia dos ovários dos parasitóides foi realizada para verificar a formação e absorção de ovócitos. Deformações foram constatadas nos ovócitos pelas dobras do córion de *T. diatraeae* com 72 horas e de *P. elaeisis* com 96 horas de idade. O total de hemócitos e granulócitos circulantes na hemolinfa de *A. gemmatalis* foram menores em pupas, após o parasitismo por *T. diatraeae* com 24 ou 48 horas e por *P. elaeisis* com 72 ou 96 horas. O número de hemócitos na hemolinfa do hospedeiro não parasitado foi semelhante às parasitadas por *T. diatraeae* com 72 horas ou por *P. elaeisis* com 48 horas. Os plasmatócitos de pupas de *A. gemmatalis* reduziram com *T. diatraeae* com 24 ou 48 horas. Os números de hemócitos, granulócitos e plasmatócitos foram semelhantes entre pupas parasitadas por *P. elaeisis* com 48 horas e não parasitadas. Apesar dos efeitos na resposta celular do hospedeiro, a encapsulação foi semelhante em pupas parasitadas e não parasitadas. A absorção de ovócitos *T. diatraeae* e *P. elaeisis* indica uma maior necessidade de recursos energéticos com envelhecimento ou uma estratégia para a reciclagem de nutrientes, devido à ausência de hospedeiros disponíveis. Essas evidências podem indicar um grande custo para o hospedeiro quando parasitados por parasitóides mais novos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Parasitóide Imunologia de insetos, controle biológico, produção massal, interação parasitoide-hospedeiro.

**ABSTRACT-** The knowledge of the performance of parasitoids over time is important for the rearing in laboratory and mass release. This study aimed to evaluate the suppression of cellular immunity and encapsulation of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitized by *Trichospilus diatraeae* with 24, 48 or 72 hours or *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) with 48, 72 and 96 hours after emergence. The histology of the ovaries of parasitoids was conducted to verify the formation and absorption of oocytes. Deformations were found in the oocyte by the folds of the chorion of 72 hours old *T. diatraeae* and 96 hours old *P. elaeisis*. The total number of circulating hemocytes and granulocytes in the hemolymph of *A. gemmatalis* pupae were smaller after parasitism by 24 or 48 hours old *T. diatraeae* and 72 or 96 hours old *P. elaeisis*. The number of hemocytes in the hemolymph of the unparasitized host and the one parasitized by 72 hours old *T. diatraeae* or by 48 hours old *P. elaeisis*. Plasmacytes *A. gemmatalis* pupae decreased exposure to *T. diatraeae* with 24 or 48 hours. The numbers of hemocytes, plasmacytes and granulocytes were similar in parasitized pupae by 48 hours *P. elaeisis* and unparasitized pupae. Despite the effect on the response of the host cell, encapsulation in parasitized and unparasitized pupae was similar. The absorption of oocytes of *T. diatraeae* and *P. elaeisis* suggest a greater need for energy resources with aging or a strategy for the recycling of nutrients, due to lack of available hosts. This evidence may indicate a greater fitness cost of parasitized host by parasitoids youngsters.

**KEYWORDS:** Parasitoid, Insect Immunology, biological control, mass production, parasitoid-host interaction.

## INTRODUÇÃO

O sucesso do controle biológico em programas de manejo integrado de pragas depende de avaliações de inimigos naturais (Andrade et al., 2009; Pastori et al., 2007; Nadeem et al., 2010) como as interações com seus hospedeiros e o ambiente (Lukianchuk & Smith, 1997; Pratissoli et al., 2005; Holtz et al., 2010). Interações parasitóide-hospedeiro mediadas pela defesa do hospedeiro são pouco conhecidas na seleção e produção massal de parasitóides para o controle biológico de insetos-praga.

A defesa em insetos envolve reações celulares que reconhecem o organismo invasor, pela síntese de peptídeos e proteínas com função de opsonização e fatores humorais (Nappi & Christensen, 2005, Stanley & Miller, 2006; Carton et al., 2008). Esta ativação fisiológica induz a ocorrência de cascatas proteolíticas e melanização com intermediários citotóxicos (Nappi & Ottaviani, 2000; Nappi & Christensen, 2005; Cerenius et al., 2008). A defesa inclui ainda a fagocitose (Borges et al., 2008), encapsulação (Jiravanichpaisal et al., 2006; Carton et al., 2008) e reações químicas com espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (Ishii et al., 2008), sendo que os parasitóides precisam suplantar a resposta imune do hospedeiro.

Microesferas de látex ou filamentos de náilon têm sido utilizadas para testar a encapsulação em insetos *in vivo* (Renault et al., 2002) pela relação entre a capacidade de encapsulação de materiais abióticos e habilidade de reconhecer e encapsular organismos invasores (Renault et al., 2002; Rantala & Roff, 2007). Por outro lado, a utilização de microfilamentos de náilon é o mais apropriado a pupas, pois não exige a injeção de líquido no organismo em avaliação e provoca menor dano ao invólucro pupal (Renault et al., 2002), assim como para insetos com a cutícula mais rígida (Vainikka et al., 2007, Rantala et al., 2010).

Parasitóides podem injetar secreções do ovário, fluídos do cálice, veneno, teratócitos ou vírus no hospedeiro durante a oviposição, afetando a resposta imune celular e humoral do hospedeiro, como estratégias para assegurar o desenvolvimento da prole (Beck et al., 2000; Zang et al., 2004). Entretanto, fatores como a idade de adultos pode reduzir a emergência da progênie de parasitóides (Pereira et al., 2009), o que pode estar relacionado à menor capacidade de produção de substâncias que suprimam a imunidade do hospedeiro (Vass & Nappi, 1998) ou a menor produção de ovos por fêmea (Neto et al., 2005; Pereira et al., 2009). Duas estratégias são reconhecidas quanto à produção de ovos em função do tempo. Assim, parasitóides podem ser classificados em provigênicos, com produção máxima de ovos logo após a emergência, ou em sinovigênicos quando apresentam plasticidade reprodutiva (Jervis et al., 2001), sendo que parasitóides provigênicos podem apresentar superparasitismo quando poucos hospedeiros estão disponíveis (Jervis et al., 2001).

*Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) tem sido estudados como potencial agente de controle de pragas florestais e agrícolas (Pereira et al., 2008; Soares et al., 2009; Pereira et al., 2009) por parasitar pupas de diferentes insetos (Bennett et al., 1987; Paron & Berti-Filho, 2000; Pereira et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a alteração da resposta imune celular do hospedeiro alternativo *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) com o envelhecimento de fêmeas de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* contribuindo para o estabelecimento de estratégias para a criação massal desse parasitóide.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Hospedeiro e parasitóide

Ovos de *A. gemmatalis* foram acondicionados em potes plásticos de 1100 mL e,

após a eclosão, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial *ad libitum* (Greene *et al.*, 1976) à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 14 horas. Lagartas no final do quinto estágio foram transferidas para potes de 1100 mL com 1/5 de seu volume com areia esterilizada à  $150^\circ\text{C}$  por duas horas, utilizada como local de pupação. As pupas foram transferidas para gaiolas de madeira (30 x 30 x 30 cm) com solução nutritiva para a alimentação dos adultos (10,5 g de mel, 60 g de sacarose, 1,05 g de nipagin e 1,05 g de ácido ascórbico diluídos em 1,05 L de água destilada) embebida em algodão. Posturas deste Lepidoptera foram coletadas em folhas de papel branco dispostas no interior das gaiolas de madeira e transferidas para os potes de criação com a dieta artificial.

Indivíduos de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* foram obtidos do Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 14 horas. Oito fêmeas de *T. diatraeae* com 24 horas receberam pupas de *A. gemmatilis* por 24 h em tubos de vidro (14 x 2,2 cm) contendo gotículas de mel para alimentação dos parasitóides. O número de parasitóides utilizados foi baseado naquele necessário para parasitar o hospedeiro alternativo e obter-se emergência de progênie (Paron & Berti-Filho, 2000) e seis fêmeas de *P. elaeisis*, 72 h após a emergência foi oferecido para esse hospedeiro alternativo para o parasitismo.

### **Histologia**

Seis fêmeas virgens de *T. diatraeae* com 24, 48 ou 72 horas e seis de *P. elaeisis* com 48, 72 ou 96 horas foram dissecadas e os abdomens transferidos para solução de Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967). As idades utilizadas foram baseadas no tempo em que se verifica parasitismo com emergência de progênie em laboratório (dados não mostrados). Esses abdomens foram desidratados em série alcoólica crescente e

embebidos em historesina. Secções com 4 µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina, analisadas em microscópio de luz.

### **Efeito da idade do parasitóide na resposta imune celular do hospedeiro**

Quinze pupas de *A. gemmatalis* com 24 h de idade pesando  $211,31 \pm 1,3$  mg foram expostas por 24 h ao parasitismo por oito fêmeas de *T. diatraeae* com 24, 48 ou 72 h de idade ou por seis de *P. elaeisis* com 48, 72 ou 96 horas. Após este período, essas pupas foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% e água destilada por cinco segundos. Um total de 4 µL de hemolinfa de cada uma foi coletado com micropipetas e transferido para 20 µL de solução tampão (98 mM NaOH, 186 mM NaCl, 17 mM Na<sub>2</sub> EDTA e 41 mM de ácido cítrico, pH 4,5), para evitar a agregação dos hemócitos (Ibrahim & Kim, 2006). Pupas não parasitadas foram utilizadas no controle.

As amostras de hemolinfa de *A. gemmatalis* foram coradas com 4 µL de Giemsa e o total de hemócitos, granulócitos, plasmatócitos e outros tipos de hemócitos (Jiravanichpaisal et al., 2006; Ribeiro & Brehélin, 2006; Ibrahim & Kim, 2006) quantificados em microscópio de luz (objetiva de 40 x) com câmara de Neubauer.

### **Encapsulação**

Filamentos de náilon (2,0 x 0,2 mm) foram esterilizados com solução de hipoclorito de sódio a 1% e água destilada e implantados (Renault et al., 2002) em 20 pupas de *A. gemmatalis* com 24 h de idade, as quais foram individualizadas em tubos de vidro (14,0 × 2,2 cm) com oito fêmeas de *T. diatraeae* com 24, 48 ou 72 horas. Os adultos dos parasitóides foram removidos após 24 horas de parasitismo.

Os filamentos de náilon foram removidos do hospedeiro após 48 horas, montados em lâminas, analisadas em microscópio de luz e as imagens digitalizadas com câmera fotográfica Canon PowerShot™ A640 e trabalhadas no programa de computador RemoteCapture Task™ com as configurações: *white balance: day light; exposure*

*compensation: +1; flash exposure level: zero; metering mode: evaluative; ISSO speed: auto; AE mode: program AE.*

A assinatura espectral dos filamentos de náilon foi obtida com o programa imageJ 1.37v (linguagem de programação java) de domínio público desenvolvido pelo US National Institutes of Health (Rasband, 2009; Barboriak et al., 2005, Souza et al., 2009). O valor médio de absorvância foi adotado como medida da taxa de encapsulação (Rantala & Kortet, 2004; Souza et al., 2008; Souza et al., 2009), com valores de zero a 255 (Souza et al., 2009). A média de absorvância das amostras foi subtraída de 255 para ajuste do gráfico, pois o programa indica a maior encapsulação por zero e a menor por 255. Os valores foram ajustados descontando-se o fundo (função: discount background) (Souza et al., 2008; Souza et al., 2009).

### **Análise dos dados**

Os hemócitos foram quantificados e foram feitas comparações múltiplas não-paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) com 15 repetições. Os dados de encapsulação foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ( $p < 0,05$ ) de probabilidade com 20 repetições.

## **RESULTADOS**

### ***Trichospilus diatraeae***

Fêmeas de *T. diatraeae* com 24 ou 48 horas idade apresentaram maturação de ovócitos (Figuras 1 e 2), enquanto a absorção generalizada de ovócitos começou a ocorrer naquelas com 72 h de idade, caracterizada pelo formato irregular destes, dobras do córion e conteúdo interno desorganizado (Figuras 3).

A idade dos parasitóides afetou o total de hemócitos do hospedeiro alternativo. O parasitismo por fêmeas de *T. diatraeae* com 24 ou 48 h de idade reduziu o total de

hemócitos na hemolinfa de *A. gemmatalis* de  $153,65 \times 10^4$  hemócitos  $\text{mL}^{-1}$  nas pupas não parasitadas para  $99,17 \times 10^4$  e  $108,27 \times 10^4$  hemócitos  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 1). Por outro lado, fêmeas de *T. diatraeae* com 72 h de idade não reduziram o total de hemócitos circulantes na hemolinfa de pupas de *A. gemmatalis* em comparação com pupas não parasitadas (Tabela 1).

O parasitismo por fêmeas de *T. diatraeae* com 24 e 48 horas de idade reduziu o número de granulócitos e plasmatócitos circulantes na hemolinfa de pupas de *A. gemmatalis*, o que não ocorreu pelo parasitismo por fêmeas com 72 horas de idade (Tabela 1). O parasitismo de *T. diatraeae* não influenciou os outros tipos de células circulantes na hemolinfa de *A. gemmatalis*, independente da idade do parasitóide (Tabela 1).

A taxa de encapsulação de *A. gemmatalis* foi semelhante em pupas de *A. gemmatalis* parasitadas ou não independentemente da idade de fêmeas de *T. diatraeae* ( $F= 0,915$ ;  $P=0,1$ ) (Figura 4).

### ***Palmistichus elaeisis***

Fêmeas de *P. elaeisis* apresentaram ovócitos formados, indicando ampla atividade de ovogenia com 48 e 72 horas (Figuras 5 e 6). Por outro lado, deformações caracterizadas por dobras no córion foram apresentadas em *P. elaeisis* com 96 horas de idade (Figura 7).

O total de hemócitos circulantes de pupas de *A. gemmatalis* parasitadas reduziu de  $153,65 \times 10^4$  no controle para  $57,517 \times 10^4$  e  $59,150 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  naquelas parasitadas por *P. elaeisis* com 72 e 96 horas de emergência, respectivamente (Tabela 2). Essa redução foi semelhante entre essas duas idades ( $kw= 40,803$ ). Enquanto que, pupas parasitadas por *P. elaeisis* com 48 horas apresentaram quantidade de hemocitos semelhante àquelas não parasitadas.

O número de granulócitos foi menor com o parasitismo de pupas de *A. gemmatalis* por *P. elaeisis* com 72 e 96 horas com  $26,717 \times 10^4$  e  $30,683 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Por outro lado, a quantidade desse tipo de hemócito foi semelhante entre essas idades de parasitóides (Tabela 2). *P. elaeisis* com 48 horas de emergência não provocou alterações na quantificação dessas células na hemolinfa de *A. gemmatalis* e inferior a 72 horas, mas semelhante à ocasionada por parasitóides com 96 horas (Tabela 2).

O número de plasmatócitos de pupas parasitadas por *P. elaeisis* com 48 horas ( $33,833 \times 10^4$ ) foi semelhante às não parasitadas ( $41,767 \times 10^4$ ) (Tabela 2). A maior redução desse tipo de hemócito foi com o parasitismo de *P. elaeisis* com 72 e 96 horas com  $15,1667 \times 10^4$  e  $14,00 \times 10^4$  hemócitos  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente.

O parasitismo de *P. elaeisis* com idade até 72 horas de emergência não afetou os outros tipos de células. Entretanto, pupas parasitadas por *P. elaeisis* com 96 horas apresentaram redução dessas células (Tabela 2).

A encapsulação de pupas de *A. gemmatalis* não parasitadas e parasitadas por *P. elaeisis* ( $F=2,516$ ;  $P=0,06455$ ) foi semelhante sem efeito da idade de emergência (Figura 8).

## DISCUSSÃO

As características de ovócitos de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* em processo de absorção como formato irregular, dobras do córion e conteúdo interno desorganizado são semelhantes aquelas de outros insetos (Hebner, 1981; Martins & Serrão, 2004; Souza et al., 2007). A maior absorção de ovos com o avanço da idade de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* é um fenômeno comum em insetos e pode ser influenciada por hormônios ecdisteróides ou devido à ausência do hospedeiro para oviposição (Bodin et al., 2009).

Assim, fêmeas de parasitóide aumentam seu sucesso reprodutivo (Bodin et al., 2007; Jervis et al., 2008). Por outro lado, há um custo associado não oviposição, pois o envelhecimento reduz a capacidade reprodutiva pela realocação de menor quantidade de recursos para a ovogênese e exigências metabólicas do parasitóide (Papaj et al., 2000; Rosenheim 2008). Além disso, a privação de fontes nutricionais pode reduzir a qualidade nutricional dos ovos formados (Dong et al., 2008). Dessa maneira, as formas imaturas de parasitóides podem ser mais propensas a danos do hospedeiro. A incapacidade de *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera: Figitidae) em produzir supressores da defesa do hospedeiro resultou em maior encapsulação de seus ovos no hospedeiro *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), mesmo com quantidade suficiente de ovos para parasitar (Vass & Nappi, 1998). Por outro lado, a absorção de ovócitos e o envelhecimento de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* não tiveram relação com o aumento da encapsulação pelo hospedeiro.

*Trichospilus diatraeae* com 72 horas pode ser mais expostos à defesa celular do hospedeiro, pois o envelhecimento de fêmeas reduziu a capacidade de *T. diatraeae* em suplantar a resposta imune celular do hospedeiro, o que pode ser atribuído à redução de substâncias injetadas durante a oviposição e/ou ao menor número de ovos no interior do hospedeiro. Por outro lado, *P. elaeisis* com menor idade não alterou a quantidade de hemócitos circulantes do hospedeiro. A viabilidade de *P. elaeisis* em pupas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) parasitadas foi menor com o envelhecimento de suas fêmeas com menor sucesso de parasitismo com idade inferior que 72 horas (Pereira et al., 2009).

O hospedeiro pode matar parasitóides imaturos por deposição celular, que induz a asfixia e por intoxicação por compostos tóxicos da melanização (Nappi & Christensen, 2005; Li et al., 2007; Carton et al., 2008). Ovos de *Cotesia rubecula* (Hymenoptera:

Braconidae) coletadas de lagartas de *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae) apresentaram uma proteína de 32 KDa, que teria função de proteção contra a defesa humoral e celular do hospedeiro (Asgari et al., 1998). Isso pode justificaria uma provável menor quantidade e/ou qualidade de substâncias do ovário dos parasitóides velhos de *T. diatraeae* ou de *P. elaeisis* com idade inferior a 72 horas, o que aumentaria a exposição de imaturos às células de defesa do hospedeiro. Estratégias passivas contra a defesa do hospedeiro foram relatadas para os parasitóides *Cotesia kariyai* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae) e *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera, Braconidae), que protegem seus ovos com fluido do cálice ou por propriedades do córion (Poirié et al., 2009). Isso pode ter implicações no sucesso do parasitismo, sendo também uma forma de proteção contra invasores, como evidenciado por uma substância protetora em ovos de *Thyrinteina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) contra o parasitismo por *Trichogramma maxacalii* (Voegelé e Pointel) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Oliveira et al., 2008).

O maior número hemócitos circulantes na hemolinfa do hospedeiro alternativo parasitado por *T. diatraeae* com maior idade ou por *P. elaeisis* com menor idade pode indicar menor capacidade de supressão das defesas celulares de *A. gemmatalis*. A absorção de ovos indica que a necessidade de recursos nutricionais para a demanda fisiológica do parasitóide é obtida a partir de ovócitos, o que pode ter relação com a produção quantitativa e/ou qualitativa de substâncias supressoras da defesa do hospedeiro. No entanto, o fato de não ter ocorrido maior encapsulação do hospedeiro alternativo por insetos mais velhos pode estar relacionado à toxicidade dos produtos intermediários da melanogênese também para o hospedeiro.

## CONCLUSÕES

A defesa celular de pupas do hospedeiro alternativo *A. gemmatalis* foi menor ao serem parasitadas por fêmeas de *T. diatraeae* com até 48 horas de emergência e por *P. elaeisis* com 72 ou 96 horas. Por outro lado, o aumento da idade provocou a absorção de ovos nas duas espécies de parasitóides. Assim, *T. diatraeae* com idades superiores a 48 horas e *P. elaeisis* com 96 horas podem ter menor sucesso reprodutivo em criação massal pela maior probabilidade de inviabilidade devido à defesa celular do hospedeiro contra este inimigo natural e ao menor fecundidade.

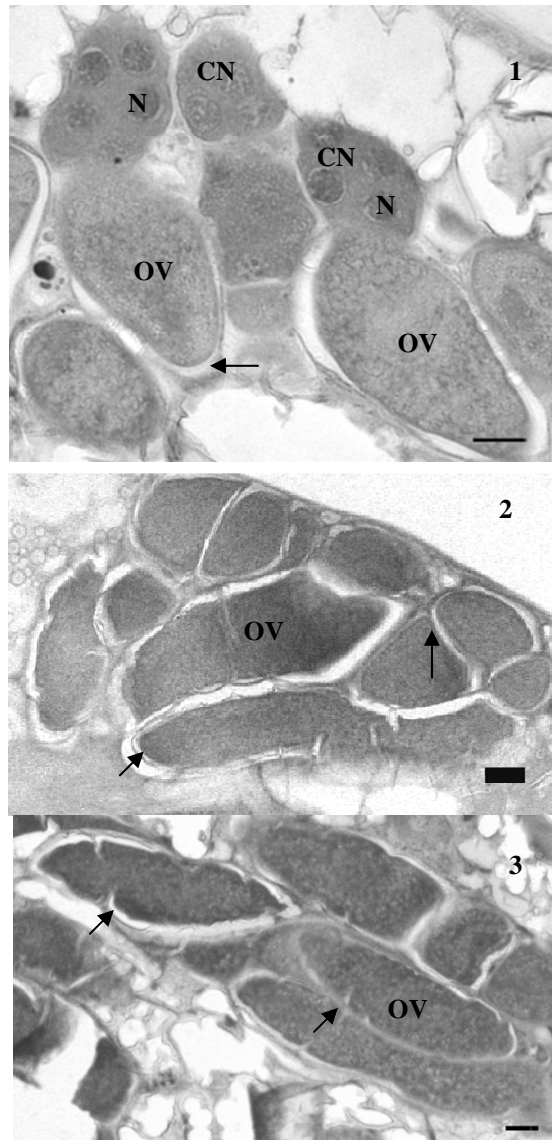


Figura 1-3 Seções histológicas dos ovários de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). 1. Fêmea com 24 horas de idade apresentando ovócitos (OV) em fase inicial de desenvolvimento associados a células nutridoras (CN). N – núcleo das células nutridoras. 2. Fêmea com 48 horas de idade apresentando ovócitos maduros (OV) com córion evidente (setas). 3. Fêmeas com 72 horas de idade apresentando ovócitos (OV) com sinais de absorção com dobras no córion. Bar: 10 $\mu$ m.

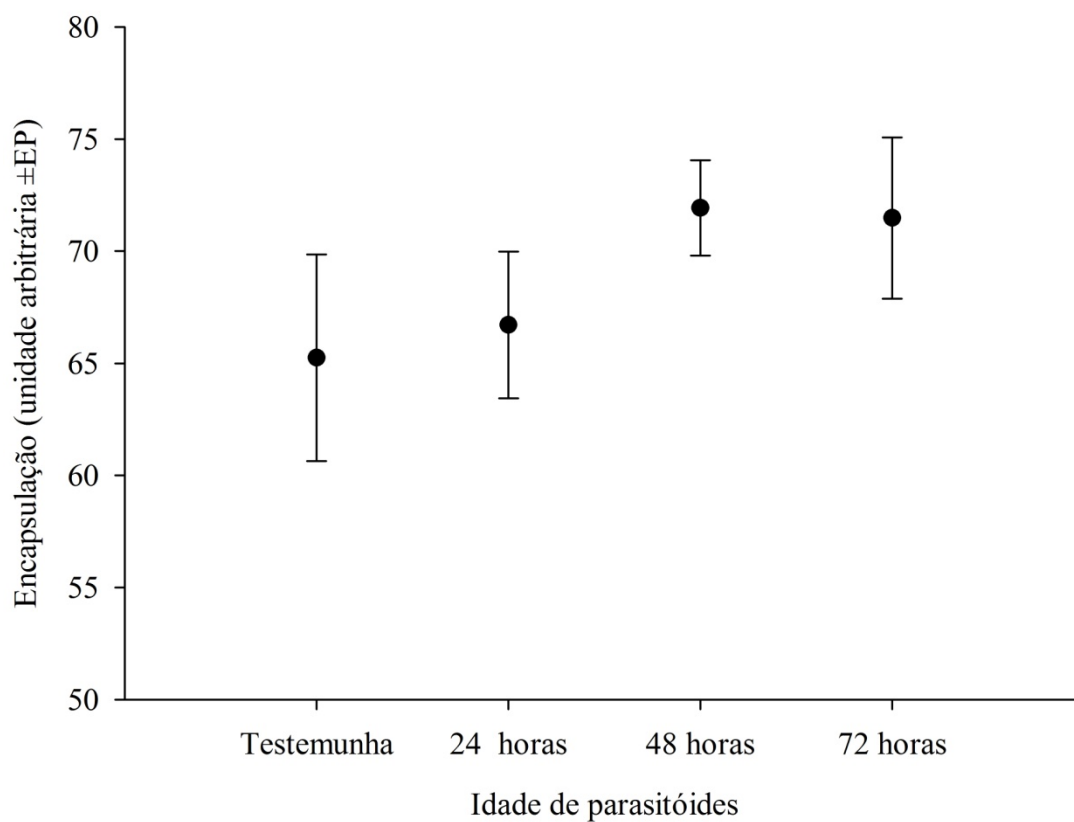


Figura 4- Encapsulação ( $\pm$ EP) induzida pelo parasitismo de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) com 24, 48 ou 72 horas de idade em pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Médias não significativas pela análise de variância (ANOVA) ( $p < 0,05$ ).

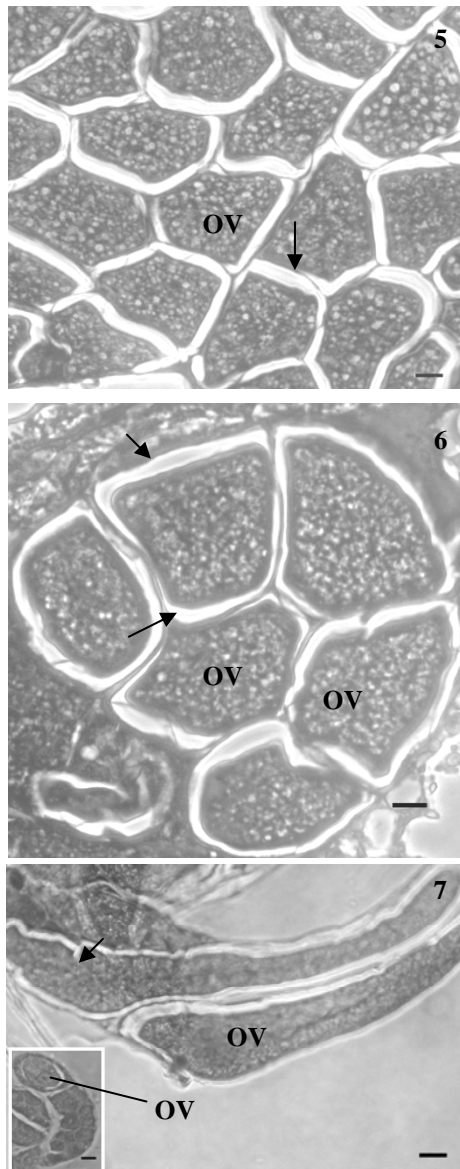


Figura 5-7 Seções histológicas dos ovários de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). 5- Fêmea com 48 horas de idade apresentando ovócitos (OV) com córion em término de formação (setas). 6- Fêmeas com 72 horas de idade apresentando ovócitos formados. 7- Fêmea com 96 horas de idade apresentando sinais de absorção com dobras do córion irregulares do córion, Inseto: detalhe de ovócito com atraso de formação e células nutridoras pouco desenvolvidas. Bar: 10  $\mu$ m.

Tabela 1- Número de hemócitos circulantes na hemolinfa média ( $\pm$ EP) de pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitadas por *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) com 24, 48 ou 72 horas de idade.

Idade de parasitóides (horas)	Hemócitos ( $\times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ )			
	Total	Granulócitos	Plasmatócitos	Outros
NP <sup>1</sup>	153,65 $\pm$ 9,15 a	91,12 $\pm$ 7,65 a	41,77 $\pm$ 3,36 a	20,77 $\pm$ 2,12 a
24	99,17 $\pm$ 7,12 b	60,32 $\pm$ 7,20 b	20,65 $\pm$ 2,23 b	18,20 $\pm$ 2,90 a
48	108,27 $\pm$ 8,20 b	67,78 $\pm$ 7,00 b	16,57 $\pm$ 1,41 b	23,92 $\pm$ 2,23 a
72	155,28 $\pm$ 7,88 a	95,08 $\pm$ 8,12 a	37,45 $\pm$ 4,86 a	22,75 $\pm$ 2,62 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna diferem pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Pupas não parasitadas (controle)

Tabela 2- Número de hemócitos circulantes na hemolinfa média ( $\pm$ EP) de pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitadas por *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) com 48, 72 ou 96 horas de idade.

Idade de parasitóides (horas)	Hemócitos ( $\times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ )			
	Total	Granulócitos	Plasmatócitos	Outros
NP <sup>1</sup>	153,65 $\pm$ 9,15 a	91,12 $\pm$ 7,65 a	41,77 $\pm$ 3,36 a	20,77 $\pm$ 2,12 a
48	109,20 $\pm$ 9,68 a	51,80 $\pm$ 5,48 a	33,83 $\pm$ 3,69 a	23,57 $\pm$ 2,39 a
72	57,52 $\pm$ 2,05 b	26,72 $\pm$ 1,91 b	15,17 $\pm$ 1,25 b	15,63 $\pm$ 2,15 a
96	59,15 $\pm$ 5,35 b	30,68 $\pm$ 4,10 b	14,00 $\pm$ 1,69 b	14,47 $\pm$ 1,70 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna diferem pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Pupas não parasitadas (controle)

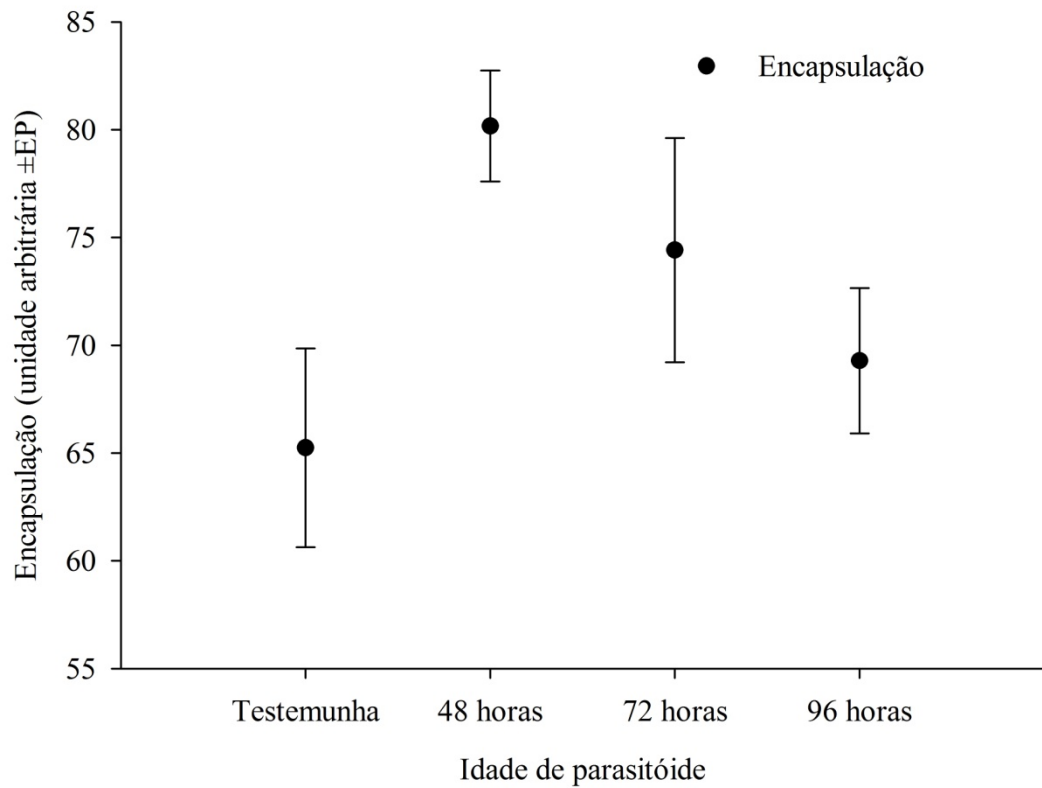


Figura 8- Encapsulação ( $\pm$ EP) induzida pelo parasitismo de *Palmistichus elaeis* (Hymenoptera: Eulophidae) com 48, 72 ou 96 horas após a emergência em pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Médias não significativas pela análise de variância (ANOVA) ( $p < 0,05$ ).

## CAPÍTULO 3

**Efeito da idade de *Anticarsia gemmatalis* na resposta imune do parasitismo por  
*Palmistichus elaeis* e *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae)**

**RESUMO** – O parasitismo de *Palmistichus elaeisis* e *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) é mais eficiente em *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) no início do desenvolvimento pupal em laboratório, o que indica ser estágio dependente. O objetivo deste trabalho foi avaliar as diferenças na defesa celular de pupas com diferentes idades parasitadas por *P. elaeisis* e *T. diatraeae* o sucesso reprodutivo desses parasitóides é inibido pelas defesas celulares e por encapsulação em pupas mais velhas de *A. gemmatalis*. O total de hemócitos, granulócitos, plasmatócitos e de outros tipos de células circulantes na hemolinfa de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) foram avaliados em pupas com 24 e 48 horas. O total de hemócitos na hemolinfa de *A. gemmatalis* foi semelhante em pupas com 24 ou 48 horas de idade. O parasitismo de *P. elaeisis* reduziu o número total de hemócitos, independente da idade, com reflexo em granulócitos e plasmatócitos. Por outro lado, os outros tipos de células circulantes foram semelhantes em pupas com 48 horas parasitadas comparada as parasitadas com 24 horas e aquelas não parasitadas nesta idade. Pupas parasitadas por *T. diatraeae* tiveram redução do número total de hemócitos e de plasmatócitos, sendo a menor redução naquelas parasitadas com 24 horas. O parasitismo de pupas com 48 horas não reduziu o número de granulócitos. O número de outros tipos de células reduziu com *T. diatraeae* independente da idade de pupas. A encapsulação de pupas parasitadas com 24 horas por *P. elaeisis* foi menor somente que em pupas não parasitadas com 48 horas. Por outro lado, pupas com 24 horas parasitadas por *T. diatraeae* tiveram menor encapsulação que aquelas com 48 horas. Embora haja uma diminuição de hemócitos com o parasitismo, outros fatores podem induzir o menor sucesso de parasitismo desses parasitóides em pupas mais velhas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Imunologia; controle biológico; reprodução; parasitóides.

**ABSTRACT** – Parasitism of *Palmistichus elaeisis* and *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) is more efficient in *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in early pupal development in the laboratory, which indicates the stage dependent. The aim of this study was to evaluate the differences in the cellular defense of the *A. gemmatalis* pupae of different ages parasitized by *P. elaeisis* and *T. diatraeae*. The total hemocytes, granulocytes, plasmatocytes and other types of cells circulating in the hemolymph were evaluated in 24 and 48 hours old *A. gemmatalis* pupae. The total number of hemocytes in the hemolymph of 24 and 48 hours old *A. gemmatalis* pupae was similar. Parasitism of *P. elaeisis* reduced the total number of hemocytes, regardless of age, reflected in granulocytes and plasmatocytes. On the other hand, other types of circulating cells were similar in parasitized 48 hours old pupae compared with the one with 24 hours. Pupae exposure to *T. diatraeae* had reduced the total number of hemocytes and plasmatocytes, with the smallest reduction in those with 24 hours old parasitized. Parasitism of 48 hours old pupae did not reduce the number of granulocytes. The number of other cell types decreased with *T. diatraeae* regardless of age of pupae. Encapsulation of parasitized 24 hours old pupae exposure to *P. elaeisis* was lower only than in unparasitized 48 hours old pupae. Moreover, encapsulation was less than those with 48 hours in parasitized pupae with 24 hours exposure to *T. diatraeae*. Although there was a decrease of hemocytes with parasitism, other factors may be responsible for decreased reproductive success of these parasitoids with increasing age of the *A. gemmatalis* pupae.

**KEYWORDS:** Immunology; biological control; reproduction; parasitoid.

## INTRODUÇÃO

O sistema de defesa imune de insetos pode ser celular, mediada por hemócitos, os quais são responsáveis pela fagocitose, formação de nódulos e encapsulação (Ribeiro & Brehélin, 2006; Carton et al., 2008; Hegazi & Khafagi, 2008) ou humoral com produção de moléculas, como peptídeos, intermediários reativos de oxigênio ou nitrogênio e aqueles envolvidos na melanização, destruindo-as ou provocando intoxicação (Ribeiro & Brehélin, 2006; Carton et al., 2008; Cerenius et al., 2008). Por outro lado, essa divisão serve apenas para maior entendimento do processo bioquímico de defesa imunológica dos insetos, pois defesas celulares e humorais são interligadas. Nesse sentido, fatores humorais podem ser produzidos por hemócitos e funções celulares podem ser desencadeadas por moléculas do sistema humoral (Lavine & Strand, 2002; Strand, 2008). Essa imunidade não é específica como em mamíferos e atuam em diferentes organismos de forma semelhante (Narayanan, 2004; Schmidt et al., 2008).

Parasitóides desenvolveram estratégias para aproveitar os recursos nutricionais do hospedeiro (Zang et al., 2004; Kaeslin et al., 2005). Esses inimigos naturais podem permitir o desenvolvimento dos hospedeiros até que atinjam a fase de pupa ou adulto ou, bloqueiam o desenvolvimento de seus hospedeiros no momento do parasitismo (Imbrahin & Kim, 2006; Li & Mills 2004).

O parasitismo pode ser associado com polydnavirus, cuja expressão gênica no hospedeiro favorece as formas imaturas do parasitóide (Pfister-Wilhelm & Lanzrein, 2009). Substâncias do ovário podem bloquear a defesa, provocar a morte ou paralisia do hospedeiro ou proteger os ovos contra o sistema imune (Li et al., 2007). Células ao redor do embrião de algumas espécies dispersam na hemolinfa e aumentam de tamanho

e modificam a fisiologia dos hospedeiros e favorecem os embriões (Firlej et al., 2007; Falabella et al., 2009); o parasitismo pode provocar, ainda, alteração de hormônios como o hormônio juvenil, ecditeróides e neuropeptídeos (Strand & Pech, 1995).

*Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) parasita pupas de Lepidoptera e Coleoptera (Pereira & Zanuncio, 2005; Zanuncio et al., 2008); *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae), também, apresenta hábito polífago e se desenvolve em pupas de Lepidoptera (Paron & Berti Filho, 2000; Pereira et al., 2008). Devido ao potencial no controle biológico, essas duas espécies de parasitóides têm sido estudadas para o controle de pragas de culturas agrícolas e florestais (Zanuncio et al., 2008; Pereira et al., 2008, Pereira et al., 2009; Soares et al., 2009).

Apesar de *P. elaeisis* e *T. diatraeae* serem parasitóides de pupas, o parasitismo é estágio dependente, possuindo maior sucesso reprodutivo em pupas com desenvolvimento inicial que nas mais velhas. Isso pode ser devido à maior capacidade de defesa celular e encapsulação do hospedeiro com a idade avançada (Hegazi & Khafagi, 2008).

O objetivo deste trabalho foi quantificar o número de hemócitos e a encapsulação em pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) com diferentes idades parasitadas por *P. elaeisis* ou *T. diatraeae*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Hospedeiro e parasitóide

Ovos de *A. gemmatalis* foram acondicionados em potes plásticos de 1100 mL e, após a eclosão, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial *ad libitum* (Greene et al., 1976) à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 14 horas. Lagartas no

final do quinto estágio foram transferidas para potes de 1100 mL com 1/5 de seu volume com areia esterilizada à 150 °C por duas horas, utilizada como local de pupação. As pupas foram transferidas para gaiolas de madeira (30 x 30 x 30 cm) com solução nutritiva para a alimentação dos adultos (10,5 g de mel, 60 g de sacarose, 1,05 g de nipagin e 1,05 g de ácido ascórbico diluídos em 1,05 L de água destilada) embebida em algodão. Posturas deste Lepidoptera foram coletadas em folhas de papel branco dispostas no interior das gaiolas de madeira e transferidas para os potes de criação com a dieta artificial.

Indivíduos de *P. elaeisis* e *T. diatraeae* foram obtidos do Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal de Viçosa em Viçosa, Minas Gerais criados a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 14 horas.

Seis fêmeas *P. elaeisis* com 72 horas (dados não publicados) ou oito fêmeas de *T. diatraeae* com até 24 horas número necessário para parasitar o hospedeiro alternativo e obter-se emergência de progênie (Paron & Berti-Filho, 2000), receberam pupas de *A. gemmatalis* com até 24 horas de idade por 24 horas em tubos de vidro (14,0 × 2,2 cm) contendo gotículas de mel para alimentação dos parasitóides.

### **Resposta imune celular de pupas com diferentes idades parasitadas**

Pupas de *A. gemmatalis* ( $201,32 \pm 2,19$  mg) com 24 horas ou 48 horas foram utilizadas no experimento. Dois lotes com 15 pupas para cada idade foram expostos por 24 h ao parasitismo por oito fêmeas de *T. diatraeae* com 24 horas ou por seis fêmeas de *P. elaeisis* com 72 horas de emergência. Após esse período, estas pupas foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% e água destilada por cinco segundos.

Um total de 4 µL de hemolinfa de cada uma foi coletado com micropipetas e transferido para 20 µL de solução tampão (98 mM NaOH, 186 mM NaCl, 17 mM Na<sub>2</sub>EDTA e 41 mM de ácido cítrico, pH 4,5), para evitar a agregação dos hemócitos

(Ibrahim & Kim, 2006). Pupas não parasitadas foram utilizadas como testemunha.

As amostras de hemolinfa de *A. gemmatalis* foram coradas com 4 µL de Giemsa e o total de hemócitos, granulócitos, plasmatócitos e outros tipos de hemócitos (Ribeiro & Brehélin, 2006, Ibrahim & Kim 2006) quantificados em microscópio de luz com objetiva de 40x com câmara de Newbauer.

### **Encapsulação**

Filamentos de náilon (2,0 x 0,2 mm) foram esterilizados com solução de hipoclorito de sódio a 1% e água destilada e implantados (Renault et al., 2002) em 20 pupas de *A. gemmatalis* com 24 ou 48 horas de idade, as quais foram individualizadas em tubos de vidro (14,0 × 2,2 cm) com oito fêmeas de *T. diatraeae* com 24 h. Os adultos dos parasitóides foram removidos após 24 h de parasitismo.

Os filamentos de náilon foram removidos do hospedeiro após 48 h, montados em lâminas, analisadas em microscópio de luz e as imagens digitalizadas com câmera fotográfica Canon PowerShot™ A640 e trabalhadas no programa de computador RemoteCapture Task™ com as configurações: *white balance: day light; exposure compensation: +1; flash exposure level: zero; metering mode: evaluative; ISSO speed: auto; AE mode: program AE.*

Os valores médios da encapsulação dos filamentos de náilon implantados nas pupas foram obtidos com o programa de processamento de imagens imageJ 1.37v (linguagem de programação java) de domínio público desenvolvido pelo US National Institutes of Health (Barboriak et al., 2005, Souza et al., 2009). O maior escurecimento foi assumido como a maior taxa de encapsulação em unidades artificiais (Rantala & Kortet, 2004; Souza et al., 2008, Souza et al., 2009). Os valores do fundo da imagem foram subtraídos para corrigir os valores médios de encapsulação dos implantes pela função “discount background” (Souza et al., 2008, Souza et al., 2009).

## **Análise dos dados**

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com duas idades de pupas. As variáveis analisadas foram total de hemócitos e seus tipos distinguidos em granulócitos, plasmatócitos e outras células com 15 repetições. A encapsulação/melanização foi avaliada com 20 repetições. Comparações múltiplas foram realizadas para hemócitos e para encapsulação por teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

### ***Palmistichus elaeisis***

O total de hemócitos circulantes de pupas de *A. gemmatalis* com 24 horas parasitadas por *P. elaeisis* foi de  $58,45 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ , sendo semelhante as parasitadas com 48 horas de idade com  $77,47 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ . O total de hemócitos foi menor após o parasitismo em pupas com 24 horas em relação às não parasitadas com  $147,47 \times 10^4$  e  $152,37 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  para pupas com 24 e 48 horas, respectivamente. O total de hemócitos na hemolinfa de *A. gemmatalis* também reduziu com o parasitismo em pupas de 48 horas em relação às não parasitadas nas duas idades (Figura 1).

O número de granulócitos e de plasmatócitos foi semelhante entre as pupas não parasitadas, sem influência da idade do hospedeiro assim como entre aquelas que foram parasitadas por *P. elaeisis*. Por outro lado, esses hemócitos reduziram na hemolinfa após serem parasitadas por *P. elaeisis*, independente da idade desse hospedeiro (Figuras 2 e 3).

Pupas com 24 horas de idade não parasitadas apresentaram  $87,38 \times 10^4$  granulócitos  $\text{mL}^{-1}$  e parasitadas,  $28,93 \times 10^4$  granulócitos  $\text{mL}^{-1}$ . Aquelas não parasitadas com 48 horas tiveram  $79,92 \times 10^4$  granulócitos  $\text{mL}^{-1}$ , sendo reduzidas para  $39,55 \times 10^4$

granulócitos  $\text{mL}^{-1}$  com *P. elaeisis* (Figura 2).

O número de plasmatócitos variou de  $39,78 \times 10^4$  para  $15,63 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  em pupas com 24 horas não-parasitadas e parasitadas, respectivamente. Essas células em pupas parasitadas na idade de 48 horas reduziram de  $48,83 \times 10^4$  para  $20,88 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 3).

Os outros tipos de células circulantes na hemolinfa nas duas idades de *A. gemmatalis* foram semelhantes com  $20,53 \times 10^4$  e  $23,56 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  nas pupas não parasitadas com redução para  $13,88 \times 10^4$  e  $17,033 \times 10^4$   $\text{mL}^{-1}$  após serem parasitadas por *P. elaeisis*. A quantidade dessas células foi menor em pupas parasitadas com a idade de 24 horas que naquelas não parasitadas na mesma idade e com 48 horas (Figura 4).

O parasitismo de *P. elaeisis* não influenciou a encapsulação de pupas de *A. gemmatalis*, exceto quando se comparou as intensidades entre as pupas parasitadas com a idade de 24 horas e as não parasitadas com 48 horas (figura 5).

### ***Trichospilus diatraeae***

O total de hemócitos circulantes na hemolinfa de *A. gemmatalis* não alterou em pupas com 24 e 48 horas de idade não parasitadas com  $147,70 \times 10^4$   $\text{mL}^{-1}$  e  $152,37 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Por outro lado houve uma redução destas células na hemolinfa de *A. gemmatalis* seguido pelo parasitismo por *T. diatraeae* em pupas com 24 e 48 horas para  $91,12 \times 10^4$  e  $115,85 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente (Figura 6).

As idades não influenciaram o número de granulócitos na hemolinfa de *A. gemmatalis* com  $87,38 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  com 24 horas e  $70,92 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  para, 48 horas. No entanto, a quantidade deste tipo de célula foi de  $58,10 \times 10^4$   $\text{mL}^{-1}$  em pupas com 24 horas de idade parasitadas por *T. diatraeae* foi menor que as não parasitadas nesta idade. Por outro lado, granulócitos circulantes na hemolinfa de pupas de *A. gemmatalis* com 48 horas parasitadas por *T. diatraeae* foram semelhantes às não

parasitadas com a mesma idade ou 48 horas (Figura 7).

Diferenças entre as idades de pupas de *A. gemmatalis* parasitadas por *T. diatraeae* foram constatadas para o número de plasmatócitos circulantes na hemolinfa com  $16,92 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  e  $29,75 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  em pupas com 24 e 48 horas de idade, respectivamente. O número de plasmatócitos reduziu de  $39,78 \times 10^4$  para  $16,92 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  em pupas com 24 e de  $48,88 \times 10^4$  para  $29,75 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  naquelas com 48 horas. No entanto, a idade do hospedeiro não influenciou na quantidade dessas células na hemolinfa de pupas não parasitadas (Figura 8).

O parasitismo afetou o número dos outros tipos de células circulantes na hemolinfa de *A. gemmatalis* com 24 horas de idade. Isso foi semelhante ao que ocorreu em pupas com 48 horas que foram parasitadas por *T. diatraeae* (Figura 9). Por outro lado, a idade não provocou alteração dessas células nas pupas não parasitadas.

Pupas com 24 e 48 horas apresentaram encapsulação/melanização semelhantes. Pupas com 24 horas parasitadas por *T. diatraeae* tiveram menor encapsulação comparadas às parasitadas com 48 horas de idade (Figura 10). O parasitismo não induziu menor encapsulação comparado às pupas não parasitadas em ambas as idades.

## DISCUSSÃO

A redução do número de hemócitos circulantes na hemolinfa de *A. gemmatalis*, principalmente granulócitos e plasmatócitos, que possuem um papel chave na imunidade em espécies de Lepidoptera (Lavine & Strand, 2002), é a alteração fisiológica que ocorre após o parasitismo por *P. elaeisis* ou *T. diatraeae*, sugerindo, uma supressão da defesa do hospedeiro. Redução semelhante foi induzida em pupas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) após serem parasitadas por *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), o que foi devido ao veneno do ovário

injetado com os ovos (Er et al., 2010), assim como em pupas de *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) parasitadas por *Pteromalus puparum* L. (Hymenoptera: Pteromalidae) (Cai et al., 2004).

Embora não tenha ocorrido aumento do número de hemócitos com a idade, a redução dessas células em *A. gemmatalis* com o parasitismo evidencia que *P. elaeisis* ou *T. diatraeae* atua sobre elas. Assim como ocorre em lagartas de *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Hymenoptera: Noctuidae) para suprimir o ataque de *Microplitis rufiventris* Kok. (Braconidae: Hymenoptera) em ínstares mais velhos (Hegazi & Khafagi, 2008). Isso porque o aumento do número dessas células é necessário para uma resposta imune eficiente como relatado para *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) parasitada *Leptopilina boulandi* Barbotin et al. (Hymenoptera: Figitidae) (Russo et al., 2001).

A idade do hospedeiro não influenciou a quantidade de hemócitos circulantes ou a capacidade de encapsulação. Relações com a imunidade e idade do hospedeiro são sugeridas como um dos fatores que determinam menor número de pupas que apresentam emergência de parasitóides (Pereira et al., 2009), o que pode ser a causa da menor viabilidade na produção massal em laboratório quando pupas de *A. gemmatalis* mais velhas são oferecidas a *P. elaeisis* ou *T. diatraeae* (dados não mostrados), associadas a fatores que atuam em conjunto com a defesa celular e humoral.

As semelhanças entre a encapsulação e o número de hemócitos independente das idades de pupas de *A. gemmatalis* podem ser relacionadas ao custo que a imunidade representa para o inseto (Bascuñán-García et al., 2010) e, devido ao intenso metabolismo na fase de pupa (Chapman, 1998; Zhang et al., 2004). A realocação de recursos para a defesa na pupa poderia comprometer a sobrevivência, reprodução e competição do inseto adulto no ambiente (Schmid-Hempel, 2003; Rantala et al., 2004;

Gershman et al., 2010). Isso ocorre porque a taxa metabólica nas pupas aumenta com a invasão do organismo como demonstrado em *Pieris brassicae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) (Freitak et al., 2003).

*Palmistichus elaeisis* e *T. diatraeae* afetaram a quantificação dos hemócitos do hospedeiro. Estratégias de controle fisiológico do hospedeiro por parasitóides têm sido estudadas para entender os fatores que governam estas interações (Uckan et al., 2004; Suzuki & Tanaka, 2007; Carton et al., 2008; Huang et al., 2009) e essas tem conduzido efeitos também em hemócitos (Cai et al., 2004; Teramoto & Tanaka, 2004; Ibrahim & Kim, 2006; Huang et al., 2009). Por outro lado, o reconhecimento e encapsulação de organismos invasores por hemócitos e a ativação da cascata de fenoloxidase é uma das principais estratégias que ocorre em artrópodes. No entanto, para essa defesa, recursos energéticos são necessários para ativar e manter em níveis apropriados essas defesas em hospedeiro (Schmid-Hempel, 2003).

## CONCLUSÕES

*Palmistichus elaeisis* e *T. diatraeae* induziram modificações na quantidade dos hemócitos de pupas de *A. gemmatalis* sem redução da taxa de encapsulação.

Pupas de *A. gemmatalis* não apresentaram diferenças na quantidade de hemócitos em função da idade de 24 ou 48 horas, o que sugere que outros fatores podem atuar nesta defesa.

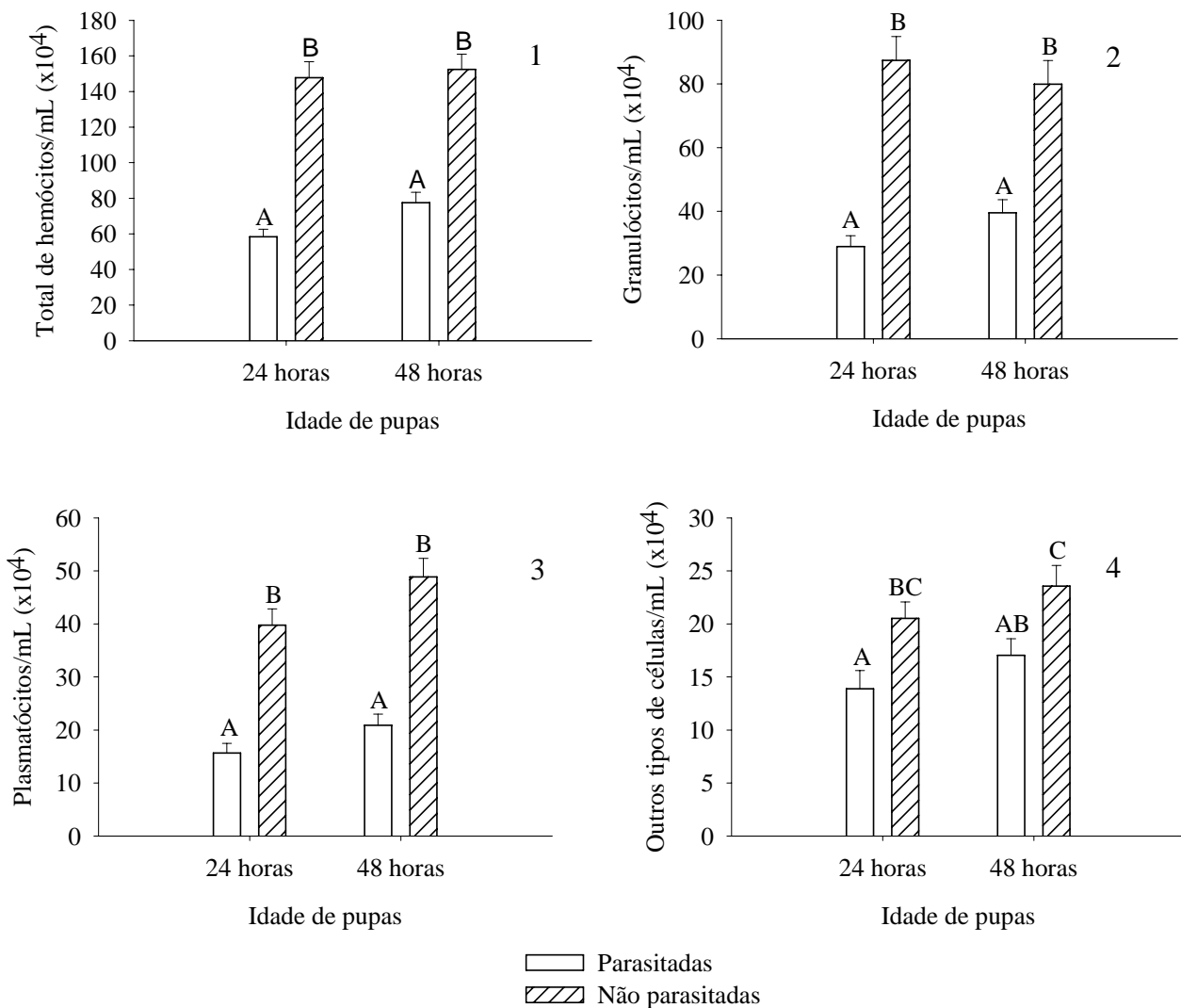


Figura 1-4 Hemócitos circulantes na hemolinfa de pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitadas ou não por *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). 1. Total de hemócitos. 2. Granulócitos. 3. Plasmatócitos 4. Outros tipos de células. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre parasitados e não-parasitados e entre idades do hospedeiro pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

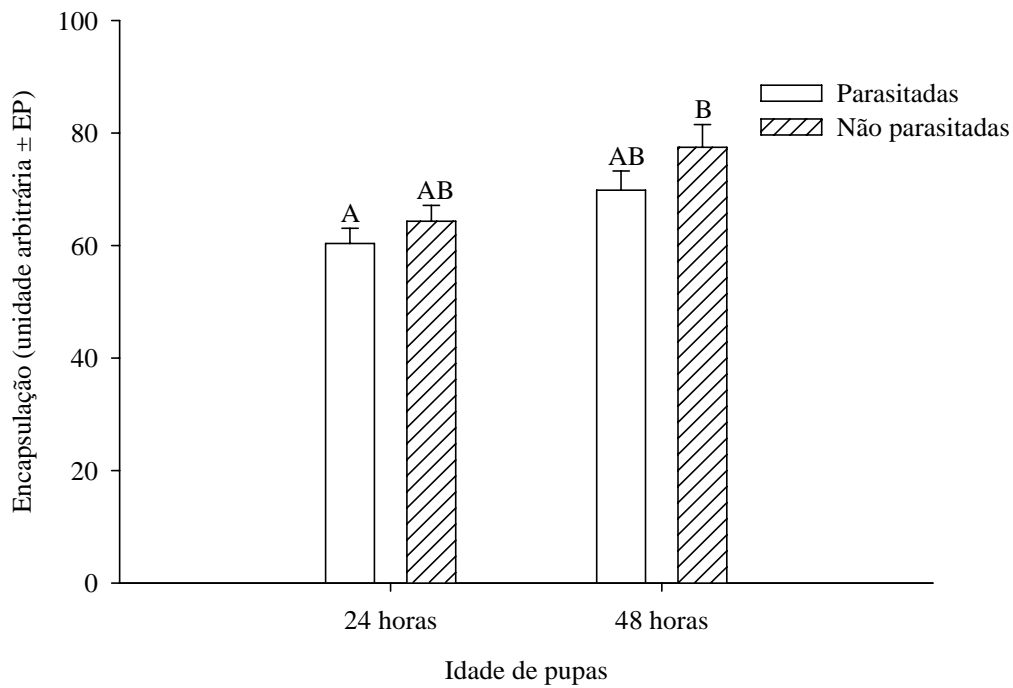


Figura 5- Encapsulação de pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitadas ou não por *Palmistichus elaeis* (Hymenoptera: Eulophidae). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre parasitados e não-parasitados e entre idades do hospedeiro pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

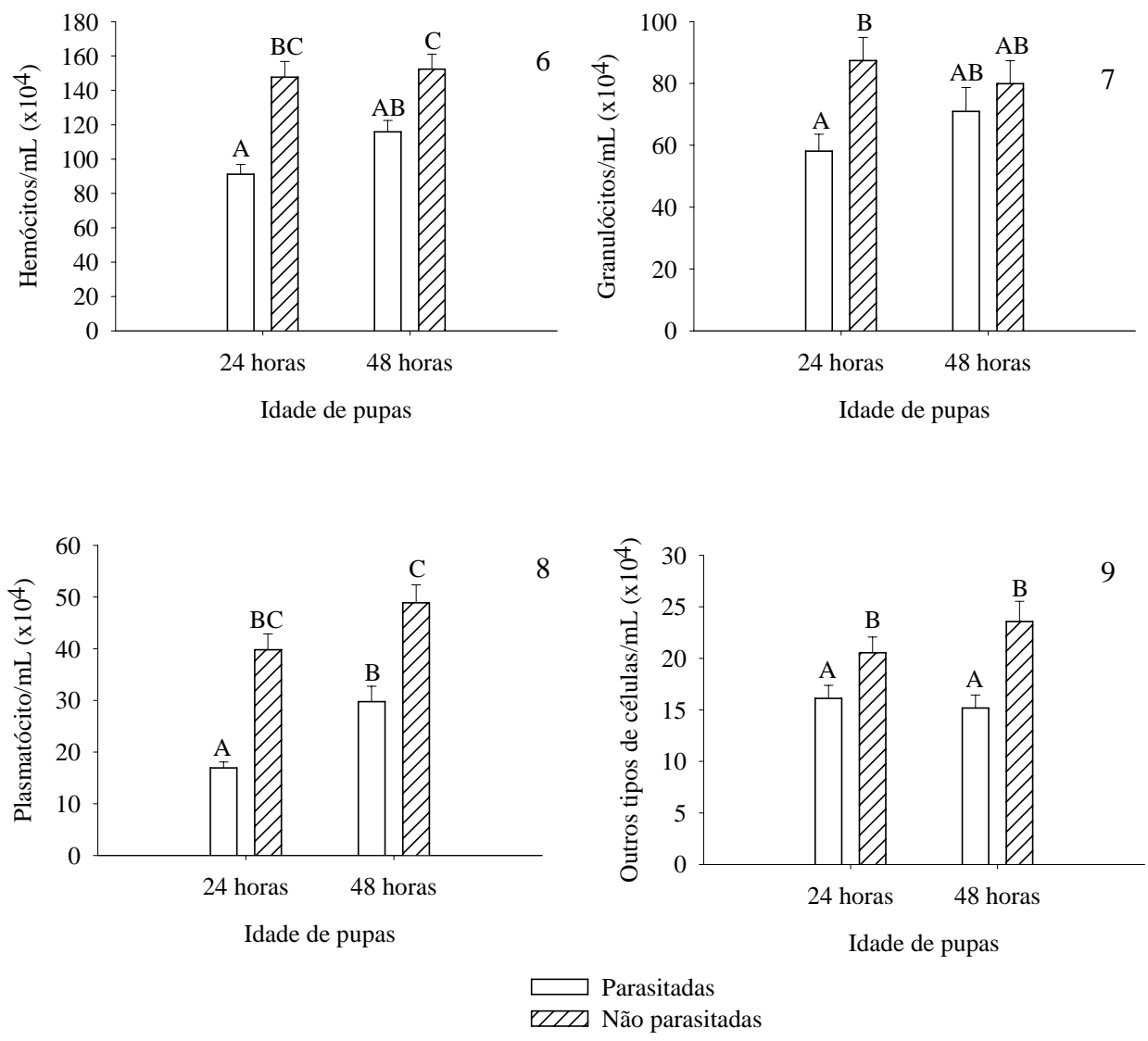


Figura 6- 9 Hemócitos circulantes na hemolinfa de pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitadas ou não por *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). 1. Total de hemócitos. 2. Granulócitos. 3. Plasmatócitos 4. Outros tipos de células. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre parasitados e não-parasitados e entre idades do hospedeiro pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

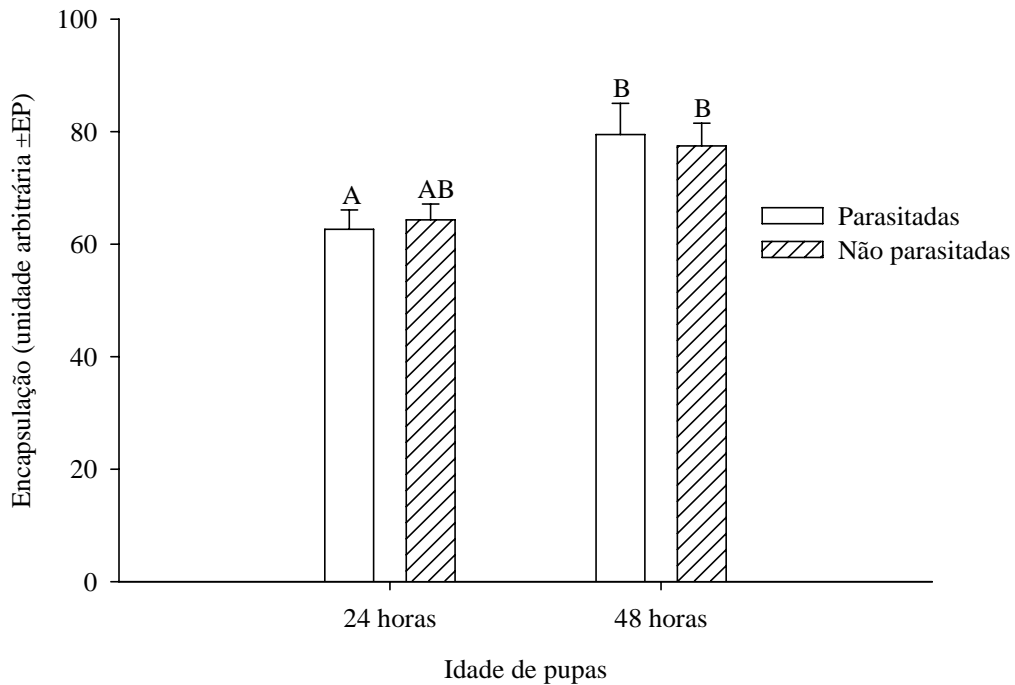


Figura 10- Encapsulação de pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitadas ou não por *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre parasitados e não-parasitados e entre idades do hospedeiro pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

Fêmeas de *P. elaeisis* e *T. diatraeae* reduzem a imunidade do hospedeiro alternativo, *A. gemmatalis*. O maior número de parasitóides por pupa provoca uma diminuição no número de hemócitos circulantes na hemolinfa desse hospedeiro alternativo, provavelmente devido a maior injeção de substância tóxica do trato reprodutivo com a oviposição, o que garante um ambiente adequado ao desenvolvimento das formas imaturas do parasitóide. Por outro lado, as idades dos parasitóides e hospedeiro alternativo também influenciam nesta interação.

*Palmistichus elaeisis* na idade de 72 horas e *T. diatraeae* com 24 horas possuem maior propabilidade de sucesso reprodutivo pela maior capacidade de oviposição, indicada pela presença de ovócitos bem formados nos ovários de fêmeas destes parasitóides e maior inibição de hemócitos circulantes na hemolinfa de *A. gemmatalis*. O envelhecimento pode contribuir com a menor eficiência na produção desses parasitóides, devido a absorção de ovócitos e menor inibição da defesa do hospedeiro. Vale ressaltar que a absorção de ovócitos nesses parasitóides pode ser uma estratégia reprodutiva pela falta de hospedeiros disponíveis ou pela exigência de recursos energéticos. No entanto, a absorção de ovócitos também pode indicar indiretamente uma redução da capacidade dos parasitóides em superar as defesas de seus hospedeiros, sugerindo menor desempenho no parasitismo.

*Palmistichus elaeisis* e *T. diatraeae* afetaram a quantidade dos hemócitos do hospedeiro. Entretanto, a idade do hospedeiro de maneira geral, não influenciou a sua defesa contra o parasitismo através de hemócitos ou encapsulação. Pupas mais novas são melhores para o desenvolvimento de *P. elaeisis* e *T. diatraeae* em criação em laboratório. Por outro lado, as causas para esse melhor desenvolvimento não é explicado

pelas análises de número de hemócitos e encapsulação. A semelhança entre o número de hemócitos e encapsulação entre pupas com 24 e 48 horas de idade pode ser respondida pelo custo adaptativo que pupas de *A. gemmatalis* teriam se fossem utilizados recursos para ativar e manter uma maior produção de células de defesa ou de fatores humorais. A organização dos tecidos e órgãos dessas pupas poderia atuar indiretamente como uma defesa, resultado em menor sucesso reprodutivo de *P. elaeisis* e *T. diatraeae* em pupas de *A. gemmatalis*.

Em conclusão, os parasitóides *P. elaeisis* e *T. diatraeae* suplantam a resposta imune do hospedeiro alternativo, *A. gemmatalis*, quando em maiores densidades e nas idades de maior fecundidade, sem efeito da idade do hospedeiro.

## REFERÊNCIAS

- Abdel-Latif, M. & M. Hilker. 2007. Innate immunity: eggs of *Manduca sexta* are able to respond to parasitism by *Trichogramma evanescens*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **38**: 136-145.
- Amaya, K.E., S. Asgari, R. Jung, M. Hongskula & N.E. Beckage. 2005. Parasitization of *Manduca sexta* larvae by the parasitoid wasp *Cotesia congregata* induces an impaired host immune response. **Journal of Insect Physiology** **51**: 505-512.
- Andrade, G.S., D. Pratisoli, J.B. Torres, R. Barros, L.P. Dalvi & H.B. Zago. 2009. Parasitismo de ovos de *Heliothis virescens* por *Trichogramma* spp. pode ser afetado por cultivares de algodão. **Acta Scientiarum. Agronomy** **31**: 569-573.
- Andrade, G.S.; Pratisoli, D.; Barros, R.; Zago, H.B. ; Pereira, A.I.A.; Dalvi, L.P. Screening of two *Trichogramma* species, native to southeastern Brazil, for the control of tobacco budworm. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 36, n.1, p. 16-19, 2010.
- Asgari, S., O. Schmidt & U. Theopold. 1997. A polydnavirus-encoded protein of an endoparasitoid wasp is an immune suppressor. **Journal of General Virology** **78**: 3061-3070.
- Asgari, S., U. Theopold, C. Wellby & O. Schmidt. 1998. A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **95**: 3690-3695.
- Bae, S. & Y. Kim. 2004. Host physiological changes due to parasitism of a braconid wasp, *Cotesia plutellae*, on diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A** **138**: 39-44.

- Barboriak D.P., A.O. Padua, G.E. York & J.R. MacFall. 2005. Creation of DICOM: aware applications using ImageJ. **Journal of Digital Imaging 18**: 91-99.
- Bascuña-García, A.P., C. Lara, A. Córdoba-Aguilar. 2010. Immune investment impairs growth, female reproduction and survival in the house cricket, *Acheta domesticus*. **Journal of Insect Physiology 56**: 204-211.
- Beck, M., U. Theopold & O. Schmidt. 2000. Evidence for serine protease inhibitor activity in the ovarian calyx fluid of the endoparasitoid *Venturia canescens*. **Journal of Insect Physiology 46**: 1275-1283.
- Beckage, N.E. & D.B. Gelman. 2004. Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. **Annual Review of Entomology 49**: 299-330.
- Bennett, F.D., H. Glenn, M. Yaseen & R.M. Baranowski. 1987. Records of *Trichospilus diatraeae*, an Asian parasite (Hymenoptera: Eulophidae) from the Caribbean and Florida. **Florida Entomologist 70**: 184-186.
- Bodin, A., B. Jaloux, J.P. Delbecq, F. Vannier, J.P. Monge & N. Mondy. 2009. Reproduction in a variable environment: How does *Eupelmus vuilleti*, a parasitoid wasp, adjust oogenesis to host availability? **Journal of Insect Physiology 55**: 643-648.
- Bodin, A., B. Jaloux, N. Mandon, F. Vannier, J.P. Delbecq, J.P. Monge & N. Mondy. 2007. Host-induced ecdysteroids in the stop-and-go oogenesis in a synovigenic parasitoid wasp. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology 65**: 103-111.
- Borges, A.R., P.N. Santos, A.F. Furtado & R.C.B.Q. Figueiredo. 2008. Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **Micron 39**: 486-494.

- Cai, J., G.Y. Ye & C. Hu 2004. Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) by a pupal endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): effects of parasitization and venom on host hemocytes. **Journal of Insect Physiology** **50**: 315-322.
- Carton, Y., M. Poirié & A.J. Nappi. 2008. Insect immune resistance to parasitoids. **Insect Science** **15**: 67-87.
- Cerenius, L., B.L. Lee & K. Söderhäll. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in Immunology** **29**: 263-71.
- Chapman RF. 1998. *The insects: structure and function*. 4 th edition, Elsevier.
- Cheng T.C., Y.L. Zhang, C. Liu, P.Z. Xu, Z.H. Gao, Q.Y. Xia & Z.H. Xiang. 2008. Identification and analysis of toll-related genes in the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. **Developmental and Comparative Immunology** **32**: 464-475.
- Cotter S.C., L.E.B. Kruuk & K. Wilson. 2004. Costs of resistance: genetic correlations and potential trade-offs in an insect immune System. **Journal of Evolutionary Biology** **17**: 421-429.
- Cullen, R., K.D. Warner, M. Jonsson & S.D. Wratten. 2008. Economics and adoption of conservation biological control. **Biological Control** **45**: 272-280.
- Dong, S.Z., G.Y. Ye, P.C. Yao, Y.L. Huang, X.X. Chen, Z.C. Shen & C. Hu 2008. Effects of starvation on the vitellogenesis, ovarian development and fecundity in the ectoparasitoid, *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Insect Science** **15**: 429-440.
- Er, A., F. Uçkan, D.B. Rivers, E. Ergin & O. Sak. 2010. Effects of parasitization and envenomation by the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) on hemocyte numbers, morphology, and viability of its host

- Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Annals of the Entomological Society of America** **103**: 273-282.
- Falabella, P., L. Riviello, M.L. De Stradis, C. Stigliano, P. Varricchio, A. Grimaldi, M. Eguileor, F. Graziani, S. Gigliotti & F. Pennacchio. 2009. *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **39**: 801-813.
- Firlej, A., E. Lucas, D. Coderre & G. Boivin. 2007. Teratocytes growth pattern reflects host suitability in a host – parasitoid assemblage. **Physiological Entomology** **32**: 181–187.
- Freitak, D., I. Ots, A. Vanatoa & P. Hõrak. 2003. Immune response is energetically costly in white cabbage butterfly pupae. **Proceedings of the Royal Society B (Suppl.)** **270**: 220-222.
- Gershman S.N., C.A. Barnett, A.M. Pettinger, C.B. Weddle, J. Hunt, S.K. Sakaluk. 2010. Give 'til it hurts: trade-offs between immunity and male reproductive effort in the decorated cricket, *Gryllodes sigillatus*. **Journal of Evolutionary Biology** **23**: 829-839.
- Greene, G.L., N.C. Leppla & W.A. Dickerson. 1976. Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial diet. **Journal of Economic Entomology** **69**: 487-488.
- Greene, G.L., N.C. Leppla & W.A. Dickerson. 1976. Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial diet. **Journal of Economic Entomology** **69**: 487-488.
- Hegazi, E. & W. Khafagi. 2008. The effects of host age and superparasitism by the parasitoid, *Microplitis rufiventris* on the cellular and humoral immune response of *Spodoptera littoralis* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology** **98**: 79-84.
- Hoch G., L. F. Solter & A. Schopf. 2004. Hemolymph melanization and alterations in hemocyte numbers in *Lymantria dispar* larvae following infections with different

- entomopathogenic microsporidia. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **113**: 77-86.
- Holtz, A.M., A. Pallini, M. Venzon, J.C. Zanuncio, D. Pratissoli, W.F. Barbosa & G.S. Andrade. 2010. Antibiosis of Eucalyptus plants on *Podisus nigrispinus*. **Phytoparasitica** **38**: 133-139.
- Huang, F., M. Shi, Y.Y. Yang, J.Y. Li & X.X. Chen. 2009. Changes in hemocytes of *Plutella xylostella* after parasitism by *Diadegma semiclausum*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** **70**: 177-187.
- Huebner, E. 1981. Oocyte-follicle cell interaction during normal oogenesis and atresia in an insect. **Journal of Ultrastructural Research** **74**: 95-104.
- Ibrahim, A.M.A. & Y. Kim 2006. Parasitism by *Cotesia plutellae* alters the hemocyte population and immunological function of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Insect Physiology** **52**: 943-950.
- Ishii, K, H. Hamamoto, M. Kamimura, K. Sekimizu. 2008. Activation of the silkworm cytokine by bacterial and fungal cell wall components via a reactive oxygen species-triggered mechanism. **Journal of Biological Chemistry** **283**: 2185-2191.
- Jervis, M.A., G.E. Heimpel, P.N. Ferns, J.A. Harvey & N.A.C. Kidd. 2001. Life-history strategies in parasitoid wasps: a comparative analysis of 'ovigeny'. **Journal of Animal Ecology** **70**: 442-458.
- Jervis, M.A., J. Ellers & J.A. Harvey. 2008. Resources acquisition, allocation, and utilisation in parasitoid reproductive strategies. **Annual Review of Entomology** **53**: 361-385.
- Jiravanichpaisal, P., B.L. Lee & K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology** **211**: 213-236.

- Jonsson, M., S.D. Wratten, D.A. Landis & G.M. Gurr. 2008. Recent advances in conservation biological control of arthropods by arthropods. **Biological Control** **45**: 172-175.
- Kaeslin, M, R. Pfister-Wilhelm, D. Molina & B. Lanzrein. 2005. Changes in the haemolymph proteome of *Spodoptera littoralis* induced by the parasitoid *Chelonus inanitus* or its polydnavirus and physiological implications. **Journal of Insect Physiology** **51**: 975–988.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **32**: 1295-1309.
- Li, B. & N. Mills. 2004. The influence of temperature in size as an indicator of host quality for the development of a solitary koinobiont parasitoid. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **110**: 249-256.
- Li, Y., J.F. Lu, C.J. Feng, X. Ke & W.J. Fu 2007. Role of venom and ovarian proteins in immune suppression of *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae parasitized by *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid. **Insect Science** **14**: 93-100.
- Lukianchuk, J.L. & S. M. Smith. 1997. Influence of plant structural complexity on the foraging success of *Trichogramma minutum*: a comparison of search on artificial and foliage models. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **84**: 221-228.
- Mabiala-Moundougou, A.D.N., G. Doury, P. Eslin, A. Cherqui & G. Prevost. 2010. Deadly venom of *Asobara japonica* parasitoid needs ovarian antidote to regulate host physiology. **Journal of Insect Physiology** **56**: 35-41.
- Martins, G.F. & J.E. Serrão. 2004. Changes in the reproductive tract of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) queen after mating. **Sociobiology** **44**: 241-254.

- Mendel Z., A. Protasov, D. Blumberg, D. Brand, N. Saphir, Z. Madar & J. La Salle. 2007. Release and recovery of parasitoids of the eucalyptus gall wasp *Ophelimus maskelli* in Israel. **Phytoparasitica** **35**: 330-332.
- Moreira, M.D., M.C.F. Santos, E.B. Beserra, J.B. Torres & R.P. Almeida 2009. Parasitismo e superparasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Sitotroga cerealella* (Oliver) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology** **38**: 237-242.
- Nadeem S., M.Ashfaq, M. Hamed & S. Ahmed 2010. Optimization of short and long term storage duration for *Trichogramma chilonis* (Ishii) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) at low temperatures. **Pakistan Journal of Zoology** **42**: 63-67.
- Nalini, M., A.M.A. Ibrahim, I. Hwang & Y. Kim. 2009. Altered actin polymerization of *Plutella xylostella* (L.) in response to ovarian calyx components of an endoparasitoid *Cotesia plutellae* (Kurdjumov). **Physiological Entomology** **34**: 110-118.
- Nappi A.J. & E. Ottaviani. 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioessays** **22**: 469-480.
- Nappi, A.J. & B.M. Christensen. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **35**: 443-459.
- Narayanan, K. 2004. Insect defence: its impact on microbial control of insect pest. **Current Science** **86**: 800-814.
- Neto, F.C.M., J.C. Zanuncio, I. Cruz, R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2005. Progeny production and parasitism by *Campoletis flavicincta* (Hym.: Ichneumonidae) as affected by female ageing. **Biological Agriculture & Horticulture** **22**: 369-378.

- Oliveira, H.N., T.V. Zanuncio, J.C. Zanuncio & J.E. Serrão. 2008. The eucalypt defoliator *Thyrintea arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) protects its eggs from parasitism. **Biological Letters** **45**: 23-28.
- Papaj, D.R. 2000. Ovarian dynamics and host use. *Annual Review of Entomology* **45**: 423-448.
- Paranhos, B.J., M.D.Z Costa, S.M. Ovruski, R.M. Alves, L. Blummer & J.M.M. Walderi. 2008. Offspring in response to parental female densities in the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae). **Florida Entomologist** **91**: 628-635.
- Paron, M.R., E. Berti-Filho. 2000. Capacidade reprodutiva de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de diferentes hospedeiros (Lepidoptera). **Scientia Agricola** **57**: 355-358.
- Pastori P.L., L.B. Monteiro, M. Botton & D. Pratissoli. 2007. Parasitism capacity of *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera : Trichogrammatidae) reared under different temperatures on *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera : Tortricidae) eggs. **Neotropical Entomology** **36**: 926-931.
- Pech, L.L. & M.R. Strand, 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. **Journal of Cell Science** **109**, 2053–2060.
- Pennacchio, F. & M.R. Strand. 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. **Annual Review of Entomology** **51**: 233-58.
- Pereira F.P., R. Barros, D. Pratissoli, J.R.P. Parra. 2004. Biologia e exigências térmicas de *Trichogramma pretiosum* Riley e *T. exiguum* Pinto & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) criados em ovos de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology** **33**: 231-236.

- Pereira, F.F. & J. C. Zanuncio. 2005. *Palmistichus elaeisis*, uma alternativa de controle para a lagarta parda do eucalipto. **Manejo Integrado de Plagas & Agroecologia** **76**: 89-91.
- Pereira, F.F., J.C. Zanuncio, J.E. Serrão, H.N. Oliveira, K. Fávero & E.L.V. Grance. 2009. Progenie de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando pupas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) de diferentes idades. **Neotropical Entomology** **38**: 660-664.
- Pereira, F.F., J.C. Zanuncio, J.E. Serrão, P.L. Pastori & F.S. Ramalho. 2009. Reproductive performance of *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) with previously refrigerated pupae of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). **Brazilian Journal of Biology** **69**: 865-869.
- Pereira, F.F., J.C. Zanuncio, M. T. Tavares, P.L. Pastori, G.C. Jacques & E.F. Vilela. 2008. New record of *Trichospilus diatraeae* as a parasitoid of the eucalypt defoliator *Thyrinteina arnobia* in Brazil. **Phytoparasitica** **36**: 304-306.
- Pereira, F.F., T.V. Zanuncio, J.C. Zanuncio, D. Pratisoli & M.T. Tavares. 2008. Species of Lepidoptera defoliators of eucalypt as new hosts for the polyphagous parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Brazilian Journal of Biology**, **51**: 259-262.
- Pereira, F.F., J.C. Zanuncio, J.E. Serrão, T.V. Zanuncio, D. Pratisoli & P.L. Pastori. 2010. The density of females of *Palmistichus elaeisis* Delvare and LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) affects their reproductive performance on pupae of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências** **82**: 323-331.

- Pfister-Wilhelm, R. & B. Lanzrein. 2009. Stage dependent influences of polydnaviruses and the parasitoid larva on host ecdysteroids. **Journal of Insect Physiology** **55**: 707-715.
- Poirié, M., Y. Carton & A. Dubuffet. 2009. Virulence strategies in parasitoid Hymenoptera as an example of adaptive diversity. **Comptes Rendus Biologies** **332**: 311-320.
- Pratissoli D., A.F. Bueno, R.C.O.F. Bueno, J.C. Zanuncio & R.A. Polanczyk. 2009. *Trichogramma acacioi* parasitism capacity at different temperatures and factitious hosts. **Revista Brasileira de Entomologia** **53**: 151-153.
- Pratissoli, D., J.C. Zanuncio, U.R. Vianna, J.S. Andrade, T.B.M. Pinon & G.S. Andrade. 2005. Thermal requirements of *Trichogramma pretiosum* and *T. acacioi* (Hym.: Trichogrammatidae), parasitoids of the avocado defoliator *Nipteria panacea* (Lep.: Geometridae), in eggs of two alternative hosts. **Brazilian Archives of Biology and Technology** **48**: 523-523.
- Pratissoli, D., R.T. Thuler, G.S. Andrade, L.C.M. Zanotti & A.F. Silva. 2005. Estimativa de *Trichogramma pretiosum* para controle de *Tuta absoluta* em tomateiro estaqueado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **40**: 715-718.
- Prujssers, A.J., P. Falabella, J.H. Eum, F. Pennacchio, M.R. Brown & M.R. Strand 2009. Infection by a symbiotic polydnavirus induces wasting and inhibits metamorphosis of the moth *Pseudoplusia includens*. **Journal of Experimental Biology** **212**: 2998-3006.
- Rantala M.J. J. Honkavaara & J. Suhonen. 2010. Immune system activation interacts with territory-holding potential and increases predation of the damselfly *Calopteryx splendens* by birds. **Oecologia** **163**: 825-832.

- Rantala, M.J. & R. Kortet. 2004. Male dominance and immunocompetence in the field cricket (*Gryllus bimaculatus*). **Behavioral Ecology** **15**: 187-191.
- Rantala, M.J. & D.A. Roff. 2007. Inbreeding and extreme outbreeding cause sex differences in immune defence and life history traits in *Epirrita autumnata*. **Heredity** **98**: 329-336.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009.
- Reed, D.A., K.A. Luhring, C.A. Stafford, A.K. Hansen, J.G. Millar, L.M. Hanks & T.D. Paine. 2007. Host defensive response against an egg parasitoid involves cellular encapsulation and melanization. **Biological Control** **41**: 214-222.
- Renault, S., A. Petit, F. Bénédet, S. Bigot & Y. Bigot. 2002. Effects of the *Diadromus pulchellus* ascovirus, DpAV-4, on the hemocytic encapsulation response and capsule melanization of the leek-moth pupa, *Acrolepiopsis assectella*. **Journal of Insect Physiology** **48**: 297-302.
- Ribeiro, C. & M. Brehélin. 2006. Insect haemocytes: What type of cell is that? **Journal of Insect Physiology** **52**: 417-429.
- Richards, E.H. & J.P. Edwards. 2000. Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitoid, *Eulophus pennicornis*, is associated with a reduction in host haemolymph phenoloxidase activity. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology** **127**: 289-298.
- Rosenheim, J.A., S.J. Jepsen, C.E. Matthews, D.S. Smith & M.R. Rosenheim. 2008. Time limitation, egg limitation, the cost of oviposition, and lifetime reproduction by an insect in nature. **The American Naturalist** **172**: 486-496.

- Russo, J., M. Brehélin, Y. Carton. 2001. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **Journal of Insect Physiology** **47**: 167-172.
- Schmid-Hempel, P. 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. **Proceedings of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences** **270**: 357-366.
- Schmidt, O.; U. Theopold, N.E. Beckage. **Insect and vertebrate immunity: key similarities versus differences**. In: Beckage, N.E (Ed.). *Insect Immunology*, cap. 1, p. 1-23, 2008.
- Shelby, K.S. & B.A. Webb. 1999. Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity. **Journal of Insect Physiology** **45**: 507-514.
- Silva-Torres, C., I.T. Ramos Filho, J. B. Torres & R. Barros. 2009. Superparasitism and host size effects in *Oomyzus sokolowskii*, a parasitoid of diamondback moth. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **133**: 65-73.
- Soares, M.A., C.T. Gutierrez, J.C. Zanuncio, R.P.P. Pedrosa & A.S. Lorenzon. 2009. Superparasitismo de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) y comportamiento de defensa de dos hospederos. **Revista Colombiana de Entomología** **35**: 62-67.
- Soares, M.A., G.L.D. Leite, J.C. Zanuncio, S.L. Rocha, V.G.M. Sa, J.E. Serrão. 2007. Flight capacity, parasitism and emergence of five *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species from forest areas in Brazil. **Phytoparasitica** **35**: 314-318.
- Souza E. A., C.A. Neves, L.A.O. Campos, J.C. Zanuncio & Serrão, J.E. 2007. Effect of mating delay on the ovary of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) queens. **Micron** **38**: 471-477.

- Souza, D.J., A. Bezier, D. Depoix, J.M. Drezen & A. Lenoir. 2009. *Blochmannia* endosymbionts improve colony growth and immune defence in the ant *Camponotus fellah*. **BMC Microbiology** **9**: 29.
- Souza, D.J., J. Van Vlaenderen, Y. Moret & A. Lenoir. 2008. Immune response affects ant trophallactic behaviour. **Journal of Insect Physiology** **54**: 828-832.
- Stanley, D.W. & J.S. Miller. 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **119**: 1-13.
- Stefanini, M., C. DeMartino, & L. Zamboni, 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature** **216**: 173-174.
- Strand M.R. & L.L. Pech. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid host relationships. **Annual Review of Entomology** **40**: 31-56.
- Strand M.R. 2008. The insect cellular immune response. **Insect Science** **15**: 1-14.
- Suzuki M. & T. Tanaka. 2007. Development of *Meteorus pulchricornis* and regulation of its noctuid host, *Pseudaletia separata*. **Journal of Insect Physiology** **53**: 1072-1078.
- Tena, A., A. Kapranas, F. Garcia-Mari, & R.F. Luck. 2008. Host discrimination, superparasitism and infanticide by a gregarious endoparasitoid. **Animal Behaviour** **76**: 789-799.
- Teramoto, T. & T. Tanaka 2004. Mechanism of reduction in the number of the circulating hemocytes in the *Pseudaletia separata* host parasitized by *Cotesia kariyai*. **Journal of Insect Physiology** **50**: 1103-1111.
- Theopold, U., O. Schmidt, K. Söderhäll & M.S. Dushay. 2004. Coagulation in arthropods: defense, wound closure and healing. **Trends in Immunology** **25**: 289-294.

- Uckan, F., S. Sinan, S. Savasci & E. Ergin. 2004. Determination of venom components from the endoparasitoid wasp *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Annals of The Entomological Society of America** **97**: 775-780.
- Vainikka, A, M.J. Rantala, O. Seppälä & J. Suhonen. 2007. Do male mealworm beetles, *Tenebrio molitor*, sustain the honesty of pheromone signals under immune challenge? **Acta Ethologica** **10**: 63-72
- van Alphen & M.E. Visser. 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids, **Annual Review of Entomology** **35**: 59-79.
- Vass, E. & A. J. Nappi. 1998. Prolonged oviposition decreases the ability of the parasitoid *Leptopilina boulardi* to suppress the cellular immune response of its host *Drosophila melanogaster*. **Experimental Parasitology** **89**: 86-91.
- Vass, E., A.J. Nappi & Y. Carton, 1993. Comparative study of immune competence and host susceptibility in *Drosophila melanogaster* parasitized by *Leptopilina boulardi* and *Asobara tabida*. **Journal of Parasitology** **79**: 106-112.
- Wang, X.G., H. Nadel, M.W. Johnson, K.M. Daane, K. Hoelmer, V.M. Walton, C.H. Pickett, & K.R. Sime. 2009. Crop domestication relaxes both top-down and bottom-up effects on a specialist herbivore. **Basic and Applied Ecology** **10**: 216-227.
- Wu M.L., G.Y. Ye, J.Y. Zhu, X.X. Chen & C. Hu. 2008. Isolation and characterization of an immunosuppressive protein from venom of the pupa-specific endoparasitoid *Pteromalus puparum*. **Journal of Invertebrate Pathology** **99**:186-191.
- Yamamoto, D., R. Henderson, L.S. Corley & K. Iwabuchi. 2007. Intrinsic, inter-specific competition between egg, egg-larval, and larval parasitoids of plusiine loopers. **Ecological Entomology** **32**: 221-228.

- Zanuncio, J.C., F.F. Pereira, G.C. Jacques, M.T. Tavares & J.E. Serrão. 2008. *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), a new alternative host to rear the pupae parasitoid *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae). **Coleopterists Bulletin** **62**: 64-66.
- Zhang, G.M., O. Schmidt & S.A. Asgari. 2004. Novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes. **Journal of Biological Chemistry** **279**: 41580-41585.