

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

INFLUÊNCIA DO TABACO NA BIOLOGIA E COMPORTAMENTO DOS
PARASITOIDES *Habrobracon hebetor* (SAY) (HYM.: BRACONIDAE) E
Trichogramma pretiosum RILEY (HYM.: TRICHOGRAMMATIDAE) E DE *Ephestia*
spp. GUENÉE (LEP.: PYRALIDAE)

Cleder Pezzini
Biólogo/UNISC
Mestre em Fitotecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Sanidade vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Abril de 2021

CIP - Catalogação na Publicação

Pezzini, Cleder

Influência do tabaco na biologia e comportamento dos parasitoides *Habrobracon hebetor* (Say) (Hym.: Braconidae) e *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym.: Trichogrammatidae) e de *Ephestia* spp. Guenée (Lep.: Pyralidae) / Cleder Pezzini. -- 2021.

169 f.

Orientadora: Simone Mundstock Jahnke.

Coorientador: Andreas Köhler.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Controle Biológico. 2. Pós-colheita. 3. Traça-do-tabaco. 4. Nicotina. I. Jahnke, Simone Mundstock, orient. II. Köhler, Andreas, coorient. III. Título.

CLEDER PEZZINI
Bacharel em Ciências Biológicas - UNISC
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOCTOR EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 19.04.2021
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 23.07.2021
Por

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Orientadora
PPG Fitotecnia/UFRGS

CARLA ANDRÉA DELATORRE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

ANDREAS KÖHLER
Coorientador
PPG Tecnologia Ambiental/UNISC

JOSUÉ SANT'ANA
PPG Fitotecnia/UFRGS

DANIEL BERNARDI
PPG Entomologia/UFPEL

ADENEY DE FREITAS BUENO
EMBRAPA Soja

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me iluminar e me dar forças para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Aos meus pais Luiz Carlos Pezzini e Lúcia Maria Schneider Pezzini, por acreditarem no meu potencial e investir nos meus estudos. Vocês são os meus maiores exemplos de vida.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Simone Mundstock Jahnke, por ter aceitado trabalhar comigo, pelos ensinamentos, auxílio e atenção durante todo o doutorado. Muito obrigado!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Andreas Köhler, por todo apoio e suporte, por estar presente e participante no desenvolvimento deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos ao longo do doutorado. Muito obrigado!

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia pelo ensino e capacitação.

Aos professores do Departamento de Fitossanidade, em especial aos entomologistas Josué Sant'Ana e Luiza Rodrigues Redaelli, que foram tão importantes na minha formação acadêmica, transmitindo seus conhecimentos na área da entomologia ao longo de todas as disciplinas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado e taxa de bancada.

À empresa *Japan Tobacco International* (JTI) pelo suporte financeiro ao projeto e a equipe do Centro Mundial de Desenvolvimento Agrônomo, Extensão e Treinamento (ADET) pelo apoio logístico na liberação dos parasitoides junto aos produtores.

À grande amiga e colega Kássia Cristina Freire Zilch, que iniciou a graduação junto comigo, lá em 2009, muito obrigado pela amizade durante todos esses anos, por toda a ajuda e conversas infinitas durante as semanais viagens a Porto Alegre durante o mestrado e doutorado.

Um agradecimento especial a amiga e colega Eduarda Bender que também me ajudou muito, principalmente na correção ortográfica da tese.

A todos os bolsistas e estagiários que passaram pelo Laboratório de Entomologia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), e que estiveram junto comigo durante todo o doutorado, desde a implantação da criação dos insetos, até a realização de todos os bioensaios, inclusive em feriados e finais de semana. Muito obrigado de coração!

Às amigas e colegas Marina Rauber, Karine Schoeninger e Daniela da Costa e Silva com quem convivi, aprendi e dividi inúmeras experiências e conhecimentos.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico da UFRGS, agradeço pelas conversas e reuniões mensais, importantes na formação de um pesquisador.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram e ajudaram para que esse trabalho se tornasse realidade.

INFLUÊNCIA DO TABACO NA BIOLOGIA E COMPORTAMENTO DOS PARASITOIDES *Habrobracon hebetor* (SAY) (HYM.: BRACONIDAE) E *Trichogramma pretiosum* RILEY (HYM.: TRICHOGRAMMATIDAE) E DE *Ephestia* spp. GUENÉE (LEP.: PYRALIDAE)¹

Autor: Cleder Pezzini

Orientadora: Prof^a. Simone Mundstock Jahnke

Coorientador: Prof. Andreas Köhler

RESUMO

Os parasitoides *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) e *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) são agentes de controle biológico de *Ephestia* spp. Guenée, 1845 (Lepidoptera: Pyralidae) que causam danos ao tabaco seco e outros produtos armazenados. É conhecido que o sucesso do parasitismo está ligado a estratégias de busca, como pistas provenientes do hospedeiro ou substrato onde está inserido. Portanto, este estudo objetivou verificar a influência do tabaco sobre aspectos da biologia e comportamento dos parasitoides e das traças. Em laboratório, estudou-se a adição de classes e porcentagens de tabaco na dieta de criação de *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) e seu reflexo no comportamento e parasitismo de *H. hebetor*. Em olfatometria avaliou-se as respostas quimiotáticas de *H. hebetor* e *T. pretiosum*. No campo, o experimento foi conduzido em armazéns de produtores e indústria do tabaco, com liberação de *H. hebetor*. Classes de tabaco testadas, adicionados à dieta, em diferentes porcentagens, influenciaram no tempo de desenvolvimento e viabilidade de *E. kuehniella*. No entanto, hospedeiro criado em dieta com tabaco não afetou *H. hebetor*. Fêmeas de *H. hebetor* foram mais atraídas pelos odores dos substratos alimentares do seu hospedeiro do que ao controle (ar). Independentemente do tipo de dieta utilizada para a criação de *E. kuehniella*, as fêmeas foram responsivas às larvas, sem preferência. Também, fêmeas de *H. hebetor* com experiência de parasitismo, apresentaram maior atratividade às larvas hospedeiras, quando comparado aos substratos. Fêmeas de *T. pretiosum* não foram responsivas para tabacos secos com alta concentração de nicotina, quando contrastados com o controle (ar). Apenas mudas de tabaco, com e sem ovos do hospedeiro, atraíram o parasitoide. Fêmeas de *T. pretiosum* responderam positivamente aos voláteis do hospedeiro, mesmo com a presença do tabaco seco, entretanto, ao entrar em contato direto com alguns tipos e classes de tabacos não houve parasitismo e ocorreu alta mortalidade dos parasitoides. O número médio de adultos de *Ephestia* spp. capturados nas armadilhas de feromônio nos ambientes com liberação de *H. hebetor* em nível de produtor e indústria foram significativamente menores nos locais sem liberação, a partir da terceira e quinta semana. Os resultados indicam que o tabaco pode afetar a biologia de insetos herbívoros e o comportamento de busca e as taxas de parasitismo nos parasitoides.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (169f.) Abril, 2021.

**INFLUENCE OF TOBACCO ON THE BIOLOGY AND BEHAVIOR OF THE
PARASITIDS *Habrobracon hebetor* (SAY) (HYM.: BRACONIDAE) AND
Trichogramma pretiosum RILEY (HYM.: TRICHOGRAMMATIDAE), AND
Ephestia spp. GUENÉE (LEP.: PYRALIDAE)¹**

Author: Cleder Pezzini

Adviser: Prof^ª. Simone Mundstock Jahnke

Co-adviser: Prof. Andreas Köhler

ABSTRACT

The parasitoids *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) and *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) are agents of biological control of *Ephestia* spp. Guenée, 1845 (Lepidoptera: Pyralidae) species that cause damage to dry tobacco and other stored products. It is known that the success of parasitism is associated with search strategies, such as clues from the host or substrate where it is inserted. Therefore, this study aimed to investigate the influence of tobacco on aspects of the biology and behavior of parasitoids and moths. In laboratory, the addition of tobacco classes and percentages to the rearing diet of *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) and its reflex on the behavior and parasitism of *H. hebetor* were studied. Olfactometry evaluated the chemotaxic responses of *H. hebetor* and *T. pretiosum*. In field, the experiment were performed in tobacco farmers warehouses and the tobacco factory, with the release of *H. hebetor*. Tobacco classes, added to the diet, in different percentages, influenced the development time and viability of *E. kuehniella*. However, a host reared on tobacco diet did not affect the parasitoid. *Habrobracon hebetor* females were more attracted to the odors of their hosts food substrates than the control (air). Regardless of the type of diet used for the rearing of *E. kuehniella*, the females were responsive to the larvae, without preference. Also, *H. hebetor* females with parasitism experience, showed greater attractiveness to host larvae when compared to substrates. *Trichogramma pretiosum* females were not responsive to dry tobacco with a high concentration of nicotine, when contrasted with the control (air). Only tobacco seedlings, with and without host eggs, attracted the parasitoid. *T. pretiosum* females responded positively to the hosts volatiles, even with the presence of dry tobacco, however, when coming into direct contact with some types and classes of tobacco, there was no parasitism and a high parasitoid mortality. The average number of adults of *Ephestia* spp. captured in the pheromone traps in environments with the release of *H. hebetor* at the tobacco farmers warehouses and the tobacco factory level, were significantly lower than in places without release after the third and fifth week. The results indicate that tobacco can affect the biology of herbivorous insects and the search behavior and rates of parasitism in the parasitoids.

¹ Doctoral Thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (169p.) April, 2021.

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO..... 1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 3
	2.1 Fumicultura..... 3
	2.1.2 Interações da nicotina com herbívoros e inimigos naturais..... 6
	2.2 Principais pragas do tabaco armazenamento..... 9
	2.2.1 <i>Ephestia</i> spp..... 10
	2.3 Controle biológico de pragas de produtos armazenados..... 13
	2.4 Criação de parasitoides..... 15
	2.5 Braconidae – <i>Habrobracon hebetor</i> 17
	2.6 Trichogrammatidae – <i>Trichogramma pretiosum</i> 20
	2.7 Comunicação química em parasitoides..... 22
	2.7.1 Influência da aprendizagem no comportamento de busca..... 24
	2.8 Referências..... 27
3	ARTIGO 1 - Influence of a diet containing tobacco on the biology of <i>Ephestia kuehniella</i> (Lepidoptera: Pyralidae) and its parasitoid <i>Habrobracon hebetor</i> (Hymenoptera: Braconidae)..... 40
	Abstract..... 41
	Introduction..... 42
	Material and methods..... 45
	Results..... 49
	Discussion..... 52
	Acknowledgements..... 57
	References..... 57
4	ARTIGO 2 - Chemotaxis of <i>Habrobracon hebetor</i> (Say) (Hymenoptera: Braconidae) in response to larvae of <i>Ephestia kuehniella</i> (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) and host food substrate with tobacco..... 75
	Abstract..... 77
	Introduction..... 78
	Materials and methods..... 81
	Results..... 84
	Discussion..... 88
	Acknowledgements..... 93
	References..... 93

	Página	
5	Influence of tobacco on the behavior, parasitism and mortality of <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associated with eggs of <i>Ephestia kuehniella</i> (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae).....	101
	Abstract.....	103
	Introduction.....	104
	Material and methods.....	107
	Results.....	112
	Discussion.....	117
	Acknowledgements.....	122
	References.....	122
6	Efeito da liberação de <i>Habrobracon hebetor</i> (Say) (Hymenoptera: Braconidae) na infestação de <i>Ephestia</i> spp. Guenée (Lepidoptera: Pyralidae) em ambientes de armazenamento de tabaco.....	130
	Resumo.....	132
	Introdução.....	133
	Material e métodos.....	135
	Resultados.....	139
	Discussão.....	143
	Conclusão.....	148
	Agradecimentos.....	148
	Referências.....	148
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	155

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
ARTIGO 1	
1. Sugar and nicotine concentrations in each class of Virginia tobacco.....	65
2. Treatments evaluated according to the larvae diet (<i>Ephestia kuehniella</i>) of the original host of <i>Habrobracon hebetor</i> females and the larvae offered to parasitism.....	66
3. Biological data (mean \pm standard deviation) of <i>Ephestia kuehniella</i> reared in the different treatments and tobacco percentage at $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 20\%$ RH and 14-h photoperiod: Control: wheat flour diet. Tobacco 1: sugar 20.37%, nicotine 3.51%. Tobacco 2: sugar 17.60%, nicotine 1.58%. Tobacco 3: sugar 6.39%, nicotine 3.97%. Tobacco 4: sugar 4.57%, nicotine 1.07%.....	67
4. Reproductive parameters and adult longevity (mean \pm standard deviation) of <i>Ephestia kuehniella</i> under conditions of $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 20\%$ RH and 14-h photoperiod, recorded in the different treatments. Control: wheat flour diet. Tobacco 1: sugar 20.37%, nicotine 3.51%. Tobacco 2: sugar 17.60%, nicotine 1.58%. Tobacco 3: sugar 6.39%, nicotine 3.97%. Tobacco 4: sugar 4.57%, nicotine 1.07%.....	68
5. Number of larvae of <i>Ephestia kuehniella</i> paralyzed and parasitized (mean \pm standard deviation) by <i>Habrobracon hebetor</i> in the different treatments, under conditions of $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 20\%$ RH and 14-h photoperiod.....	69
6. Survival of <i>Habrobracon hebetor</i> (mean \pm standard deviation) in the larvae of <i>Ephestia kuehniella</i> in the different treatments, under conditions of $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 20\%$ RH and 14-h photoperiod.....	70
7. Mean numbers (\pm standard deviation) of larvae of <i>Ephestia kuehniella</i> that were reared in the different treatments that were paralyzed and parasitized and of the eggs laid on them by females of <i>Habrobracon hebetor</i> , under conditions of $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 20\%$ RH and 14-h photoperiod.....	71
ARTIGO 2	
1. Stored products and control (air) contrasted for attraction by <i>Habrobracon hebetor</i> females placed at each end of the olfactometer arms.....	83

	Página
2. Larvae of <i>Ephestia kuehniella</i> reared on different diets contrasted regarding attractiveness to <i>Habrobracon hebetor</i> females placed at each end of the olfactometer arms.....	83
3. <i>Ephestia kuehniella</i> larvae from different diets and stored products contrasted at each end of the olfactometer arms.....	84

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1. Níveis de nicotina e açúcar nas folhas de tabaco e forma de classificação do tabaco, estágio de maturação e qualidade. Adaptado de SINDITABACO (2017).....	5
2. Adulto e genitália de fêmea e macho de: A- <i>Ephestia elutella</i> ; B- <i>Ephestia kuehniella</i> ; C- <i>Ephestia cautella</i> . Adaptado de Heinrich (1956) e Lorini <i>et al.</i> (2010).....	11
3. Fêmea de <i>Habrobracon hebetor</i> ; B- Detalhe das veias da asa anterior e posterior. Adaptado de Martínez <i>et al.</i> (2009).....	18
4. Fêmea de <i>Trichogramma pretiosum</i> , ovipositando.....	21
ARTIGO 1	
1. Schematic diagram of the double choice arena for determining parasitism preferences of <i>Habrobracon hebetor</i>	72
2. Average number (\pm standard error) of adult <i>Ephestia kuehniella</i> that emerged over time in the different treatments. A – control, B – 5% tobacco added to the diet, C – 10%, D – 15%. Control: wheat flour diet. Tobacco 1: sugar 20.37%, nicotine 3.51%. Tobacco 2: sugar 17.60%, nicotine 1.58%. Tobacco 3: sugar 6.39%, nicotine 3.97%. Tobacco 4: sugar 4.57%, nicotine: 1.07%.....	73
3. Percentage of females of <i>Habrobracon hebetor</i> that emerged from larvae reared on either a diet of wheat flour or the same diet to which 5% tobacco added, which responded to simultaneously exposed larvae of <i>Ephestia kuehniella</i> fed on the above two diets, under conditions of $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $50 \pm 20\%$ RH 14-h photoperiod. Values in parentheses indicate the number of responses to each parasitism unit. (ns – no significant difference based on the χ^2 heterogeneity test, $p > 0.05$).....	74
ARTIGO 2	
1. Percentage of chemotaxic responses of <i>Habrobracon hebetor</i> females without experience, tested in double-choice olfactometer with <i>Ephestia kuehniella</i> food products. Numbers in parentheses represent the number of responsive or non-responsive insects (NR) in the treatments. Value followed by asterisk differs ($p < 0.05$) between treatments.....	85

2. Percentage of chemotaxic responses from *Habrobracon hebetor* females without experience with *Ephestia kuehniella* larvae reared on different diets tested in a double choice olfactometer. Numbers in parentheses represent the number of responsive and non-responsive insects (NR) in the treatments. Value followed by asterisk differs ($p < 0.05$) between treatments..... 86
3. Percentage of chemotaxic responses of *Habrobracon hebetor* females, without previous parasitism experience, to *Ephestia kuehniella* larvae tested in double-choice olfactometer with stored products and their host. Numbers in parentheses represent the number of responsive or non-responsive insects (NR) for treatments. Value followed by asterisk differs ($p < 0.05$) between treatments..... 87
4. Percentage of chemotaxic responses of *Habrobracon hebetor* females with previous parasitism experience to *Ephestia kuehniella* larvae tested in double-choice olfactometer with stored products and their host. Numbers in parentheses represent the number of responsive or non-responsive insects (NR) for treatments. Value followed by asterisk differs ($p < 0.05$) between treatments..... 87

ARTIGO 3

1. Percentage of chemotactic responses of females of *Trichogramma pretiosum* without parasitism experience evaluated for different types of tobacco in a double-choice olfactometer ($n = 40$). The numbers in parentheses are the number of responsive or nonresponsive (NR) insects to treatments. * indicate difference between treatments according to chi-square test ($p < 0.001$) from deviance analysis with binomial generalized linear model (GLM)..... 113
2. Percentage of chemotactic responses of females of *Trichogramma pretiosum* without parasitism experience evaluated for different types of tobacco infested or not with eggs of *Ephestia kuehniella* in a double-choice olfactometer ($n = 40$). The numbers in parentheses are the number of responsive or nonresponsive (NR) insects to treatments. * indicate difference between treatments according to chi-square test ($p < 0.001$) from deviance analysis with binomial generalized linear model (GLM)..... 113
3. Residence time (%) of females of *Trichogramma pretiosum* in the four arms of the olfactometer ($n = 40$). The numbers in parentheses are the number of nonresponsive (NR) insects. There was no significant difference ($p > 0.05$) according to the Friedman test..... 114
4. Average percentage (\pm SE) of apparent parasitism of *Trichogramma pretiosum* exposed to eggs of *Ephestia kuehniella* adhered to different surfaces. Control (white sheet of paper) ($n = 30$). Different lower case letters differ between treatments ($p \leq 0.05$) by Tukey test. * treatments excluded from the analysis since there was no variability, because of adult female mortality..... 115
5. Average percentage (\pm SE) of apparent parasitism of *Trichogramma pretiosum* exposed simultaneously to eggs of *Ephestia kuehniella* adhered to two different surfaces. Control (white sheet of paper) ($n = 30$). Different

lower case letters differ between treatments ($p \leq 0.05$) by Tukey test. * treatments excluded from the analysis since there was no variability, because of adult female mortality.....	116
6. Survival over time for adults of <i>Trichogramma pretiosum</i> exposed to eggs of <i>Ephestia kuehniella</i> fixed on different surfaces. Control (white sheet of paper) (n = 30). Different letters differ between treatments ($p \leq 0.05$) by Log rank test.....	117
 ARTIGO 4	
1. Quantidade média (\pm erro padrão) de tabaco armazenado por metro quadrado dentro dos dois armazéns ao longo das semanas durante as safras 2016-2017 e 2017-2018.....	138
2. Número médio (\pm erro padrão) de adultos de <i>Ephestia</i> spp. por armadilha capturados em paióis/galpões de produtores de tabaco, com (16 paióis) e sem liberação (6 paióis) de <i>Habrobracon hebetor</i> a cada semana (setas indicam quando ocorreu cada liberação = 1.000 parasitoides) nas três safras (A - 2016/2017 e B - 2017/2018). Barras com asterisco diferem significativamente entre os tratamentos pelo teste t ($p \leq 0,05$).....	141
3. Número médio (\pm erro padrão) de adultos de <i>Ephestia</i> spp. por armadilha capturados em dois armazéns na indústria, com e sem liberação de <i>Habrobracon hebetor</i> a cada semana (setas indicam quando ocorreu cada liberação = 30.000 parasitoides) nas duas safras (A - 2016/2017 e B - 2017/2018). Barras com asterisco diferem significativamente entre os tratamentos pelo teste t ($p \leq 0,05$).....	142
4. Correlação entre o volume de tabaco armazenado e número médio de adultos de <i>Ephestia</i> spp. capturados por armadilha a cada semana nos armazéns com e sem liberação de <i>Habrobracon hebetor</i> na indústria durante a safra 2016/2017.....	143

1 INTRODUÇÃO

Desde a produção das mudas até a pós-colheita do tabaco, há um conjunto de patógenos e insetos que atacam a cultura, causando perdas na produção, no rendimento e na qualidade. Durante a armazenagem, entre os insetos que acometem o tabaco seco, destacam-se *Ephestia* spp. Guenée, 1845 (Lepidoptera: Pyralidae).

Os métodos utilizados no controle destes insetos praga são restritos, baseando-se, de forma geral, na utilização de inseticidas, como a fosfina, que é altamente tóxica ao ser humano e ao ambiente. Com isso, eleva-se a necessidade de desenvolver novas tecnologias para serem adotadas como estratégias de manejo. O controle biológico é um exemplo, no qual utilizam-se inimigos naturais para diminuir populações de organismos que são considerados pragas em sistemas agrícolas, como no caso de parasitoides, que precisam de um hospedeiro específico para completar o ciclo de desenvolvimento, causando a morte da praga e assim controlando sua proliferação. Porém, a aplicação desses agentes biológicos na pós-colheita e armazenamento, como sistema de manejo, ainda é incipiente, havendo uma grande necessidade de pesquisas nesta área.

Na fumicultura, apesar de existirem alguns registros da ocorrência de parasitoides em armazéns com tabaco seco, há uma carência de informações sobre aspectos da biologia, parasitismo e comportamento destes agentes biológicos, que podem ser influenciados por diversos fatores, entre eles, dieta do hospedeiro, sua origem, ou ainda,

respostas aos voláteis do tabaco. Esse conhecimento pode fornecer dados importantes para a criação desses parasitoides e implantação de programas de controle biológico.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo conhecer aspectos da biologia e comportamento dos parasitoides *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) e *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitando *Ephestia* spp., enfatizando os seguintes aspectos: a) influência de diferentes proporções e classes de tabaco adicionados à dieta artificial de criação, sobre parâmetros biológicos do hospedeiro *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) e do parasitoide *H. hebetor*, assim como a preferência de parasitismo pelo hospedeiro de acordo com a dieta de origem; b) resposta quimiotáxica de fêmeas de *H. hebetor* com e sem experiência de parasitismo a sinais olfativos associados a produtos armazenados e à presença do hospedeiro *E. kuehniella* criado em diferentes dietas; c) resposta quimiotáxica, capacidade de parasitismo e mortalidade de fêmeas de *T. pretiosum* parasitando ovos de *E. kuehniella* na presença de diferentes tipos e classes de tabaco; d) efeito da liberação de *H. hebetor* no controle de *Ephestia* spp. em ambientes de armazenamento de tabaco em nível de produtor e indústria.

Os resultados da tese estão apresentados na forma de quatro artigos: 1) Influence of a diet containing tobacco on the biology of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) and its parasitoid *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae); 2) Chemotaxis of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) in response to larvae of *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) and host food substrate with tobacco; 3) Influence of tobacco on the behavior and biology of *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae); e, 4) Liberação de *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) para controle de *Ephestia* spp. Guenée (Lepidoptera: Pyralidae) em ambientes de armazenamento de tabaco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fumicultura

O Brasil representa o segundo maior mercado produtor de tabaco (*Nicotiana tabacum* L., Solanaceae), atrás apenas da China e mantém, há duas décadas ininterruptas, a liderança global quando o assunto é exportação (Santos *et al.*, 2017; Kist *et al.*, 2020). Em média, 83% da safra nacional é embarcada para mais de uma centena de países de todos os continentes (Beling, 2014; Mendes *et al.*, 2015). Apesar das exportações de tabaco em folha não apresentarem uma participação expressiva na balança comercial brasileira (Beling, 2014), esta cultura tem grande relevância na produção agrícola familiar e na renda gerada, particularmente na região Sul do Brasil, que respondeu por mais de 92% da produção nacional de tabaco em folha em 2019/20 (Kist *et al.*, 2020).

O tamanho médio das propriedades produtoras de tabaco no sul do Brasil é de 13,7 hectares, sendo que a cultura ocupa em média 20,8% da área (Neves, 2010; Mendes *et al.*, 2015). A renda do cultivo, porém, representa expressivos 53,1% da receita anual do produtor (Carvalho *et al.*, 2014). Essa proporção de retorno econômico explica por que 146 mil famílias de produtores se mantêm fiéis à atividade (Kist *et al.*, 2016; Kist *et al.*, 2018).

O Rio Grande do Sul é o maior polo de produção e beneficiamento de tabaco no Brasil, respondendo sozinho por cerca da metade da força nacional do setor e ocupando uma área de 127 mil hectares. Segundo a Associação dos Fumicultores do Brasil, são 73

mil famílias espalhadas por 219 municípios, de norte a sul do estado (AFUBRA, 2020). Na safra 2019/20, foram colhidas 243 mil toneladas de tabaco, volume que gerou aos agricultores uma receita de R\$ 2,1 bilhões (Kist *et al.*, 2020). Na região do Vale do Rio Pardo estão inseridas as principais empresas do setor fumageiro e os municípios com maior área de produção (Beling, 2014).

No Brasil são produzidos basicamente três tipos de tabaco, o Virgínia, conhecido como fumo de estufa, pois o processo de cura é feito em estufas e fornos com uso de lenha como fonte de energia e as variedades Burley e Comum, que são secos em galpões naturalmente (Silveira, 2013; Kist *et al.*, 2019). A variedade Virginia é responsável por aproximadamente 89,3% da produção nacional, enquanto Burley representa 9,3% e os restantes 1,4% correspondem ao dito “tabaco comum” que é utilizado para produção do fumo de corda (Kist *et al.*, 2020).

A produção de tabaco é dividida em algumas etapas-chave: produção de mudas (semeadura), transplante, crescimento em campo e colheita, além dos processos de cura, armazenamento e posterior comercialização (Oliveira & Costa, 2012). As folhas do tabaco são classificadas de acordo com a posição da planta, sendo as folhas localizadas na parte inferior chamadas de “baixeiras”, as intermediárias de “semimeeiras” e “meeiras” e as superiores de “ponteiras” (Collins & Hawks, 2011). Ainda de acordo com os mesmos autores, conforme a posição das folhas, a concentração de nicotina varia, sendo a parte inferior da planta com menor teor de nicotina e a parte superior, com maior. Diferentemente da nicotina, a concentração de açúcar é menor nas extremidades e maior nas folhas centrais da planta (Figura 1).

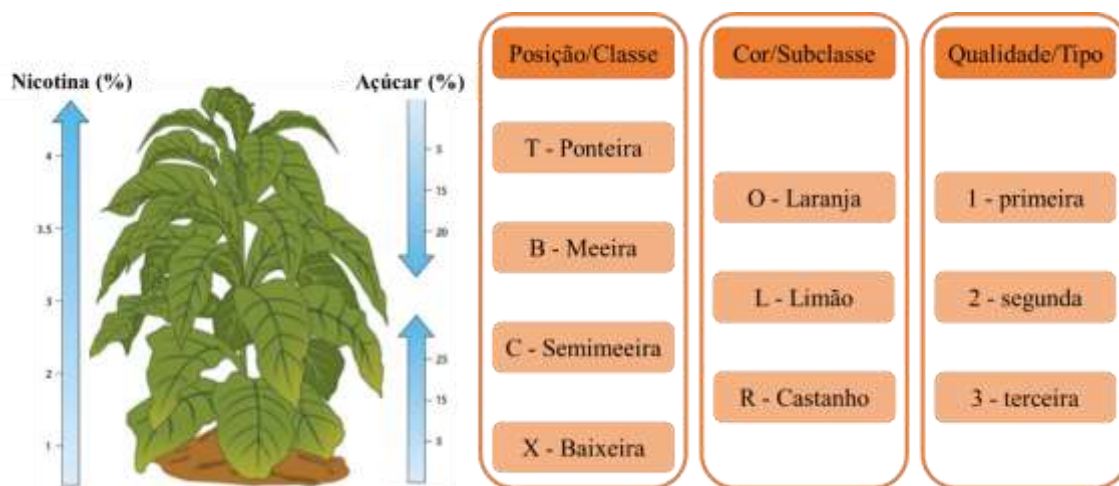


FIGURA 1. Níveis de nicotina e açúcar nas folhas de tabaco e forma de classificação do tabaco, estágio de maturação e qualidade. Adaptado de SINDITABACO (2017).

A nicotina é o principal alcaloide que se acumula nas folhas do tabaco (Nölke *et al.*, 2018). Em cultivares comerciais, a nicotina representa 90% a 95% de todos os alcaloides ou 2-5% do peso seco total da folha (Saitoh *et al.*, 1985). Esta é sintetizada nas raízes e transportada pelo xilema para as partes aéreas da planta onde se acumula e é armazenada no vacúolo das células da folha, podendo ser exsudada pelos tricomas (Hildreth *et al.*, 2011).

O acúmulo de nicotina na planta de tabaco aumenta na fase final do crescimento, especialmente após a remoção do ápice caulinar (Leffingwell, 2001). Além disso, ao iniciar a colheita das folhas inferiores também ocorre o aumento na concentração de nicotina nas folhas intermediárias e superiores da planta, indicando que a síntese de nicotina pode ser afetada por uma resposta a ferimentos mecânicos (Rodgman & Perfetti, 2013). O ferimento mecânico, através de uma mudança no fluxo de auxina, é responsável pelo aumento da concentração de nicotina nas folhas do tabaco (Shi *et al.*, 2006).

2.1.2 Interações da nicotina com herbívoros e inimigos naturais

As interações inseto-planta destacam a importância evolutiva e ecológica das defesas químicas das plantas sobre herbívoros (Gajger & Dar, 2021). As plantas produzem um grande número de compostos que parecem não ter uma função aparente no desenvolvimento, crescimento ou reprodução. Esses compostos têm sido referidos como metabólitos secundários, com efeitos tóxicos para inúmeras espécies de insetos (Dicke, 2009). Os aleloquímicos vegetais são considerados parte do arsenal químico defensivo que as plantas desenvolveram para se proteger, podendo estar presentes ou serem ativados somente após o ataque de herbívoros (Mumm & Dicke, 2010).

Os aleloquímicos vegetais podem ser absorvidos pelo intestino ou tegumento do inseto e sua distribuição, disposição e taxa de eliminação depende do grau de associação com os compartimentos internos e da eliminação pré-sistêmica pela absorção de tecidos como o intestino e a epiderme (Snyder *et al.*, 1994). Uma vez absorvidos, um possível destino destes compostos é serem metabolizados e levados à excreção, nas fezes (Farnham *et al.*, 2007).

Existem vários aleloquímicos vegetais como cafeína, morfina, colchicina, ergolinas, estricnina, escopolamina, quinina e nicotina, que podem afetar a transmissão nervosa em insetos, perturbar a membrana celular ou a estrutura do citoesqueleto, causando o colapso e vazamento das células (Gajger & Dar, 2021). Em plantas de tabaco a nicotina, como já mencionado, é um metabólito de defesa secundária da planta e seu aumento é uma das respostas típicas das plantas para evitar ataques de insetos herbívoros (Leffingwell, 2001; Kessler & Baldwin, 2002). Essa substância, assim como os inseticidas do grupo dos neonicotinoides atuam como moduladores competitivos de receptores nicotínicos da acetilcolina e com efeito rápido levando à hiperexcitação do

sistema nervoso, podendo ser fatal para muitos insetos (Kessler & Baldwin, 2002; Reigart & Roberts 2013; Silva *et al.*, 2017).

A nicotina como sendo o principal alcaloide presente nas folhas do tabaco, pode ter efeitos, já registrados, sobre a biologia de herbívoros. As dietas à base de tabaco ou com adição de nicotina podem, por exemplo, prolongar o desenvolvimento e reduzir a viabilidade e sobrevivência de alguns lepidópteros praga como *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) (Lepidoptera: Noctuidae) (Gunasena *et al.*, 1990), *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (El-Heneidy *et al.*, 1988), *E. kuehniella* (Pezzini *et al.*, 2020) e *Ephestia elutella* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Pyralidae) (Wang *et al.*, 2021).

Apesar da sua toxicidade para a maioria dos insetos, algumas espécies conseguem ultrapassar essa barreira, tornando-se pragas na cultura, como é o caso do pulgão *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae), que evita a nicotina em plantas de tabaco ao se alimentar apenas do floema. Também a lagarta do tabaco *Manduca sexta paphus* (Cramer, 1779) (Lepidoptera: Sphingidae), consegue excretar a nicotina e outros alcaloides ingeridos antes que uma dose tóxica possa se acumular no organismo (Parr & Thurston, 1972; Morris, 1983; Snyder *et al.*, 1994). Os mecanismos que os insetos utilizam para controlar toxinas, como a nicotina, incluem penetração limitada, local de destino resistente e conversão bioquímica (Self *et al.*, 1964). A excreção rápida é outro mecanismo utilizado por alguns insetos, como *Lasioderma serricorne* (Fabricius, 1792) (Coleoptera: Ptinidae), para se livrar rapidamente de possíveis toxinas (Farnham *et al.*, 2007).

Os compostos que atuam como defesas das plantas contra herbívoros também podem ter impactos significativos em espécies do terceiro e quarto nível trófico (Harvey, 2007). Isso ocorre porque predadores e parasitoides, obtêm sua nutrição indiretamente

das plantas, através do consumo de suas presas ou hospedeiros. Consequentemente a presença de aleloquímicos na dieta de herbívoros pode afetar negativamente na morfologia, desenvolvimento, tamanho e sobrevivência dos inimigos naturais (Gunasena *et al.*, 1990; Barbosa *et al.*, 1986). Esses efeitos sobre parasitoides e predadores, por sua vez, podem alterar a ecologia das interações inimigo natural-herbívoro-planta (Barbosa *et al.*, 1991).

Os efeitos da nicotina no desenvolvimento de parasitoides foi estudada por Thurston e Fox (1972) e Barbosa *et al.* (1986) que incorporaram a nicotina em meio a dieta artificial do hospedeiro e por Thorpe e Barbosa (1986) que utilizou folhas de tabaco com alto teor de nicotina. Em cada uma dessas pesquisas, o consumo de nicotina pelo hospedeiro *M. sexta* afetou negativamente o desenvolvimento do parasitoide *Cotesia congregata* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) (Thurston & Fox, 1972). Além disso, vestígios de nicotina foram recuperados de parasitoides adultos, indicando que ela é armazenada nos tecidos das larvas e pré-pupas do parasitoide antes da eliminação do mecônio (Barbosa *et al.*, 1986; Harvey, 2007).

O efeito negativo da nicotina também foi observado em outros parasitoides, como *Campoletis sonorensis* (Cameron, 1886) (Hymenoptera: Ichneumonidae) criados sobre *H. virescens* alimentado com tabaco, no qual o parasitoide prolongou o desenvolvimento larval e baixou a emergência de adultos devido à mortalidade do hospedeiro parasitado (Gunasena *et al.*, 1990). À medida que a concentração de nicotina aumentou na dieta de criação de *S. frugiperda*, a mortalidade do parasitoide *Hyposoter annulipes* (Cresson 1864) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e o tempo de desenvolvimento também aumentaram e o peso do adulto diminuiu, sugerindo o efeito da nicotina sobre o parasitoide (El-Heneidy *et al.*, 1988).

Em geral, embora alguns aleloquímicos vegetais como a nicotina, possam ter efeitos significativos sobre os parasitoides e, portanto, na ecologia das interações inimigo natural-herbívoro-planta, outros aleloquímicos vegetais como a hordenina e rutina, podem ter pouca ou nenhuma consequência (Barbosa *et al.*, 1991). Portanto, sugere-se que estratégias de controle biológico, envolvendo a liberação de parasitoides suscetíveis a estes compostos, podem ser incompatíveis em culturas que contenham altos níveis de aleloquímicos tóxicos (Thurston & Fox, 1972; Barbosa *et al.*, 1986; Thorpe & Barbosa, 1986), devendo ser avaliadas previamente.

2.2 Principais pragas do tabaco armazenamento

Depois de feita a cura, o tabaco é armazenado dentro de galpões ou paióis nas propriedades rurais, em filas duplas, com as pontas das folhas sempre para dentro da pilha e cobertas por lona ou aniagem, para evitar o reumedecimento das folhas. Desta forma fica estocado até o momento da venda, período que pode alcançar até seis meses (Collins & Hawks, 2011). Nesse período surgem insetos que causam perdas expressivas na qualidade do produto (Guedes & Costa, 2006; Guedes & Sulzbach, 2006).

Apesar dos danos causados por insetos durante o armazenamento serem elevados, é difícil quantificá-los, sendo que em grandes culturas como soja, milho e arroz essas perdas podem variar de 2 a 12% (Zucchi & Silveira Neto, 2012; Nayak & Daglish, 2018). Entretanto, devido à falta de dados detalhados na cultura do tabaco estima-se que aproximadamente 3% da produção é perdida devido à presença destes insetos na armazenagem (Li & Yu, 1993; Carvalho *et al.*, 2003), valor que representou 25 milhões de dólares na safra 2019/20 (Kist *et al.*, 2020). Conforme Krsteska e Stojanoski (2013) e Krsteska (2014), durante o período de armazenamento do tabaco existem dois grupos de insetos que causam danos expressivos, o besouro *L. serricorne*, popularmente chamado

de bicho-do-fumo ou besouro-do-fumo, encontrado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Edde, 2018) e mariposas.

Dentre as espécies de mariposa estão *E. elutella* chamada popularmente de “traça-do-fumo”, *E. kuehniella*, *Ephestia cautella* (Walker, 1863) e *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813) (Lepidoptera: Pyralidae) conhecidas como traça-das-farinhas, traça-do-cacau e traça-indiana-da-farinha, respectivamente (Guedes & Costa, 2006; Edde, 2018). Todas essas espécies de mariposas ocorrem em conjunto, em diferentes proporções, porém sua identificação é complexa. As traças são consideradas pragas secundárias, pois as larvas se desenvolvem sobre resíduos de grãos e outros produtos armazenados deixados pela ação de outras pragas (Athié & Paula, 2002; Ou *et al.*, 2019). No entanto, no tabaco são praga primárias, alimentando-se diretamente das folhas secas. Seu ataque também prejudica a qualidade dos produtos por causa da formação de uma teia na superfície dos mesmos, que serve de refúgio para outros insetos e pode causar problemas operacionais em equipamentos durante o beneficiamento (Loeck, 2002; Krsteska, 2014).

2.2.1 *Ephestia* spp.

As mariposas *Ephestia* spp. são largamente distribuídas em todas as regiões do mundo, sendo que no Brasil, estão presentes em todas as regiões produtoras de grãos ocorrendo durante o ano todo, desde que exista disponibilidade de alimento para se desenvolverem (Lorini, 2012). Há inúmeros registros destas traças causando danos em vários produtos e grãos estocados como: trigo (farinha), soja, milho (quirela), sorgo, aveia, arroz, cevada, tabaco, cacau, frutas secas, até produtos já processados como biscoito, bolachas, barras de cereais e chocolate (Lorini *et al.*, 2015).

As fêmeas ovipositam de 200 a 300 ovos. O período de ovo a adulto estende-se por aproximadamente 40 dias, com longevidade em torno de 10 dias, apresentando cerca

de sete gerações ao ano (Lorini *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2018). As espécies de *Ephestia* são muito semelhantes, sendo a genitália a única característica morfológica que as diferencia com clareza uma das outras (Figura 2) (Heinrich, 1956).

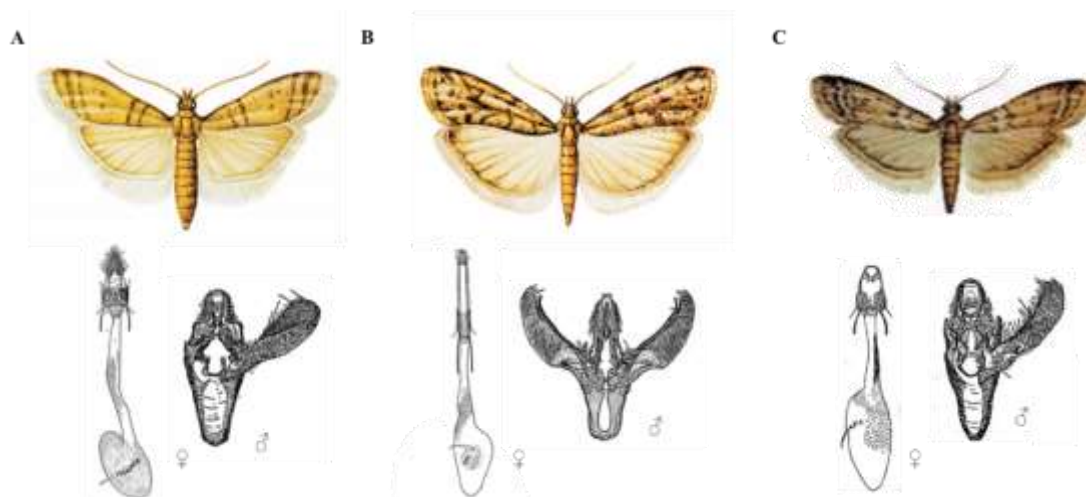


FIGURA 2. Adulto e genitália de fêmea e macho de: A- *Ephestia elutella*; B- *Ephestia kuehniella*; C- *Ephestia cautella*. Adaptado de Heinrich (1956) e Lorini *et al.* (2010).

Os ovos de *Ephestia* spp. são colocados isoladamente ou em pequenos grupos, sobre o substrato, onde, posteriormente, as larvas irão se alimentar. Possuem formato elíptico, com menos de um milímetro de diâmetro, coloração branca e cobertos por escamas da própria mariposa (Navarro & Navarro, 2018).

As larvas deste gênero são eucefálicas, com aparelho bucal bem desenvolvido, adaptado para mastigar. Depois de eclodir, são de coloração branca e com a troca dos cinco instares, ficam com uma cor bege e cabeça marrom (Lorini *et al.*, 2015). O corpo da larva é coberto de cerdas esparsas. São polípodes, com três pares de pernas torácicas (verdadeiras) e cinco abdominais (falsas pernas). O último estágio larval mede cerca de 8-14 mm (Athié & Paula, 2002). Antes da larva se transformar em pupa, ela tece um casulo esbranquiçado e sedoso. A pupa de coloração marrom claro no início do estágio

pupal, mais tarde, antes de emergir, fica mais escura, com cerca de 9-10 mm de comprimento (Krsteska, 2014; Navarro & Navarro, 2018).

Os adultos são mariposas pequenas, asas anteriores com coloração entre pardo para cinza e bandas transversais geralmente distintas. Alguns indivíduos possuem listras mais notáveis do que outros. As asas anteriores são ligeiramente mais escuras e estreitas que as asas posteriores, que são triangulares. As asas posteriores são monocromáticas, cinza claro, com franjas marrons escuras nas margens (Athié & Paula, 2002; Lorini *et al.*, 2015). O corpo inteiro e as asas estão cobertos de escamas, comprimento varia de 6-9 mm, com envergadura de 15-20 mm (Navarro & Navarro, 2018).

Com relação à traça-da-farinha, existe uma discussão taxonômica em relação ao gênero válido. Os europeus a denominam *E. kuehniella*, enquanto os americanos denominam como *Anagasta kuehniella* (Pereira & Salvadori, 2007; Parra *et al.*, 2014), ressaltando que o nome disponível não é necessariamente um nome válido. O mesmo acontece com a traça-do-cacau *E. cautella* também conhecida como *Cadra cautella* (Husain *et al.*, 2019).

Em função do elevado potencial biológico das três espécies de *Ephestia* presentes em ambientes de tabaco armazenado e das condições ambientais favoráveis para o seu desenvolvimento, medidas preventivas e curativas são essenciais para suprimir as populações, sendo necessário conhecer a biologia e o comportamento para a melhor tomada de decisão (Lorini, 2003). A solução para essa situação de perdas exige a execução de um Manejo Integrado de Pragas (MIP), utilizando um consórcio de táticas visando a diminuição desses insetos nesses ambientes (Cruz, 2002; Ou *et al.*, 2019; Sabbour, 2020).

2.3 Controle biológico de pragas de produtos armazenados

Os produtos químicos sintéticos são os mais utilizados para o controle de insetos em ambientes de armazenamento, devido à facilidade na aplicação, rapidez de ação e economia (Soares *et al.*, 2009; Lorini *et al.*, 2015; Sabbour, 2020). Entretanto, esse método apresenta uma série de desvantagens, como alta periculosidade aos aplicadores e trabalhadores, permanência de resíduos químicos no produto e contaminação do meio ambiente (Altieri *et al.*, 2003; Kumar, 2017). Outro fator que contribui para o agravamento do problema, é a pouca disponibilidade de inseticidas registrados para controle de pragas de produtos armazenados. Para *Ephestia* spp., no Brasil, na cultura do tabaco, somente é indicado o uso de fosfina (fosfeto de alumínio ou magnésio) (AGROFIT, 2021). Isso impede a alternância de produtos com diferentes modos de ação, recomendáveis para evitar a seleção de insetos resistentes (Lorini, 2008). Esses fatores têm contribuído para o desencadeamento do interesse de pesquisadores em buscar novas alternativas para o controle de insetos nestas condições.

Nestas circunstâncias, o controle biológico possui papel fundamental para a diminuição do uso de agrotóxicos sintéticos, embora seu uso contra pragas de produtos armazenados ainda seja incipiente (Zdárková *et al.*, 2003; Lorini *et al.*, 2015; Schöller *et al.*, 2018). Essa ferramenta de manejo consiste na regulação do número de plantas e animais por inimigos naturais, os quais constituem-se como agentes de mortalidade biótica (Gullan & Cranston, 2012; Fontes & Valadares-Inglis, 2020).

O controle biológico é um dos pilares dos programas de MIP que visam à adoção de diferentes táticas para reduzir o impacto dos insetos e outros organismos considerados como pragas, minimizando o uso e os efeitos negativos de inseticidas químicos para seu controle (Parra, 2002; Schöller *et al.*, 2018). Do ponto de vista do MIP, o inimigo natural

ideal é aquele que mantém a população da praga abaixo do nível de ação (Cruz, 2002; Fontes & Valadares-Inglis, 2020).

A utilização do controle biológico em produtos armazenados pode apresentar algumas vantagens em relação ao uso em campo, como a proteção dos inimigos naturais das algumas condições adversas do ambiente externo como a chuva (Simberloff & Stiling, 1996). Além disso, os predadores e parasitoides são capazes de localizar e combater pragas em espaços da unidade armazenadora de difícil acesso (Hagstrum & Athanassiou, 2019). Assim, este pode ser viável e efetivo, principalmente se for utilizado como uma ferramenta de prevenção de pragas nas unidades de armazenamento e, no caso de remediação, sendo integrado com outras estratégias de manejo disponíveis (Soares *et al.*, 2009). Contudo, há certa preocupação com a presença desses insetos inimigos naturais e seus fragmentos como contaminantes nos produtos e subprodutos armazenados. Para Cox & Wilkin (1996) a remoção desses fragmentos pode ser feita em procedimentos normais de limpeza ou através de peneiras que retêm os mesmos.

O sucesso do controle biológico depende do conhecimento e da seleção das espécies com maior potencial para serem liberadas no ambiente de armazenamento, bem como das interações entre estas e seus hospedeiros (Cox & Wilkin, 1996; Hagstrum & Athanassiou, 2019). A combinação de mais parasitoides e predadores, por exemplo, pode resultar em um controle mais efetivo de pragas (Grieshop *et al.*, 2006).

Vários inimigos naturais de pragas de produtos armazenados já são conhecidos, embora muitas vezes as citações limitem-se apenas à identificação do agente (Lorini *et al.*, 2015). Parasitoides pertencentes às famílias: Pteromalidae, Bethyidae, Ichneumonidae, Braconidae e Trichogrammatidae são as mais frequentemente encontradas (Athié & Paula, 2002; Sabbour, 2020). Porém, os autores ressaltam que ainda existe uma grande necessidade de pesquisas para se conhecer mais sobre a biologia das

espécies de parasitoides destas famílias, a fim, de serem utilizadas com sucesso em programas de controle biológico aumentativo. Mesmo assim, devido a sua capacidade de regular populações de insetos considerados pragas agrícolas, algumas espécies de himenópteros parasitoides já são utilizados na Europa em programas de controle biológico e/ou MIP na pós-colheita (Schöller *et al.*, 2018).

Para se tornar uma ferramenta concreta do MIP, a utilização de parasitoides de pragas de produtos armazenados depende da criação desses inimigos naturais em biofábricas e sua multiplicação em larga escala, a fim de disponibilizar insetos competitivos e de qualidade (Drozda & Bondarenko, 2018).

2.4 Criação de parasitoides

O aumento da utilização de parasitoides como agentes reguladores de insetos pragas em programas de MIP tem originado uma necessidade de se produzir os inimigos naturais em escala massal em biofábricas (Silva & Brito, 2015). Neste sentido, o desenvolvimento e aprimoramento da metodologia de criação de seus hospedeiros, como fonte contínua para multiplicação dos parasitoides, são pontos imprescindíveis para uma produção massal de qualidade, para então serem liberados em ambientes de produção (Parra, 2002; Kurtuluş *et al.*, 2020).

A criação de parasitoides sobre um hospedeiro natural é a forma mais utilizada mundialmente, o que traz a necessidade de manutenção simultânea de duas criações (Parra, 2009; Parra *et al.*, 2021). Dessa forma, necessita-se da disponibilidade de um hospedeiro, que pode ser facilitada pela utilização de dietas artificiais para essas espécies. Contudo, essas dietas devem ser testadas para a verificação da qualidade dos insetos produzidos (Vacari *et al.*, 2012; Mohammadi & Mehrkhou, 2020), sendo que as dietas

são consideradas um dos componentes mais importantes em uma criação (Parker, 2005; Faal-Mohammad-Ali & Shishehbor, 2013).

A alimentação dos hospedeiros é um dos principais fatores que podem influenciar na qualidade dos inimigos naturais produzidos em laboratório. A dieta deve conter todos os nutrientes essenciais para o bom desenvolvimento do hospedeiro garantido que os parasitoides criados sobre este, também possuam qualidade satisfatória (Vacari *et al.*, 2012; Amadou *et al.*, 2019). Conforme Vasconcelos (2017) existem diferenças significativas entre a qualidade de parasitoides criados sobre hospedeiros previamente alimentados com diferentes dietas. Além disso, não é possível realizar uma criação massal sem antes esta ter sido feita em pequena escala de laboratório, para conhecer a biologia, ecologia, comportamento, fisiologia, nutrição, tanto do hospedeiro, como do inimigo natural (Parra, 2009; Elbehery *et al.*, 2020; Masry *et al.*, 2020). Após obter o domínio da criação massal, pode-se iniciar as liberações inundativas para suprir programas de controle biológico sem correr o risco que haja uma descrença dessa técnica quando aplicada em campo (Parra & Cònsoli, 2009).

No Brasil, a comercialização de inimigos naturais ainda é pequena havendo poucas e localizadas biofábricas que multiplicam em larga escala e disponibilizam aos agricultores os biodefensivos para o controle de pragas (Parra, 2019; Togni *et al.*, 2019). No entanto, em função do crescente aumento da demanda por esse tipo de produto, nos últimos anos tem surgido novas empresas no mercado brasileiro, motivadas pela possibilidade de expansão (Sampaio, 2018). Com a chegada de novas empresas especializadas na produção desses biodefensivos, existe a necessidade de haver o acompanhamento da qualidade dos agentes produzidos nas criações comerciais (Togni *et al.*, 2019). Desta forma, é fundamental que haja uma ação conjunta entre pesquisadores de instituições de pesquisa, do governo e das próprias biofábricas para se ter o controle

da qualidade dos organismos produzidos (Parra, 2002; Bueno *et al.*, 2020). Entre os parasitoides que já são criados em larga escala e que podem ser utilizados em programas de controle biológico na pós-colheita, destaca-se *H. hebetor* e *T. pretiosum*.

2.5 Braconidae – *Habrobracon hebetor*

Segundo Melo *et al.* (2012) são reconhecidas 15 superfamílias e 62 famílias de himenópteros parasitoides no mundo, com destaque para a Braconidae que é a segunda maior família em número de espécies descritas (18.000) (Quicke, 2015). Braconinae é uma das maiores subfamílias de Braconidae, com 2.800 espécies conhecidas em mais de 185 gêneros (Yu *et al.*, 2012). Em Braconinae, o gênero *Habrobracon* Ashmead, 1895 apresenta espécies com potencial para atuarem como agentes de controle biológico de larvas de Lepidoptera e Coleoptera. Do ponto de vista taxonômico, entretanto, esse gênero tem sido referido de várias maneiras por diferentes autores, alguns o consideram como subgênero de *Bracon* Fabricius (Yu *et al.*, 2012) outros o julgam como um gênero distinto, com base na relação entre o comprimento das veias r e 3Rs das asas (Figura 3) (Quicke, 1997).

Habrobracon spp. contém mais de 30 espécies descritas, sendo a maioria de origem nas regiões Neártica e Paleártica (Yu *et al.*, 2012). *Habrobracon hebetor*, uma das mais conhecidas, foi introduzida em vários países, através de programas de controle biológico de espécies de lepidópteros ou, provavelmente, dispersa juntamente com seus hospedeiros, tendo se tornado cosmopolita (Martínez *et al.*, 2009).

A nomenclatura da espécie ainda é bem confusa, sendo relatados 15 sinônimos, de forma que *H. hebetor* e *Bracon hebetor*, são considerados sinônimos (Yu *et al.*, 2012). Segundo os autores, no entanto, a mais aceita é *H. hebetor*, que é a forma que consta nos

bancos de dados *Home of Ichneumonoidea* e no Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil (Gadelha *et al.*, 2021).

Conforme Fischer (1968) e Martínez *et al.* (2009) *H. hebetor* (Figura 3) distingue-se das outras espécies do gênero pela seguinte combinação de características: olhos de tamanho normal, separados das mandíbulas por um espaço mais longo do que a largura basal da mandíbula; base do triângulo ocelar menor que a distância entre o ocelo e olho; tórax na maior parte liso e brilhante, sem ornamentações proeminentes. Antenas das fêmeas com 12-15 segmentos e dos machos com 18-22. Asas na parte basal esfumada e apical hialina. Coloração do corpo vai do marrom escuro ao marrom-alaranjado.

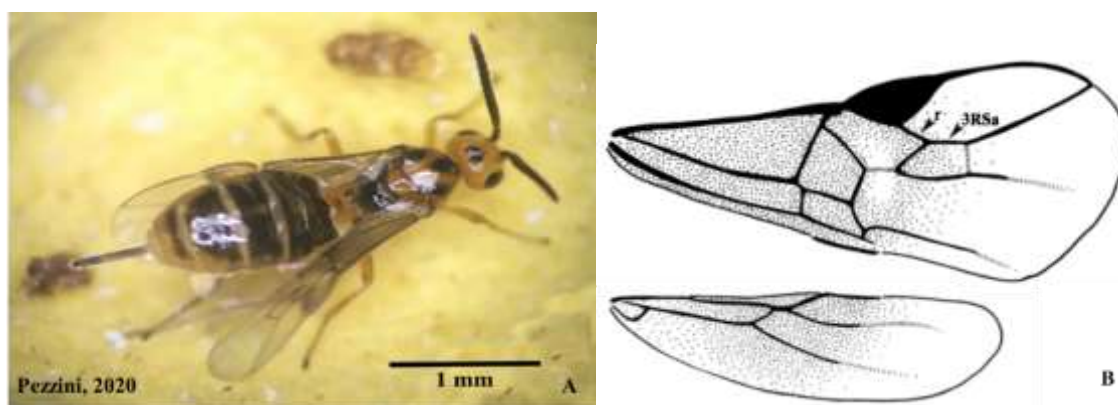


FIGURA 3. A- Fêmea de *Habrobracon hebetor*; B- Detalhe das veias da asa anterior e posterior. Adaptado de Martínez *et al.* (2009).

Habrobracon hebetor é conhecido por ser um ectoparasitoide que comumente ataca muitas espécies de lagartas de lepidópteros-praga de produtos armazenados (Athié & Paula, 2002; Cantori, 2019). Atualmente está presente em todos os continentes (Eliopoulos & Stathas, 2008; Mbata & Warsi, 2019), sendo o primeiro registro para o Brasil em 1947 na Bahia, parasitando larvas da traça-do-cacau (Silva, 1947). Foi considerado um potencial agente de controle biológico, mostrando melhores resultados no controle das traças em altas temperaturas, sendo atraído pelo *frass* das larvas de Pyralidae (Magro & Parra, 2001).

O ciclo deste parasitoide inicia com a paralisação do hospedeiro, ferroando-o várias vezes e injetando uma espécie de veneno (Athié & Paula, 2002). Após, deposita vários ovos na larva paralisada, dos quais eclodem pequenas larvas vermiformes que se alimentam da hemolinfa do hospedeiro, afastando-se da larva já seca para empupar (Koochpayma *et al.*, 2020). Os ovos são himenopteriformes, com superfície lisa, havendo quatro ínstares larvais muito semelhantes entre si, diferindo, entretanto, no tamanho e forma dos segmentos, apresentando gradual perda de transparência e tornando-se mais opacas a cada ínstar sucessivo (Pezzini *et al.*, 2017).

A temperatura mais adequada para a criação do parasitoide é de 28 °C, sendo constatado que *H. hebetor* promove a paralisação do hospedeiro em temperaturas superiores a 8 °C e oviposita quando a temperatura do ambiente está acima de 14 °C (Badran *et al.*, 2020). O tempo de desenvolvimento varia de acordo com a temperatura média do ambiente e com o hospedeiro. Parasitando *E. cautela*, apresentou de 13 a 14 gerações por ano, com ciclo de vida de 8 a 12 dias em temperaturas entre 25-32 °C (Huang, 1986, Serra, 1992, Magro *et al.*, 2006 e Alam *et al.*, 2014). Utilizando *E. kuehniella* como hospedeiro, o ciclo total variou de 9 a 14 dias, na mesma faixa de temperatura, em 18 °C, entretanto, o desenvolvimento completo levou aproximadamente 41 dias (Serra, 1992).

Habrobracon hebetor paralisa larvas de quarto e quinto ínstar, mas o parasitismo é significativamente maior naquelas de último ínstar (Ou *et al.*, 2021). Quanto à capacidade de parasitismo e ritmo de postura, *H. hebetor* deposita em média 231 ovos, oscilando entre 6 e 631 ovos por fêmea sendo que a média de ovos colocados por dia também é variável (Serra, 1992; Warsi & Mbata, 2018).

2.6 Trichogrammatidae – *Trichogramma pretiosum*

As espécies de Trichogrammatidae apresentam indivíduos com menos de um milímetro de comprimento, na sua maioria (Querino *et al.*, 2017). *Trichogramma* Westwood, 1833 é um dos cerca de 80 gêneros de Trichogrammatidae, com mais de 230 espécies descritas, das quais 29 são registradas no Brasil (Pinto, 2006; Querino & Zucchi 2019).

Os tricogrammatídeos estão entre os mais conhecidos agentes de mortalidade biótica, parasitando principalmente ovos de lepidópteros (Takahashi *et al.*, 2021). Uma das espécies mais conhecidas é *T. pretiosum*, sendo amplamente estudada e utilizada em programas de controle biológico aumentativo devido à sua eficiência, ampla distribuição geográfica e facilidade de criação em larga escala (Mills, 2010). A multiplicação de *T. pretiosum* em laboratórios e biofábricas é feita em hospedeiros alternativos, principalmente em ovos de traças que atacam produtos armazenados, como *E. kuehniella* e *Sitotroga cerealella* (Olivier, 1819) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Pratissoli *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2014).

Conforme Querino e Zucchi (2011) *T. pretiosum* (Figura 4) distingue-se das outras espécies do gênero pela seguinte combinação de características: cerdas flageliformes longas, com o ápice afilado uniformemente; lâmina dorsal longa, alcançando o ápice das volselas; carena ventral curta, não alcançando a metade da cápsula genital; processos ventrais próximos da base do processo intervolselar; processo intervolselar pontiagudo e longo, não alcançando o ápice das volselas. A espécie apresenta dimorfismo sexual nas antenas, machos do tipo plumosa e fêmeas clavada.



FIGURA 4. Fêmea de *Trichogramma pretiosum*, ovipositando.

Trichogramma pretiosum possui uma grande gama de hospedeiros, sendo considerado um parasitoide generalista (Pizzol *et al.*, 2012). No Brasil, é comumente encontrado parasitando ovos de diversas espécies de lepidópteros praga de importância agrícola, com destaque para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Eribidae), *S. frugiperda* e *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), sendo utilizado especialmente em programas de controle biológico nas culturas da soja, milho e tomate (Medeiros *et al.*, 2009; Vianna *et al.*, 2011; Balestrin & Bordin, 2016). A espécie apresenta ampla distribuição geográfica em todo território nacional (Querino & Zucchi, 2011).

Embora seja pouco utilizado em ambientes de armazenamento de grãos e produtos alimentícios, o controle biológico com *T. pretiosum* também pode ser uma alternativa atraente para minimizar o uso de inseticidas químicos aplicados nestes locais (Parra & Zucchi, 2004). Existem alguns registros do seu uso na pós-colheita no controle da traça *S. cerealella* em milho armazenado, tanto a granel quanto na espiga (Inoue, 1997) e das traças *P. interpunctella* e *E. cautella*, em amendoim armazenado em casca (Brower & Press, 1990).

O ciclo de vida de *T. pretiosum* é em torno de 10 dias em 25 °C, sendo seu período de desenvolvimento influenciado diretamente pelo hospedeiro e condições de

temperatura e umidade (Pereira *et al.*, 2004). As fêmeas colocam em média 70 a 120 ovos, número que é proporcional ao tamanho do hospedeiro, podendo desenvolver de um a dois parasitoides por ovo (Parra *et al.*, 2014; Parra *et al.*, 2021). A prole se alimenta da massa vitelina ou do embrião do hospedeiro. A fase larval apresenta três instares, perto da emergência do parasitoide, os ovos do hospedeiro se tornam escurecidos. A longevidade média é de 7 a 10 dias (Boivin, 2010; Mills, 2010).

2.7 Comunicação química em parasitoides

As estratégias de busca e o sucesso do parasitismo envolvem uma série de etapas como a localização do habitat e do hospedeiro, o reconhecimento, o aceite e a oviposição, dependendo de estímulos que podem ser de natureza química, física e/ou morfológica (Afsheen *et al.*, 2008; Conti & Colazza, 2012). Os parasitoides utilizam, principalmente, substâncias químicas para localizar seus hospedeiros e, dessa forma, desenvolveram estratégias que possibilitaram maior eficiência de encontros e, conseqüentemente, maior viabilidade de sobrevivência da prole (Fatouros *et al.*, 2008; Brezolin *et al.*, 2018).

Esse tipo de comunicação entre organismos dá-se por meio da emissão e reconhecimento de substâncias químicas denominadas semioquímicos, que, quando liberadas por certo organismo no ambiente, provocam uma mudança fisiológica e/ou comportamental em outro (Nordlund & Lewis, 1976; Godfray, 1994). Nos insetos, a comunicação química é responsável pelo comportamento reprodutivo, de localização e seleção do hospedeiro, do habitat e, no caso de insetos sociais, da organização da colônia. Estas substâncias podem ter ação intraespecífica (feromônio) ou interespecífica (aleloquímico) (Vinson, 1984; Corrêa & Sant'Ana, 2007; Wajnberg & Colazza, 2012).

Em parasitoides, esses estímulos modificam a movimentação das fêmeas em busca do hospedeiro, provocando uma alteração do padrão do movimento em orientação

à fonte do estímulo (Eiras & Gerk, 2001; Brezolin *et al.*, 2018). De forma geral os parasitoides utilizam pistas de longa e curta distância para localizarem seus hospedeiros. As de longa distância tendem a ser as primeiras pistas usadas pelos parasitoides em sua orientação em relação ao sítio de seu hospedeiro e geralmente são emitidas pelo alimento ou planta hospedeira (Goubert *et al.*, 2013). No caso de parasitoides de insetos que estão presentes em ambientes de armazenagem, estes são atraídos por apneumônios liberados por produtos armazenados, como farinha, milho ou arroz (Belda & Riudavets, 2010). As pistas de curta distância geralmente vêm do próprio hospedeiro, como cairomônios e todos os seus resíduos metabólicos (Goubert *et al.*, 2013).

A atratividade de *H. hebetor* ao habitat do hospedeiro, mesmo sem a sua presença, já foi registrada por Darwish *et al.* (2003), mostrando que os voláteis emitidos pelo alimento do hospedeiro são as primeiras pistas químicas seguidas. Comportamento semelhante também relatado por Belda e Riudavets (2010), Suma *et al.* (2014) para outros parasitoides de pragas de produtos armazenados. Os autores constataram que as espécies eram atraídas pelos voláteis emanados pela farinha de aveia, arroz, farinha de trigo. Isso demonstra que mediadores químicos são capazes de desencadear respostas comportamentais, guiando o parasitoide a seu hospedeiro ou a localização de uma potencial comunidade hospedeira (Goubert *et al.*, 2013).

Em campo, os voláteis liberados por plantas sob ataque de herbívoros são pistas químicas importantes para parasitoides com *T. pretiosum* para localizar seu hospedeiro. A deposição de ovos de insetos também pode induzir a produção de voláteis ou alterar a química da folha de forma que as plantas atraiam parasitoides (Turlings *et al.*, 1992).

Em experimentos de laboratório sobre a percepção química, Darwish *et al.* (2003) observaram que o parasitoide *H. hebetor*, ao encontrar o sítio do hospedeiro, exhibe um comportamento de movimentar as antenas, até mesmo inserindo-as nos orifícios de telas

que impedem o contato direto com o hospedeiro em criações. Os autores ainda notaram que, em resposta ao hospedeiro, os parasitoides curvavam o abdômen, um movimento típico de parasitismo. Segundo Parra *et al.* (1996), em curta distância, há vários estímulos relacionados ao comportamento de busca do parasitoide *H. hebetor* pelo seu hospedeiro, destacando-se as secreções da glândula mandibular das larvas liberadas durante a sua alimentação e os cairomônios liberados pelas larvas de seu hospedeiro. Além disso, os voláteis emitidos pelas fezes das larvas de *E. kuehniella* são um importante atrativo para fêmeas de *H. hebetor* a curta distância (Favaris, 2016).

Além dos voláteis de plantas induzidos pela oviposição, a orientação dos parasitoides do ovo em direção aos odores derivados do ovo pode ser uma estratégia alternativa eficaz para a localização do hospedeiro (Vinson, 1984). Fêmeas de *T. pretiosum* são responsivas aos voláteis dos ovos de *E. kuehniella*, que são utilizados usualmente para sua multiplicação como hospedeiro alternativo (Vargas *et al.*, 2017). No entanto, os ovos do hospedeiro geralmente emitem apenas pequenas quantidades de voláteis e, portanto, são úteis como pistas de curta distância. Por este motivo, os parasitoides de ovo normalmente exploram primeiramente pistas químicas de outras fontes para localização do hospedeiro (Peñaflor *et al.*, 2011).

2.7.1 Influência da aprendizagem no comportamento de busca

A busca dos parasitoides pelo seu hospedeiro começa com o comportamento inato ou instintivo, não sendo correspondente a estímulos prévios, no entanto, este pode ser modificado por meio do contato sucessivo com determinado hospedeiro, podendo resultar em uma aprendizagem (Tognon *et al.*, 2013).

Aprendizagem, que é a mudança de comportamento após a experiência, é presente em quase todos os animais. Em geral, a enorme variedade de processos de aprendizagem pode ser categorizada em não associativa e associativa (Little *et al.*, 2019).

Na aprendizagem não associativa, o indivíduo é exposto a apenas um estímulo, que pode ser repetitivo (constante) e resultar em habituação (quando um inseto é constantemente submetido a um mesmo estímulo e este não responde mais) ou pode ser único e suficiente para induzir a sensibilização, pressupõe que a aprendizagem desencadeie novos padrões de comportamento frente a um estímulo específico, sendo que, na natureza, esta mudança traria alguma vantagem adaptativa para o organismo (Squire & Kandel, 1999).

A aprendizagem associativa ocorre através da associação de dois estímulos (um condicionado e outro incondicionado) anteriormente não relacionados e inclui reforço. Os eventos ligados podem ser a própria ação do animal e um reforço resultante no caso de aprendizagem operante (seleção natural) (associa apneumônios a presença de hospedeiros), ou um estímulo neutro (estímulo condicionado) e um estímulo biologicamente relevante, seja positivo (recompensas) (cor de uma flor a presença de alimento) ou negativo (punições) (presa que é atraída por um volátil emitido por seu predador) (estímulo não condicionado) no caso da aprendizagem pavloviana (Pavlov, 1927; Little *et al.*, 2019).

Fêmeas de parasitoides experientes, que já tiveram contato com o hospedeiro, são mais atraídas ao odor deste do que as inexperientes, evidenciando que estas podem apresentar uma resposta adaptativa, ajustando o comportamento de busca a sítios de hospedeiros, de acordo com experiências adquirida (Little *et al.*, 2019). As espécies de parasitoides que dependem de uma maior diversidade de hospedeiros (generalistas) podem se beneficiar mais de dicas de aprendizagem associadas à descoberta de

hospedeiros, enquanto as espécies especializadas contam principalmente com as preferências inatas (Segura *et al.*, 2007).

A experiência dos parasitoides com os voláteis associados aos seus hospedeiros pode ocorrer durante a fase imatura e adulta, resultando em aprendizagem (Vet & Groenewold, 1990; Akinkurolere *et al.*, 2009). Existem evidências de que isso ocorre tanto em *H. hebetor* quanto em *T. pretiosum* (Darwish *et al.*, 2003; Parra *et al.*, 1996; Vargas *et al.*, 2017). Conforme destacado por diversos trabalhos como de Parra *et al.* (1996), Shonuda e Nasr (1998), Darwish *et al.* (2003) e Favaris (2016), os autores apontam que fêmeas de *H. hebetor* com experiência de parasitismo tendem a desenvolverem uma resposta muito mais eficiente e rápida aos semioquímicos do seu hospedeiro e às pistas associadas a este do que quando não possuem contato prévio com o hospedeiro.

Fêmeas de *T. pretiosum* em contato prévio de 5 a 24 horas com extratos de seu hospedeiro adquiriram experiência e aprendizado frente a busca deste, apresentando uma resposta exploratória superior do que fêmeas inexperientes ou em contato menor com o seu hospedeiro (Vargas *et al.*, 2017). Essa mudança se deve ao fato da aquisição de experiência, já citada acima e que pode ser desencadeada inclusive na fase adulta, após o contato com o hospedeiro (Barron & Corbet, 1999), possivelmente associada com as alterações no sistema nervoso (Vinson, 1984).

Medir ou quantificar a aprendizagem é desafiador porque pode ser difícil determinar se a mudança comportamental é devido ao aprendizado, ou a outros fatores, como mudança do estímulo, fadiga, alterações fisiológicas ou lesões (Barron *et al.* 2015). Além disso, as diferenças nos métodos de condicionamento, delineamento experimental e técnicas de medição podem influenciar significativamente os resultados e sua interpretação (Frost *et al.* 2012).

Embora ainda haja dúvidas em relação a manipulação de parasitoide por meio do aprendizado para aprimorar programas de controle biológico de pragas agrícolas (Meiners & Peri, 2013), novas pesquisas sobre a compreensão destas interações têm sido cada vez mais frequentes (Brezolin *et al.*, 2018; El-Ghany, 2019; Mbata & Warsi, 2019; Anukiruthika *et al.*, 2021). O crescimento contínuo do conhecimento em aprendizagem de insetos contribuirá para sua melhor compreensão, pois aprender é uma jornada, não um destino, mesmo em insetos (Little *et al.*, 2019).

2.8 Referências

AFSHEEN, S. *et al.* Differential attraction of parasitoids in relation to specificity of kairomones from herbivores and their by-products. **Insect Science**, Malden, v. 15, n. 5, p. 381-397, 2008.

AFUBRA - ASSOCIAÇÃO DOS FUMICULTORES DO BRASIL. **Fumicultura no Brasil**. [Santa Cruz do Sul, RS], 2020. Disponível em: <https://afubra.com.br/fumicultura-brasil.html>. Acesso em: 16 dez. 2020.

AGROFIT - SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. **Consulta de praga/doença**. Brasília, 2021. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/acesso-a-informacao/cartas-de-servico/defesa-agropecuaria-agrotoxicos/agrotoxicos-registrados-no-agrofit>. Acesso em: 20 fev. 2021.

AKINKUROLERE, R. O. *et al.* Parasitism and host-location preference in *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae): Role of refuge, choice, and host instar. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 102, n. 2, p. 610-615, 2009.

ALAM, M. S. *et al.* Biology of *Bracon hebetor* reared on wax moth (*Galleria mellonella*) larvae. **Persian Gulf Crop Protection**, Dezful, v. 3, n. 4, p. 54-62, 2014.

ALTIERI, M. A.; SILVA, E. N.; NICHOLLS, C. I. **O papel da biodiversidade no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos, 2003.

AMADOU, L. *et al.* Development of an optimum diet for mass rearing of the rice moth, *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae), and production of the parasitoid, *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae), for the control of pearl millet head miner. **Journal of Insect Science**, Annapolis, v. 19, n. 2, p. 1-5. 2019.

ANUKIRUTHIKA, T.; JIAN, F.; JAYAS, D. S. Movement and behavioral response of stored product insects under stored grain environments - A review. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 90, 101752, 2021.

ATHIÉ, I.; PAULA, D. C. **Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação**. 2.ed. São Paulo: Varela, 2002.

- BADRAN, F. *et al.* Effects of prolonged mass rearing on life history traits of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **International Journal of Pest Management**, London, p. 1-10. 2020.
- BALESTRIN, A. L.; BORDIN, S. Uso de *Trichogramma pretiosum* no controle de *Spodoptera frugiperda* em lavoura de milho. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, Porto Alegre, v. 2, n. 3, p. 259-266, 2016.
- BARBOSA, P. *et al.* Plant allelochemicals and insect parasitoids: effects of nicotine on *Cotesta congregata* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) and *Hyposoter annulipes* (Cresson) (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 12, n. 6, p. 1319-1328, 1986.
- BARBOSA, P.; GROSS, P.; KEMPER, J. Influence of plant allelochemicals on the tobacco hornworm and its parasitoid, *Cotesia congregata*. **Ecology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 1567-1575, 1991.
- BARRON, A. B.; CORBET, S. A. Preimaginal conditioning in *Drosophila* revisited. **Animal Behaviour**, Sunderland, v. 58, n. 1, p. 621-628, 1999.
- BARRON, A. B. *et al.* Embracing multiple definitions of learning. **Trends in Neuroscience**, Amsterdam, v. 38, n. 7, p. 405-407, 2015.
- BELDA, C.; RIUDAVETS, J. Attraction of the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Howard) (Hymenoptera: Pteromalidae) to odors from grain and stored product pests in a Y-tube olfactometer. **Biological Control**, Atlanta, v. 54, n. 1, p. 29-34, 2010.
- BELING, R. R. *et al.* **Pró-tabaco 2014**: esse negócio não pode parar. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2014.
- BOIVIN, G. Reproduction and immature development of egg parasitoids. *In*: CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (ed.). **Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma***. New York: Springer, 2010. p. 1-24.
- BREZOLIN, A. N. *et al.* Tools for detecting insect semiochemicals: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 410, p. 4091-4108, 2018.
- BROWER, J. H.; PRESS, J. W. Interaction of *Bracon hebetor* (Hymenoptera; Braconidae) and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in suppressing stored-product moth populations in small peanut storages. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 83, n. 3, p.1096-1101, 1990.
- BUENO, V. H. P. *et al.* Biological control in Brazil. *In*: LENTEREN, J. C. *et al.* (eds.). **Biological control in Latin American and the Caribbean: its rich history and bright future**. Boston: Cabi Invasives series, 2020. p. 78-107.
- CANTORI, L. V. **Potential do ectoparasitoide *Habrobracon hebetor* Say, 1857 (Hymenoptera: Braconidae) para controle biológico de treze espécies de lepidópteros praga**. 2019. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

CARVALHO, C. *et al.* **Anuário brasileiro do tabaco 2014**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2014.

CARVALHO, M. O.; PEREIRA, A. P.; MEXIA, A. Adoção de protecção integrada em tabaco armazenado em Portugal. *In: ENCONTRO NACIONAL DE PROTECÇÃO INTEGRADA*, 6., 2003, Castelo Branco. **Anais [...]** Castelo Branco: ENPI, 2003. p. 297-306.

COLLINS, W. K.; HAWKS, S. N. **Fundamentos da produção do tabaco de estufa**. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2011.

CONTI, E.; COLAZZA, S. Chemical ecology of egg parasitoids associated with true bugs. **Psyche: A Journal of Entomology**, Cambridge, v. 2012, p. 1-11, 2012.

CORRÊA, A.; SANT'ANA, J. Ecologia química de insetos. *In: CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. (ed.). Produtos naturais no controle de insetos*. São Carlos: UFSCar, 2007. p. 9-17.

COX, P. D.; WILKIN, D. R. **The potential use of biological control of pests in stored grain**: Research Review 36. London: Home-Grown Cereals Authority, 1996.

CRUZ, I. Controle biológico em manejo integrado de pragas. *In: PARRA, J. R. P. et al. (ed.). Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores*. São Paulo: Manole, 2002. p. 543-570.

DARWISH, E.; EL-SHAZLY, M.; EL-SHERIF, H. The choice of probing sites by *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) foraging for *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 265-276, 2003.

DENG, H. *et al.* Population dynamics and resource of *Ephestia elutella* (Hübner) in the tobacco warehouses in Guiyang of Guizhou Province. **Plant Protection**, Beijing, v. 44, n. 6, p. 172-176, 2018.

DICKE, M. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. **Plant, Cell & Environment**, Hoboken, v. 32, n. 6, p. 654-665, 2009.

DROZDA, V.; BONDARENKO, I. Technological features of biological protection of grain stocks against complex of phytophages of Lepidoptera (Pyralidae, Tineidae, Gelechiidae). **Ukrainian Food Journal**, Kyiv, v. 7, n. 1, p. 79-95, 2018.

EDDE, P. A. Principal insects affecting tobacco plants in the field. **Beiträge zur Tabakforschung International / Contributions to Tobacco Research**, Hamburg, v. 28, n. 3, p. 117-165, 2018.

EIRAS, A. E.; GERK, A. O. Cairomônios e aprendizagem em parasitoides. *In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (ed.). Feromônios de insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas*. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 127-134.

ELBEHERY, H.; SALEH, M.; EL-WAKEIL, N. Propagation and application of larval parasitoids. *In: EL-WAKEIL, N.; SALEH, M.; ABU-HASHIM, M. (ed.). Cottage industry of biocontrol agents and their applications: practical aspects to deal biologically with pests and stresses facing strategic crops*. Switzerland: Springer, 2020. p. 49-72.

- EL-GHANY, N. M. A. Semiochemicals for controlling insect pests. **Journal of Plant Protection Research**, Poznań, v. 59, n. 1, p. 1-11, 2019.
- EL-HENEIDY, A. H.; BARBOSA, P.; GROSS, P. Influence of dietary nicotine on the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* and its parasitoid, the ichneumonid wasp *Hyposoter annulipes*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 227-232, 1988.
- ELIOPOULOS, P. A.; STATHAS, G. J. Life tables of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing *Anagasta kuehniella* and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): Effect of host density. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 101, n. 3, p. 982-988, 2008.
- FAAL-MOHAMMAD-ALI, H.; SHISHEHBOR, P. Biological parameters of *Bracon hebetor* (Hym.: Braconidae) parasitizing *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae): effect of host diet. **Journal of Crop Protection**, Teerã, v. 2, n. 4, p. 411-419, 2013.
- FARNHAM, A. S. *et al.* No evidence of substantial nicotine metabolism by *Lasioderma serricornis* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae) reared on tobacco. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 171-176, 2007.
- FATOUROS, N. E. *et al.* Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. **Behavioral Ecology**, New York, v. 19, n. 3, p. 677-689, 2008.
- FAVARIS, A. P. **Isolamento do Cairomônio de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) responsável pela atração do parasitoide *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.
- FISCHER, M. Über gezüchtete Raupenwespen (Hymenoptera: Braconidae) aus dem Naturhistorischen Museum Wien. **Pflanzenschutz-Berichte**, Viena, v. 37, p. 97-140, 1968.
- FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020.
- FROST, E. H.; SHUTLER, D.; HILLIER, N. K. The proboscis extension reflex to evaluate learning and memory in honeybees (*Apis mellifera*): some caveats. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 99, n. 9, p. 677-686, 2012.
- GADELHA, S. S. *et al.* Braconidae. In: BOEGER, W. A. P. *et al.* (ed.). **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil**. Rio de Janeiro: PNUD, 2021. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/34545>. Acesso em: 18 fev. 2021.
- GAJGER, I. T.; DAR, S. A. Plant allelochemicals as sources of insecticides. **Insects**, Basel, v. 12, n. 189, p. 1-21, 2021.
- GODFRAY, H. C. J. **Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology**. Princeton: Princeton University Press, 1994.
- GOUBERT, C. *et al.* Short- and long-range cues used by ground-dwelling parasitoids to find their host. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 100, n. 2, p. 177-184, 2013.

- GRIESHOP, M. J.; FLINN, P. W.; NECHOLS, J. R. Biological control of Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae) on finished stored products using egg and larval parasitoids. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 99, n. 4, p. 1080-1084, 2006.
- GUEDES, J. V. C.; COSTA, I. F. D. **Guia de identificação e manejo integrado das pragas e doenças do fumo**. Santa Maria: Orium, 2006.
- GUEDES, J. V. C.; SULZBACH, F. **Guia de identificação e manejo integrado das pragas do fumo**. Santa Maria: Orium, 2006.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Os insetos: um resumo de entomologia**. 4. ed. São Paulo: Roca, 2012.
- GUNASENA, G. H.; VINSON, S. B.; WILLIAMS, H. J. Effects of nicotine on growth, development and survival of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) and the parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 83, n. 5, p. 1777-1782. 1990.
- HAGSTRUM, D. W.; ATHANASSIOU, C. G. Improving stored product insect pest management: From theory to practice. **Insects**, Basel, v. 10 n. 332, 1-7, 2019.
- HARVEY, J. A. *et al.* Effects of dietary nicotine on the development of an insect herbivore, its parasitoid and secondary hyperparasitoid over four trophic levels. **Ecological entomology**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 15-23, 2007.
- HEINRICH, C. American moths of the Subfamily Phycitinae. **Bulletin of the United States National Museum**, Washington, n. 207, 1956.
- HILDRETH, S. B. *et al.* Tobacco nicotine uptake permease (NUP1) affects alkaloid metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 44, p. 18179-18184, 2011.
- HUANG, X. F. Use of *Habrobracon hebetor* Say in granary pest control. **Chinese Journal of Biological Control**, Pequim, v. 2, n. 2, p. 78-80, 1986.
- HUSAIN, M. *et al.* Transcriptome analysis of the almond moth, *Cadra cautella*, female abdominal tissues and identification of reproduction control genes. **BMC Genomics**, London, v. 20, n. 883, p. 1-14, 2019.
- INOUE, M. S. R. **Bioecologia da traça-dos-cereais *Sitotroga cerealella* (Olivier, 1819) e seu controle biológico em milho armazenado com *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 e *Bracon hebetor* Say, 1857**. 1997. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. Scavenging deleterious oxygen radicals. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 299-328. 2002.
- KIST, B. B. *et al.* **Anuário brasileiro do tabaco 2016**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016.

- KIST, B. B. *et al.* **Anuário brasileiro do tabaco 2018**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2018.
- KIST, B. B. *et al.* **Anuário brasileiro do tabaco 2019**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2019.
- KIST, B. B. *et al.* **Anuário brasileiro do tabaco 2020**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2020.
- KOOHPAYMA, F. *et al.* Climatically isolated populations of *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) demonstrate striking differences in life history traits. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Libertyville, v. 22, n. 3, p. 747-757, 2020.
- KRSTESKA, V. *Ephestia elutella* Hüb. on tobacco. **Тютюн/Tobacco**, Prilep, v. 64, n. 1-6, p. 70-77, 2014.
- KRSTESKA, V.; STOJANOSKI, P. *Lasioderma serricorne* F. - pest of tobacco and tobacco products. **Тютюн/Tobacco**, Prilep, v. 63, n. 7-12, p. 27-36, 2013.
- KUMAR, R. **Insect pests of stored grain biology, behavior, and management strategies**. Williston: Apple Academic Press, 2017.
- KURTULUŞ, A. *et al.* Influence of different diets on some biological parameters of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 85, p. 1-6. 2020.
- LEFFINGWELL, J. C. **Chemical constituents of tobacco leaf and differences among tobacco types**. Amsterdam: Science Direct Working Paper, 2001.
- LI, Y.; YU, X. Occurrence and damage of main tobacco pests and their control. **Tobacco science & technology**, Zhengzhou, v. 4, p. 29-31, 1993.
- LITTLE, C. M.; CHAPMAN, T. W.; HILLIER, N. K. Considerations for insect learning in integrated pest management. **Journal of Insect Science**, Annapolis, v. 19, n. 6, p. 1-14, 2019.
- LOECK, A. E. **Praga de produtos armazenados**. Pelotas: Egupfel, 2002.
- LORINI, I. **Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2003.
- LORINI, I. **Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008.
- LORINI, I. Insetos que atacam grãos de soja armazenados. *In*: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (ed.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 421-444.
- LORINI, I. *et al.* **Principais pragas e métodos de controle em sementes durante o armazenamento**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. (Série Sementes).
- LORINI, I. *et al.* **Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas**. Brasília: Embrapa, 2015.

MAGRO, S. R.; PARRA, J. R. P. Biologia do ectoparasitóide *Bracon hebetor* Say, 1857 (Hymenoptera: Braconidae) em sete espécies de lepidópteros. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 4, p. 693-698, 2001.

MAGRO, S. R. *et al.* Biological, nutritional, and histochemical basis for improving an artificial diet for *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 215-222, 2006.

MARTÍNEZ, J. J. *et al.* Nuevos registros de *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) en la Argentina. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, Buenos Aires, v. 68, n. 3/4, p. 369-371, 2009.

MASRY, S. H. D.; EL-WAKEIL, N. Egg parasitoid production and their role in controlling insect pests. *In*: EL-WAKEIL, N.; SALEH, M.; ABU-HASHIM, M. (ed.). **Cottage industry of biocontrol agents and their applications: practical aspects to deal biologically with pests and stresses facing strategic crops**. Switzerland: Springer, 2020. p. 3-48.

MBATA, G. N.; WARSI, S. *Habrobracon hebetor* and *Pteromalus cerealellae* as tools in post-harvest integrated pest management. **Insects**, Basel, v. 10, n. 85, p. 1-12. 2019.

MEDEIROS, M. A. *et al.* Estudo preliminar do controle biológico da traça-do-tomateiro com o parasitoide *Trichogramma pretiosum* em ambientes protegidos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 80-85. 2009.

MEINERS, T.; PERI, E. Chemical ecology of insects parasitoids: essential elements for developing effective biological control programmes. *In*: WAJNBERG, É.; COLAZZA, C. (ed.). **Chemical ecology of insect parasitoids**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2013. p. 193-224.

MELO, G. A. R.; AGUIAR, A. P.; GARCETE-BARRETT, B. R. Hymenoptera Linnaeus, 1758. *In*: RAFAEL, J. A. *et al.* (ed.). **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, 2012. p. 553-612.

MENDES, L. *et al.* **Anuário brasileiro do tabaco 2015**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2015.

MILLS, N. Egg parasitoids in biological control and integrated pest management. *In*: CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (ed.). **Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma***. New York: Springer, 2010. p. 389-412.

MOHAMMADI, S.; MEHRKHOUS, F. Effects of various cereal flour on life table parameters of *Ephesia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Crop Protection**, Tehran, v. 9, n. 1, p. 29-39, 2020.

MORRIS, C. E. Uptake and metabolism of nicotine by the CNS of a nicotine-resistant insect, the tobacco hornworm (*Manduca sexta*). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 29, n. 11, p. 807-817. 1983.

MUMM, R., DICKE, M. Variation in natural plant products and the attraction of bodyguards involved in indirect plant defense. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 88, n. 7, p. 628-667, 2010.

- NAVARRO, S.; NAVARRO, H. Insect pest management of oilseed, corps, tree nuts and dried fruits. *In: ATHANASSIOU, C. G.; ARTHUR, F. H. (ed.). Recent advances in stored product protection*. Berlin: Springer, 2018. p. 99-142.
- NAYAK, M. K.; DAGLISH, G. J. Importance of stored product insects. *In: ATHANASSIOU, C. G.; ARTHUR, F. H. (ed.). Recent advances in stored product protection*. Berlin: Springer, 2018. p. 01-18.
- NEVES, N. **Lavoura dourada: a saga dos produtores de tabaco do sul do Brasil**. São Paulo: Generale, 2010.
- NÖLKE, G. *et al.* Polyamines delay leaf maturation in low-alkaloid tobacco varieties. **Plant Direct**, Oxford, v. 2, n. 7, p. 1-12, 2018.
- NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 2, n. 2, p. 211-220, 1976.
- OLIVEIRA, F.; COSTA, M.C.F. **Cultivo de Fumo (*Nicotiana tabacum* L.)**. São Paulo: Embrapa, 2012.
- OU, H. D. *et al.* Control efficiency of *Bracon hebetor* say against *Ephestia elutella* (Hübner). **Chinese Tobacco Science**, Beijing, v. 40, n. 5, p. 44-51, 2019.
- OU, H. D. *et al.* Host deprivation effects on population performance and paralysis rates of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **Pest Management Science**, West Sussex, v. 77, n. 4, p. 1851-1863, 2021.
- PARKER, A. G. Mass-rearing for sterile insect release. *In: DYCK, V. A. et al. (ed.). Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management*. Dordrecht: Springer, 2005. p. 209-232.
- PARR, J. C.; THURSTON, R. Toxicity of nicotine in synthetic diets to larvae of the tobacco hornworm. **Annals of the Entomological Society of America**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 1185-1188, 1972.
- PARRA, J. R. P. Comercialização de inimigos naturais no Brasil: uma área emergente. *In: PARRA, J. R. P. et al. (ed.). Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores*. São Paulo: Manole, 2002. p. 343-349.
- PARRA, J. R. P. A evolução das dietas artificiais e suas interações em ciência e tecnologia. *In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (ed.). Bioecologia e nutrição de insetos, base para o manejo integrado de pragas*. Brasília: Embrapa, 2009. p. 91-174.
- PARRA, J. R. P. Controle Biológico na Agricultura Brasileira. **Entomological Communications**, Santo Antônio de Goiás, v. 1, p. 1-3, 2019.
- PARRA, J. R. P. *et al.* Flight response of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) in a wind tunnel to volatiles associated with infestations of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Biological Control**, Atlanta, v. 6, n. 2, p. 143-150, 1996.

- PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. *Trichogramma* in Brazil: Feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 271-281. 2004.
- PARRA, J. R. P.; CÔNSOLI, F. L. Criação massal e controle de qualidade de parasitoides de ovos. *In*: BUENO, V. H. P. (ed.). **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2009. p. 169-197.
- PARRA, J. R. P. *et al.* **Criação de *Anagasta kuehniella*, em pequena escala, para produção de *Trichogramma***. Piracicaba: Occasio, 2014.
- PARRA, J. R. P. *et al.* **Small-scale rearing of *Anagasta kuehniella* for *Trichogramma* production**. Wallingford: CABI, 2021.
- PAVLOV, I. P. **Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex**. Oxford: Oxford University Press, 1927.
- PEÑAFLORES, M. F. G. V. *et al.* Herbivore-induced plant volatiles can serve as host location cues for a generalist and a specialist egg parasitoid. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 37, n. 12, p. 1304-1313, 2011.
- PEREIRA, F. F. *et al.* 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**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 231-236, 2004.
- PEREIRA, P. R. V. S.; SALVADORI J. R. **Guia para identificação de larvas de Lepidoptera (Pyralidae e Gelechiidae) comumente encontradas em grãos armazenados**. Passo Fundo: Embrapa, 2007.
- PEZZINI, C.; JAHNKE, S. M.; KÖHLER, A. Morphological characterization of immature stages of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) ectoparasitoid of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae). **Journal of Hymenoptera Research**, Washington, v. 60, p. 157-171, 2017.
- PEZZINI, C.; JAHNKE, S. M.; KÖHLER, A. Influence of a diet containing tobacco on the biology of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) and its parasitoid *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **European Journal of Entomology**, Czech Republic, v. 117, p. 190-198, 2020
- PINTO, J. D. A review of the new world genera of *Trichogrammatidae* (Hymenoptera). **Journal of Hymenoptera Research**, Washington, v. 15, n. 1, p. 38-163, 2006.
- PIZZOL, J. *et al.* Parasitoid and host egg ages have independent impact on various biological traits in a *Trichogramma* species. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 85, p. 489-496, 2012.
- PRATISSOLI, D. *et al.* Características biológicas de linhagens de *Trichogramma pretiosum*, criados em ovos de *Sitotroga cerealella* e *Anagasta kuehniella*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 562-565. 2004.
- QUERINO, R. B.; ZUCCHI, R. A. **Guia de identificação de *Trichogramma* para o Brasil**. Brasília: Embrapa, 2011.

- QUERINO, R. B. *et al.* New species, notes and new records of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Brazil. **Zootaxa**, Auckland, v. 4232, n. 1, p. 137-143, 2017.
- QUERINO, R. B.; ZUCCHI, R. A. Annotated checklist and illustrated key to the species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from South America. **Zootaxa**, Auckland, v. 4656, n. 1, p. 201-231, 2019.
- QUICKE, D. J. L. Subfamily Braconinae. *In*: WHARTON, R. A.; MARSH, P. M.; SHARKEY, M. J. (ed.). **Manual of the new world genera of the family braconidae (Hymenoptera)**. Washington: Special publication of the International Society of Hymenopterists, 1997. p. 149-174.
- QUICKE, D. L. J. **The Braconid and Ichneumonid parasitoid wasps: biology, systematics, evolution and ecology**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015.
- REIGART, J. R.; ROBERTS, J. R. Biologicals and insecticides of biological origin. *In*: REIGART, J. R.; ROBERTS, J. R. **Recognition and management of pesticide poisonings**. 6th ed. Washington: United States Environmental Protection Agency (EPA), 2013. p. 70 -79.
- RODGMAN, A.; PERFETTI, T. A. **The chemical components of tobacco and tobacco smoke**. Boca Raton: CRC Press, 2013.
- SABBOUR, M. **Integrated pest control of stored product insect pests**. Sarbruque: Lambert Academic Publishin, 2020.
- SAITOH, F.; NONA, M.; KAWASHIMA, N. The alkaloid contents of sixty *Nicotiana* species. **Phytochemistry**, Toronto, v. 24, n. 3, p. 477-480, 1985.
- SAMPAIO, R. M. Controle biológico: tecnologias na construção de oportunidades no Brasil. **Análises e Indicadores do Agronegócios**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 1-4, 2018.
- SANTOS, C. E. *et al.* **Anuário brasileiro do tabaco 2017**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2017.
- SCHÖLLER, M. *et al.* Biological control of stored-product insects. *In*: ATHANASSIOU, C. G.; ARTHUR, F. H. (ed.). **Recent advances in stored product protection**. Berlin: Springer, 2018. p. 183-210.
- SEGURA, D. F. *et al.* Role of visual information and learning in habitat selection by a generalist parasitoid foraging for concealed hosts. **Animal behavior**, London, v. 74, n. 1, p. 131-142, 2007.
- SELF, L.; GUTHRIE, F.; HODGSON, E. Metabolism of nicotine by tobacco-feeding insects. **Nature**, London, v. 204, p. 300-301, 1964.
- SERRA, H. J. P. **Bioecologia do ectoparasito *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) em *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae)**. 1992. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

SHI, Q.; LI, C.; ZHANG, F. Nicotine synthesis in *Nicotiana tabacum* L. induced by mechanical wounding is regulated by auxin. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 11, p. 2899-2907, 2006.

SHONOUDA, M. L.; NASR, F. N. Impact of larval-extract (kairomone) of *Ephestia kuehniella* Zell. (Lep., Pyralidae), on the behaviour of the parasitoid *Bracon hebetor* Say. (Hym., Braconidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 122, n. 1-5, p. 33-35, 1998.

SILVA, A. B.; BRITO, J. M. Controle biológico de insetos-pragas e suas perspectivas para o futuro. **Revista Agropecuária Técnica**, Paraíba, v. 36, n. 1, p. 248-258, 2015.

SILVA, L. M. *et al.* O uso do extrato de fumo (*Nicotina tabacum*) como alternativa para o controle de pragas em hortaliças. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS - COINTER-PDVAgro, 2., 2017, Natal. **Anais [...]** Natal: Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN), 2017. 9 p.

SILVA, P. Controle biológico da “traça do cacau” pelo *Microbracon hebetor* (Say). **Boletim Técnico Instituto do Cacau da Bahia**, Salvador, v. 7, p. 1-39, 1947.

SILVEIRA, R. L. L. **Tabaco, sociedade e território: relações e contradições no sul do Brasil**. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2013.

SIMBERLOFF, D.; STILING, P. How risk is biological control? **Ecology**, Washington, v. 77, n. 7, p. 1965-1974, 1996.

SINDITABACO - SINDICATO INTERESTADUAL DA INDÚSTRIA DO TABACO. **Tipos de tabaco**. Santa Cruz do Sul, 2017. Disponível em: <http://sinditabaco.com.br/sobre-o-setor/tipos-de-tabaco/>. Acesso em: 20 out. 2020.

SNYDER, M. J.; WALDING, J. K.; FEYEREISEN, R. Metabolic fate of the allelochemical nicotine in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 24, n. 8, p. 837-846. 1994.

SOARES, M. A. *et al.* Controle biológico de pragas em armazenamento: uma alternativa para reduzir o uso de agrotóxicos no Brasil? **Unimontes Científica**, Montes Claros, v. 11, n. 1/2, p. 52-59, 2009.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memory: from mind to molecules**. New York: Scientific American Library, 1999.

SUMA, P. *et al.* Olfactometer responses of a wild strain of the parasitic wasp *Venturia canescens* (Hymenoptera, Ichneumonidae) obtained from its natural host *Cadra figulilella* (Lepidoptera, Pyralidae) to odours from three stored food products infested with pyralid pests. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 59, p. 55-60, 2014.

TAKAHASHI, T. A. *et al.* An integrative taxonomy of a new species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) with high reproductive capacity. **Neotropical Entomology**, Dordrecht, v. 50, p. 90-99, 2021.

THORPE, K. W.; BARBOSA, P. Effects of consumption of high and low nicotine tobacco by *Manduca sexta* (Lepidoptera: Shingidae) on survival of gregarious

endoparasitoid, *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 12, n. 6, p. 1329-1337, 1986.

THURSTON, R.; FOX, P. M. Inhibition by nicotine of emergence of *Apanteles congregatus* from its host, the tobacco horn worm. **Annals of the Entomological Society of America**, Oxford, v. 65, n. 3, p. 547-550, 1972.

TOGNI, P. H. B. *et al.* Brazilian legislation leaning towards fast registration of biological control agents to benefit organic agriculture. **Neotropical Entomology**, Dordrecht, v. 48, n. 2, p. 175-185, 2019.

TOGNON, R.; SANT'ANA, J.; JAHNKE, S. M. Aprendizagem e memória de *Telenomus podisi* (Hymenoptera, Platygasteridae). **Iheringia Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 103, n. 3, p. 266-271, 2013.

TURLINGS, T. C. J. *et al.* Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. *In*: PAPA, D. R.; LEWIS, A. C. (ed.). **Insect learning: ecological and evolutionary perspectives**. London: Chapman & Hall, 1992. p. 51-78.

VACARI, A. M. *et al.* Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e no controle de qualidade de *Cotesia flavipes*. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 3, p. 355-361, 2012.

VARGAS, C. C. *et al.* Influência da idade do hospedeiro e da aprendizagem no comportamento quimiotáxico e no parasitismo de *Trichogramma pretiosum*. **Iheringia Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 107, p. 1-7, 2017.

VASCONCELOS, C. J. **Desenvolvimento de uma dieta artificial para criação de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae), hospedeiro alternativo de *Trichogramma* spp.** 2017. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

VET, L. E. M.; GROENEWOLD, A. W. Semiochemicals and learning in parasitoids. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, n. 11, p. 3119-3135, 1990.

VIANNA, U.R. *et al.* Espécies e/ou linhagens de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 81-87, 2011.

VINSON, S. B. Parasitoid - Host Relationship. *In*: BELL, W. J.; CARDÉ R. T. (ed.) **Chemical Ecology of Insects**. Boston: Springer, 1984. p. 205-233.

WAINBERG, E.; COLAZZA, S. **Chemical Ecology of Insect Parasitoids**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012.

WANG, X. Q. *et al.* Artificial diet significantly enhance fitness and be applicable in mass-rearing of *Ephesia elutella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). **Crop Protection**, Guildford, v. 147, 105684, 2021.

WANG, Z. Y. *et al.* Mass rearing and release of *Trichogramma* for biological control of insect pests of corn in China. **Biological Control**, Atlanta, v. 68, n. 1, p. 136-144, 2014.

WARSI, S.; MBATA, G. N. Impact of peanut depth and container size on the parasitism of diapausing and nondiapausing larvae of Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae) by *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **Environmental Entomology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 1226-1232. 2018.

YU, D. S.; VAN ACHTERBERG, C.; HORSTMANN, K. **World Ichneumonoidea** 2011: taxonomy, biology, morphology and distribution (Braconidae). Ottawa: Taxapad (Scientific Names for Information Management) Interactive Catalogue, 2012. 1 DVD/CD-ROM.

ZDÁRKOVÁ, E.; LUKAS, J.; HORÁK, P. Compatibility of *Cheyletus eruditus* (Schrank) (Acari: Cheyletidae) and *Cephalonomia tarsalis* (Ashmead) (Hymenoptera: Bethyridae) in biological control of stored grain pests. **Plante Protection Science**, Praga, v. 39, n. 1, p. 29-34, 2003.

ZUCCHI, R. A.; SILVEIRA NETO, S. Entomologia agrícola. In: RAFAEL, J. A. *et al.* (ed.). **Insetos do Brasil**: diversidade e taxonomia. Ribeirão Preto: Holos, 2012. p. 139-150.

3 ARTIGO 1

Influence of a diet containing tobacco on the biology of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) and its parasitoid *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae)*

*Artigo configurado segundo as normas da revista European Journal of Entomology

Artigo publicado: PEZZINI, C.; JAHNKE, S. M.; KÖHLER, A. Influence of a diet containing tobacco on the biology of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) and its parasitoid *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **European Journal of Entomology**, Czech Republic, v. 117, p. 190-198, 2020.

1 **Influence of a diet containing tobacco on the biology of *Ephestia kuehniella***
2 **(Lepidoptera: Pyralidae) and its parasitoid *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera:**
3 **Braconidae)**

4
5 **Cleder PEZZINI^{1,2}, Simone Mundstock JAHNKE¹ and Andreas KÖHLER²**

6
7 ¹ Laboratory of Biological Control of Insects, Faculty of Agronomy, Federal University
8 of Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, Rio
9 Grande do Sul, Brazil; e-mail: cleder.pezzini@hotmail.com, mundstock.jahnke@ufrgs.br

10 ² Laboratory of Entomology, Department of Life Sciences, University of Santa Cruz do
11 Sul (UNISC), Avenida Independência, 2293, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul,
12 Brazil; e-mail: andreas@unisc.br

13
14 **Key words.** Hymenoptera, Braconidae, *Habrobracon hebetor*, Lepidoptera, Pyralidae,
15 *Ephestia kuehniella*, biological control, ectoparasitoid, stored products, artificial diet,
16 *Nicotiana tabacum*

17
18 **Abstract.** Host diet often influences its biological parameters and the success of their
19 parasitoids, both in mass rearing, field research and parasitism in applied biological
20 control programs. *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) is an
21 important biological control agent of the flour moth *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879)
22 (Lepidoptera: Pyralidae), which infests tobacco, grain and other products in storage. This
23 study aimed to evaluate the effect of different proportions of tobacco in artificial diets on
24 the biological parameters of the host *E. kuehniella* and its parasitoid *H. hebetor*. Four
25 classes of Virginia tobacco with different sugar and nicotine concentrations were added

26 to flour diets for moths in different percentages (5, 10 and 15%). The experimental design
27 was completely randomized in a 3×4 factorial scheme (percentage of dietary tobacco \times
28 class of tobacco). In the parasitoid bioassays, hosts fed only with 5% tobacco were used.
29 For *E. kuehniella*, the development time (egg-adult), viability of immature stages, sex
30 ratio, fecundity, egg viability and longevity were measured. For *H. hebetor*, percentage
31 parasitism, offspring sex ratio, number of paralyzed and parasitized larvae, egg-adult
32 viability and parasitism preference were measured. Tobacco classes and percentages
33 added to the diet influenced the development time and viability of *E. kuehniella*. The 5%
34 host diet did not influence the different biological parameters and behaviour of *H.*
35 *hebetor*. For mass rearing of *H. hebetor*, it is unnecessary to add tobacco to the artificial
36 diet in order to improve parasitoid performance.

37

38 INTRODUCTION

39 Integrated pest management programs using parasitoid wasps are becoming
40 increasingly widespread because they are very effective at suppressing populations of
41 agricultural insect pests (Heimpel & Mills, 2017; Sampaio, 2018).

42 The rearing of parasitoids on a natural host is widely used and therefore, it is
43 necessary to simultaneously improve the methods of rearing of their hosts and the mass
44 production of high quality parasitoids (Parra, 2002, 2009). The food of the hosts is one of
45 the main factors that can influence the quality of natural enemies produced in the
46 laboratory. The diet must contain all the essential nutrients for the good development of
47 the host and of high quality parasitoids (Vacari et al., 2012). Thus, these diets must be
48 tested to verify the quality of both the hosts and natural enemies produced (Urrutia et al.,
49 2007; Kishani Farahani et al., 2016).

50 Host quality is an essential factor in determining the fitness of the parasitoids. For
51 the immature parasitoid the host is the sole source of nutrients (Urrutia et al., 2007). As a
52 result, evaluation of host quality by the parental female parasitoid is critical to her
53 reproductive success and offspring fitness, which results in a host selection trade-off
54 between maximizing fecundity and selecting the most suitable hosts for the development
55 of her offspring (Kishani Farahani et al., 2016). Studies indicate that host quality affects
56 the adult size and reproductive performance (Harvey, 2005), female egg load at
57 emergence, as well as sex allocation, percentage parasitism and immature developmental
58 time of parasitoids (Kishani Farahani et al., 2016).

59 Quality of the food of the host affects not only the development or survival of
60 parasitoids, but also their searching behaviour (Kazumu et al., 2019). The few studies on
61 the foraging behaviour of parasitoids in a tritrophic context indicate that females prefer
62 the odour of the food on which their host developed (Liu & Jiang, 2003).

63 *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) is a larval
64 ectoparasitoid, which parasitizes different species of moth such as *Ephestia kuehniella*
65 (Zeller, 1879), *Ephestia elutella* (Hübner, 1796) and *Plodia interpunctella* (Hübner,
66 1813) (Lepidoptera: Pyralidae) (Ghimire & Phillips, 2010, 2014; Farag et al., 2015; Lucas
67 et al., 2015). These moths damage various stored products such as tobacco, flour and
68 grain (Lorini et al., 2015; Athanassiou & Arthur, 2018).

69 To use this parasitoid in biological control programs, mass rearing is necessary in
70 order to obtain the large number of individuals required (Kehrli et al., 2005; Parra, 2009;
71 Silva & Brito, 2015; Solà et al., 2018). There are some reports of rearing *H. hebetor* on
72 artificial diets in vitro (Magro & Parra, 2002; Magro et al., 2006), however, mass rearing
73 of this parasitoid on natural hosts is the most widely used (Aamer et al., 2015; Eslampour
74 & Aramideh, 2016). Therefore, the host is often raised on artificial diets that best support

75 their development in the laboratory (Kurtuluş et al., 2020; Mohammadi & Mehrkhou,
76 2020).

77 Although *E. kuehniella* attacks stored tobacco, it is usually reared on artificial diets
78 mainly consisting of white or whole wheat flour and corn flour, with different percentages
79 of yeast (Magrini et al., 1995; Solis et al., 2006; Ayvaz & Karabörklü, 2008; Bhavanam,
80 2016; Vasconcelos, 2017). In general, based on the best development, nutritional quality,
81 cost of production and ease of acquisition, the aforementioned authors recommend using
82 a diet composed of whole wheat flour (97%) and yeast (3%) to *E. kuehniella*.
83 Furthermore, the processes by which parasitoids find and recognize their hosts in the field
84 can be influenced by the food used for rearing the host, which can adversely affect their
85 effectiveness as biocontrol agents (McAuslane et al., 1990).

86 In Brazil, *H. hebetor* has already been evaluated for the control of *Ephestia* spp.
87 (Parra, 2014) and according to this author (pers. commun.) this parasitoid is produced for
88 controlling of *E. elutella* in stored tobacco. The tobacco plant provides a special challenge
89 to parasitoids because of the presence of natural toxins and repellents (Ujváry, 1999),
90 even so, *H. hebetor* has been found in surveys of tobacco warehouses. However, these
91 parasitoids are adapted to the toxins in their environment (Brower et al., 1995). According
92 to these authors, parasitoids from other cultures and those produced commercially are
93 probably extremely sensitive to tobacco and must be selected for resistance over many
94 generations in order for them to acquire tolerance. Therefore, commodities such as
95 tobacco or hosts feeding on it may be toxic for strains of parasitoids that are not adapted
96 to tobacco.

97 Although dry tobacco has an average of 0 to 20% sugar and 1 to 5% nicotine,
98 these concentrations vary according to the variety, class, leaf position on the plant and its
99 curing process, and is categorized into classes (Collins & Hawks, 2011). The moths do

100 not infest air-cured (Burley) and cigar types of tobacco or attack manufactured tobacco
101 products. It prefers tobacco leaves with a high sugar and low nicotine content (Ashworth,
102 1993). However, the effect of a diet containing tobacco on the wasp has not been well
103 studied. The hypothesis raised in this work is that, if tobacco is added to the diet when
104 producing parasitoids for the biological control of *E. kuehniella* that infest stored tobacco,
105 this may help females to recognize the host when released where the tobacco is stored.
106 On the other hand, the addition of tobacco can compromise the development of hosts and
107 parasitoids.

108 Thus, this study aimed to evaluate the effect of adding different percentages and
109 classes of tobacco to the artificial diet used for rearing *E. kuehniella* on its biological
110 parameters, such as the total development time, adult emergence, viability, sex ratio,
111 number of oocytes per female, viability of the first eggs laid and adult longevity. In
112 addition, the number of larvae paralyzed and parasitized, viability of egg to adult and sex
113 ratio of its parasitoid, *H. hebetor*, as well as its preference for parasitizing hosts reared on
114 different diets, were recorded.

115

116 **MATERIAL AND METHODS**

117 **Laboratory rearing**

118 *Habrobracon hebetor* and *E. kuehniella* were reared in the Entomology
119 Laboratory at the Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), in acclimatized rooms at
120 a temperature of $28 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity (RH) of $50 \pm 20\%$ and 14-h photoperiod.
121 The bioassays were conducted under the same environmental conditions. *E. kuehniella*
122 was reared on an artificial diet consisting of wheat flour (97%) and yeast (3%) (Parra et
123 al., 2014). The parasitoid was supplied with *E. kuehniella* larvae of last instar to parasitize.

124 **Bioassays with *E. kuehniella***

125 Diets containing tobacco (*Nicotiana tabacum* var. Virginia) of four different
126 classes with varying sugar and nicotine concentrations (Table 1) were tested. Each class
127 of tobacco was added in percentages of 5, 10 and 15% to the basic artificial diet (wheat
128 flour + yeast).

129 Previously ground tobacco (in 3 mm) was supplied by the JTI Company (Japan
130 Tobacco International) and nicotine and sugar concentrations (glucose, maltose, sucrose,
131 inositol, fructose) were measured using Near Infrared Ray equipment with
132 electromagnetic waves from 80 nm to 2500 nm.

133 **Table 1**

134 The diets were prepared and stored in plastic containers (12.2 cm tall × 14.6 cm
135 wide × 16.2 cm long) and covered with fine mesh fabric, which held 200 g of the food
136 and 0.08 g of eggs (approximately 2,880 eggs). To evaluate the effect of the treatment on
137 the biological parameters of *E. kuehniella* 20 replicates (containers) of each treatment
138 were used. The experimental design was completely randomized in a 3 × 4 factorial
139 scheme (percentage of tobacco in diet X class of tobacco). The artificial diet without
140 tobacco was used as a control.

141 The development time (egg-adult), the viability of immature stage and the sex
142 ratio of adults were measured from the moment the first adults emerged. Then, the number
143 of individuals that emerged was recorded every 48 h, until no more emerged for two
144 weeks. The classification of the sexes was done by observing the external reproductive
145 organs under a stereomicroscope.

146 After emergence, 20 couples of 24-h old *E. kuehniella* were separated, which
147 consisted of the first individuals that emerged in each treatment. Each couple was placed
148 in a plastic bottle (5.0 cm diameter and 6.5 cm height) with no food and the longevity of

149 the males and females recorded. The fecundity of *E. kuehniella* was obtained by counting
150 the number of oocytes in 20 < 24-h old paired females, which again consisted of the first
151 to emerge in each treatment. Females were killed using ethyl acetate vapour and dissected
152 in ethanol (70%) under a stereomicroscope.

153 Adults of *E. kuehniella* from each treatment were placed in oviposition cages for
154 24 h to record the viability of the first eggs laid. Afterwards, 1,000 eggs were separated
155 and observed for 48 h to determine the percentage that hatched. The sex ratio of the next
156 generation (F2) was obtained by placing the eggs from each treatment in a container with
157 the same diet as that used to rear the adult *E. kuehniella*. There were twenty replicates of
158 each treatment (0.08 g of eggs in 200 g of diet) in which the sex of all the adults that
159 emerged were recorded.

160 **Bioassays of *H. hebetor***

161 Last instar larvae of *E. kuehniella* reared on diets each containing 5% of one of
162 the four classes of tobacco used in the previous bioassays (Table 1) were used to test
163 parasitism by *H. hebetor*, which emerged from hosts raised on an artificial diet without
164 tobacco. This percentage was chosen, since in previous bioassays it was recorded that *E.*
165 *kuehniella* did not develop on diets with a higher percentage of tobacco.

166 To evaluate the numbers of larvae paralyzed and parasitized, viability and sex
167 ratio of *H. hebetor*, females from different original hosts (these hosts reared on different
168 diets) received offered hosts also reared on the four types of diets or in the control (Table
169 2).

170 **Table 2**

171 Mortality of the developmental stages of *H. hebetor* in each of the treatments was
172 determined as described above by evaluating the responses of 10 *E. kuehniella* larvae
173 exposed to a parasitoid couple for 24 h in Petri dishes (9 cm diameter by 2 cm height).

174 Afterwards, the parasitoids were removed from the plates and the number of larvae
175 paralyzed and parasitized, and the number of eggs on the larvae were recorded. Paralyzed
176 larvae were those that did not move when stimulated and parasitized larvae were those
177 that had parasitoid eggs on their body. To record the number of living individuals at each
178 stage of development, the reproductive success and sex ratio, the progeny were kept under
179 the same conditions. After three days, the host larvae were inspected and the number of
180 last instar larvae of the parasitoid recorded, after nine days the number of pupae and after
181 12 days the number of adults. There were twenty replicates of each treatment, with a
182 completely randomized design.

183 **Host preference of *H. hebetor***

184 The preference of *H. hebetor* females for different hosts was evaluated by
185 comparing the origin of the parasitoid in which hosts that were fed the basic artificial diet
186 (white wheat flour + yeast) and those fed a diet containing 5% of tobacco 2. The *E.*
187 *kuehniella* larvae offered for parasitism were reared on the same two diets.

188 A double-choice parasitism arena was built with a 7 cm × 5 cm container in the
189 centre to which at opposite ends equal sized containers were connected by means of a 1
190 cm × 5 cm pipe (Fig. 1). The containers at each end of the arena contained 10 larvae of
191 *E. kuehniella* with no food. A previously paired *H. hebetor* female (< 24 h old), without
192 experience of parasitism, was released in the central container of the arena.

193 The first choice of each parasitoid for one of the outer containers was recorded
194 and after 24 h of exposure the number of larvae paralyzed and parasitized in each
195 container and the number of eggs on them were counted. There were 40 replicates of each
196 treatment.

197

Fig. 1

198 **Data analysis**

199 The data were averaged and analysed for normality using the Shapiro-Wilk test,
200 homoscedasticity using the Hartley test and independence of residues using graphic
201 analysis. For the different biological parameters evaluated for *E. kuehniella* and *H.*
202 *hebetor*, ANOVA assumptions were met, therefore, the parametric student t-test was used
203 for two samples and Tukey for more than two samples ($p < 0.05$). The sex ratio, viability
204 and percentage preference for parasitism were compared using the χ^2 heterogeneity test
205 ($p < 0.05$) (Ayres et al., 2007).

206

207 **RESULTS**

208 **Biological aspects of *E. kuehniella***

209 Within one generation, the total development time of *E. kuehniella* was influenced
210 by the class and percentage of tobacco added to the diet (Table 3). The duration of egg-
211 adult period on diets containing tobacco 1 and 3 was significantly longer than on those
212 containing the same percentages of tobacco 2 and 4. In addition, there was a significant
213 increase in development time with increase in the percentage of tobacco 1 and 3 in the
214 diet (Table 3). *Ephesia kuehniella* did not develop when the diet contained 15% of
215 tobacco 1 and 3. The average development time of insects reared on diets containing 5%
216 of tobacco 2 and 4 did not differ from that of the control (wheat flour only). For other
217 percentages, the development time was longer for these classes of tobacco, however,
218 development was also recorded on diets containing 15% (Table 3).

219 The average numbers of adults of *E. kuehniella* that emerged from the control and
220 5% tobacco 2 and 4 treatments was similar, with significantly lower averages for the other
221 treatments (Table 3). Viability (%) of *E. kuehniella* decreased as more tobacco was added
222 to the diet, regardless of the class of tobacco tested (Table 3). In the first generation the

223 sex ratio did not differ significantly between any of the treatments (Table 3). Similarly,
224 no change in the sex ratio of the F2 generation was recorded for any treatment, which
225 ranged from 0.59 to 0.43 ($\chi^2 = 4.518$; $g1 = 10$; $p < 0.05$).

226 The number of oocytes per female did not differ between females reared on the
227 different diets, which ranged from 182.7 ± 37.05 to 208.4 ± 41.40 (Table 4). Despite the
228 emergence of adults from treatments with class 1 and 3 tobacco (10%), it was not possible
229 to evaluate the number of oocytes per female, viability of first oviposition eggs or
230 longevity of adults due to the low number of individuals due to the viability being below
231 1.2% (Table 3, 4). The viability of the eggs from individuals that were reared on artificial
232 diets with different classes and percentages of tobacco was above 97% for all treatments
233 (Table 4). Similarly, the average longevity of females and males did not differ
234 significantly from the control in any of the treatments. On average, males lived longer
235 than females, regardless of treatment (Table 4).

236 **Table 3**

237 **Table 4**

238 The average daily emergency curves showed that for *E. kuehniella* more than 95%
239 of the individuals on the control diet and tobacco classes 2 and 4 to 5% have already
240 emerged after one month (Fig. 2). However, from treatments with the same percentage of
241 class 1 and 3 tobacco less than 58% emerged (Fig. 2). In the same period, the cumulative
242 emergence from the treatments with 10% of class 2 and 4 tobacco was 54% and 75%,
243 respectively, and for class 1 and 3 tobacco, 9% and 3% (Fig. 2). Only 12% and 24% had
244 emerged within four-weeks from the treatments with 15% class 2 and 4 tobacco (Fig. 2).

245 **Fig 2**

246 **Biological aspects and behaviour of *H. hebetor***

247 The diets of the original host of the parasitoid females and of those larvae that
248 they parasitized, did not influence the ability of *H. hebetor* to paralyze and parasite (Table
249 5). Within each treatment, the average number of larvae paralyzed per female was always
250 higher than that parasitized, with no difference between treatments for both parameters
251 (Table 5).

252 **Table 5**

253 In terms of fecundity, the average number of eggs laid by *H. hebetor* in 24 h was
254 also not affected by the diet of their original hosts or of the larvae they parasitized (Table
255 6). The overall viability of the immature stages of *H. hebetor* did not vary between
256 treatments and was between 34.92% and 45.03%. Comparison of the effect of the diet of
257 their original hosts and that of the larvae they parasitized revealed no significant
258 differences in the sex ratio, which on average was 0.69 ($\chi^2 = 0.368$; $gl = 8$; $p > 0.05$)
259 (Table 6).

260 **Table 6**

261 **Parasitism preference**

262 Females of *H. hebetor* that emerged from hosts fed only on wheat flour or this diet
263 with 5% tobacco showed no preference for larvae reared on either of these diets (Fig. 3).
264 When offered a choice between the two parasitism units the parasitoid did not change its
265 response and remained in a unit for up to 24 h.

266 The average numbers of larvae paralyzed and parasitized, and eggs laid in each
267 unit by the parasitoid did not differ between treatments (Table 7). All the larvae of *E.*
268 *kuehniella* in the unit not visited by the parasitoid survived.

269 **Fig. 3**

270 **Table 7**

271 **DISCUSSION**

272 The increased developmental time of *E. kuehniella* reared on diets containing
273 tobacco with high levels of nicotine (Table 3) could indicate a lower nutritional quality
274 or the presence of unsuitable substances in these diets. According to Parra et al. (2014)
275 the average egg-adult time on a diet consisting of wheat flour (97%) and yeast (3%), at a
276 temperature of 28°C, is 41 days, which corresponds to that recorded on the control diet
277 in the present study. On some of the diets used in this study the average development
278 times were 77 days, nearly twice the normal developmental period. In addition, *E.*
279 *kuehniella* did not complete its development on diets with high percentages of some
280 classes of tobacco. This may be due to the presence of toxic substances such as pyrimidine
281 alkaloids like nicotine and anabasine, as well as the steroids, coumarins and terpenes that
282 are in tobacco and are used as insecticides in agriculture and a vermifuge in livestock
283 because of the high concentrations of these compounds, especially nicotine, in class 1 and
284 3 tobacco (Moratore et al., 2009; Jacomini et al., 2016).

285 In the present study the diets with more than 5% of tobacco adversely affected the
286 immature stages of *E. kuehniella*, resulting in fewer adults emerging, especially from
287 treatments with the classes of tobacco with high concentrations of nicotine. This result
288 can be expected, since tobacco contains substances that are toxic for insects, especially
289 nicotine (Ujváry, 1999). Even so, this species is cited as a pest of stored Virginia tobacco
290 (Gallo et al., 2002; Guedes & Costa, 2006) although farmers report that the Burley variety
291 is attacked less (Krsteska, 2014).

292 On the other hand, the viability of *E. kuehniella* was low in all the treatments and
293 similar results are reported for different artificial diets (Magrini et al., 1995; Solis et al.,
294 2006; Vasconcelos, 2017). Reasons for the wide variation in viability during the egg-
295 adult period may be the genotype or origin of the products used to formulate the artificial

296 diets, since the methodology used in the different studies are similar. As reported for other
297 insects, another factor that could be important is adaptation that occurs due to the
298 accumulation of characteristics in a population reared over several generations in the
299 laboratory, which can lead to speciation (Souza, 2016).

300 Diets on which individuals developed did not affect the sex ratio of the offspring.
301 The desirable sex ratio for rearing *E. kuehniella* is close to 0.5 (Bhavanam, 2016;
302 Vasconcelos, 2017) and the values recorded in our study are similar to this. This is
303 important as it indicates good insect breeding as there are a relatively high number of
304 females, when the sex ratio is close to or higher than 0.5 (Magrini et al., 1993; Ayvaz &
305 Karabörklü, 2008), which ensures a large number of eggs for maintenance of their rearing
306 and of parasitoids' rearing.

307 Another biological parameter evaluated was the number of oocytes per newly
308 emerged female, which did not differ between treatments. It is important to remember
309 that no other studies were found evaluating this parameter for *E. kuehniella*, however, as
310 the number of oocytes reflects oviposition, it is possible to compare our results with those
311 of Vasconcelos (2017), which evaluate different rearing diets and report no variation in
312 the number of eggs, which possibly indicates that there is also no variation in the number
313 of oocytes in females. The classes and percentages of tobacco added to the diets did not
314 affect egg viability, which is also reported by Coelho Filho (2010), Coelho Filho & Parra
315 (2013), Bhavanam (2016) and Vasconcelos (2017), who registered an egg viability of
316 over 90% for this species.

317 No differences were recorded in the longevity of females of *E. kuehniella* between
318 the treatments, which indicates that tobacco in the diets does not affect this parameter.
319 Longevity records for females are 6 to 8 days (Stein & Parra, 1987; Ayvaz & Karabörklü,
320 2008; Vasconcelos, 2017) and are more dependent on temperature, being longer at low

321 than at high temperatures (Coelho Filho, 2010), than on the composition of the diet. The
322 males of *E. kuehniella* lived longer than the females in all treatments, as they died as soon
323 as they stopped ovipositing, which is also reported by Ayvaz & Karabörklü (2008),
324 Coelho Filho (2010) and Vasconcelos (2017).

325 The daily percentage emergence of *E. kuehniella* was highest in the control up to
326 the fourth week, during which more than 95% of the adults emerged. Similar results are
327 reported by Magrini et al. (1995), who report that more than 97% of the adults emerged
328 until the fourth week when reared on a diet of white and yellow corn. The same was
329 recorded here for diets with a 5% content of class 1 and 2 tobacco. In the other treatments,
330 time to emergence was longer and the number of adults that emerged was lower.

331 Our results indicate that host diets containing 5% of the different classes of
332 tobacco had no significant effect on a wide range of characteristics related to the rearing
333 of *H. hebetor*, including paralyzing ability, parasitism, fertility, fecundity, viability and
334 sex ratio. These variables have important implications for the population dynamics of the
335 parasitoid. Although the study of Vacari et al. (2012) indicates that host diet may
336 influence the performance of parasitoids, such as *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891)
337 (Hymenoptera: Braconidae), the same was not recorded in the present study. Other studies
338 on the same aspects, such as those of Urrutia et al. (2007) and Faal-Mohammad-Ali &
339 Shishehbor (2013), also did not record clear differences in parasitoid fitness associated
340 with differences in the diet of the host.

341 Higher numbers of larvae were paralyzed than parasitized in all treatments, which
342 indicates that females tend to paralyze many more hosts than they parasitize. Ghimire &
343 Phillips (2014) report that *H. hebetor* females try to paralyze all nearby hosts before
344 ovipositing. According to Soliman (1940) and Hagstrum (1983), the number of larvae

345 that a female of *H. hebetor* can paralyze within 24 h depends mainly on the age of the
346 parasitoid and the density of hosts.

347 As mentioned in other studies, paralyzed larvae are used by females as a source
348 of food as they feed on the haemolymph, which exudes from the body of the host where
349 the parasitoid inserted its ovipositor in order to paralyse it (Hagstrum, 1983; Serra, 1992).
350 As no differences in this behaviour was recorded in the present study, it seems reasonable
351 to assume that diet did not influence the nutritional quality of the host larvae.

352 In our study, the sex ratio of *H. hebetor* parasitizing *E. kuehniella* was not altered
353 by the different treatments. In contrast, when *H. hebetor* parasitized *Corcyra cephalonica*
354 (Stainton, 1865) (Lepidoptera: Pyralidae) the host diet influenced the production of more
355 females, with the wheat diet being the most suitable (Singh et al., 2006). Our study
356 corroborates the results of Faal-Mohammad-Ali & Shishehbor (2013), who report that the
357 proportion of *H. hebetor* that are females and their fecundity is not affected by whether
358 the diet of their host is wheat flour or corn, rice and barley. The above indicates that host
359 species could possibly have a greater influence on these biological parameters than the
360 diets of the larvae they parasitized. Although no differences were recorded in the progeny
361 and sex ratio of *H. hebetor*, it is important to remember that qualitative and quantitative
362 differences in the chemical composition and physical characteristics of the diets of the
363 host may affect the biological parameters that influence population growth (Singh et al.,
364 2006).

365 As the overall viability of the immature stages of *H. hebetor* was not altered by
366 the diet of the original host or by the diet of the larvae offered to parasitism, it is inferred
367 that the 5% of the different classes of tobacco added to diet did not affect its biology.
368 However, the diet of hosts could affect the searching behaviour and parasitism by the

369 parasitoid in the field as is reported by McAuslane et al. (1990), who report changes in
370 the interaction between parasitoids and their hosts.

371 The females of *H. hebetor* used in this study showed no preference for parasitizing
372 larvae of *E. kuehniella* depending on whether they were reared on diets with or without
373 5% tobacco and their preference was also not dependent on the diet of their original host.
374 These results accord from those of Souza et al. (2014) who report that larvae of *Diatraea*
375 *saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) fed on different varieties of their
376 host plant were equally preferred by female *C. flavipes*. Parasitism preference seems to
377 be more associated with the original host species than its diet (Tognon et al., 2014). This
378 is demonstrated by Goulart et al. (2011), who report that the parasitoid *Trichogramma*
379 *pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitizes eggs of different
380 species, but prefers those of *E. kuehniella*. There is little evidence that parasitoids prefer
381 to parasitize hosts that have fed on a particular food (Vacari et al., 2012).

382 According to Darwish et al. (2003) and Akinkurolere et al. (2009), several host
383 stimuli affect the searching behaviour of the parasitoid *H. hebetor*, in particular, the
384 mandibular gland secretions produced by larvae when feeding, as well as their faeces and
385 secretions. The odours released by the host stimulate the parasitoid to start probing.
386 Furthermore, Darwish et al. (2013) highlight that *H. hebetor* females respond to
387 kairomone released by host larvae, which intensifies their searching and oviposition
388 behaviour. Furthermore, based on olfactometry tests, the volatiles emitted by the faeces
389 of *E. kuehniella* larvae, known as frass, help attract *H. hebetor* females (Favaris, 2016).
390 However, host larvae fed diets with or without tobacco do not change this behaviour in
391 the parasitoid, which is attracted to the host in the same way.

392 As there were no changes in the biological parameters studied and no increase in
393 preference for parasitizing particular hosts, adding tobacco to host diet is unnecessary
394 when introducing *H. hebetor* into environments where tobacco is stored.

395

396 **ACKNOWLEDGEMENTS**

397 To the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
398 for the doctor degree scholarship granted to the first author. To MCTI/CT-Agro/ CNPq
399 38/2013 and Japan Tobacco International (JTI) for financial support.

400

401 **REFERENCES**

402 AAMER N., HEGAZI E. & KHAFAGI W. 2015: Reproductive capacity, sex ratio and
403 longevity of the parasitoid, *Bracon hebetor* (Say) parasitizing the wax moth larvae,
404 *Galleria mellonella* (L.). — Egypt. J. Biol. Pest Contr. **25**: 433–437.

405 AKINKUROLERE R.O., BOYER S., CHEN H. & ZHANG H. 2009: Parasitism and
406 host-location preference in *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae): Role of
407 refuge, choice, and host instar. — J. Econ. Entomol. **102**: 610–615.

408 ASHWORTH J.R. 1993: The biology of *Ephestia elutella*. — J. Stored Prod. Res. **29**:
409 199–205.

410 ATHANASSIOU C.G. & ARTHUR F.H. 2018: Recent advances in stored product
411 protection. Springer, Berlin, 273 pp.

412 AYRES M., AYRES M.J., AYRES D.L. & SANTOS A.S. 2007: BioEstat 5.0 Aplicações
413 Estatísticas na área das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá/CNPq,
414 Belém, 324 pp.

415 AYVAZ A. & KARABÖRKLÜ S. 2008: Effect of cold storage and different diets on
416 *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae). — J. Pest Sci. **81**: 57–62.

- 417 BHAVANAM S.P. 2016: Effect of nutrient limitation on the Mediterranean flour moth,
418 *Ephestia kuehniella* Zeller. PhD thesis, Massey University, Palmerston North, 182 pp.
- 419 BROWER J.H., SMITH L., VAIL P.V. & FLINN P.W. 1995: Biological control. In
420 Subramanyam B. & Hagstrum D.W. (eds): Integrated management of insects in stored
421 products. Marcel Dekker, New York, pp. 223–286.
- 422 COELHO FILHO A. 2010: Otimização da criação de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879),
423 hospedeiro alternativo de *Trichogramma* spp., baseando-se na temperatura, densidade
424 larval e concentração de dióxido de carbono. MSc thesis, Escola Superior de Agricultura
425 “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 81 pp.
- 426 COELHO FILHO A. & PARRA J.R.P. 2013: The effect of rearing in different
427 temperature regimes on the reproduction of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera:
428 Pyralidae). — Environ. Entomol. **42**: 799–804.
- 429 COLLINS W.K. & HAWKS S.N. 2011: Fundamentos da produção do tabaco de estufa.
430 Edunisc, Santa Cruz do Sul, 308 pp.
- 431 DARWISH E., EL-SHAZLY M. & EL-SHERIF H. 2003: The choice of probing sites by
432 *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) foraging for *Ephestia kuehniella* Zeller
433 (Lepidoptera: Pyralidae). — J. Stored Prod. Res. **39**: 265–276.
- 434 ESLAMPOUR L. & ARAMIDEH S. 2016: Adult longevity, fertility and sex ratio of
435 *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing *Ephestia kuehniella*
436 (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae): effect of host artificial diets. — J. Entomol. Zool. Stud.
437 **4**: 189–192.
- 438 FAAL-MOHAMMAD-ALI H. & SHISHEHBOR P. 2013: Biological parameters of
439 *Bracon hebetor* (Hym.: Braconidae) parasitizing *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae):
440 effect of host diet. — J. Crop Prot. **2**: 411–419.

- 441 FARAG N.A., ISMAIL I.A., ELBEHERY H.H.A., ABDEL-RAHMAN R.S. & ABDEL-
442 RAHEEM M.A. 2015: Life table of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae)
443 reared on different hosts. — Int. J. Chemtech Res. **8**: 123–130.
- 444 FAVARIS A.P. 2016: Isolamento do caimomônio de *Anagasta kuehniella* Zeller
445 (Lepidoptera: Pyralidae) responsável pela atração do parasitoide *Habrobracon hebetor*
446 Say (Hymenoptera: Braconidae). MSc thesis, Escola Superior de Agricultura “Luiz de
447 Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 49 pp.
- 448 GALLO D., NAKANO O., NETO S.S., CARVALHO R.P.L., BAPTISTA G.C., BERTI
449 FILHO E., PARRA J.R.P., ZUCCHI R.A., ALVES S.B. VENDRAMIM J.D. ET AL.
450 2002: Entomologia Agrícola. Fealq, Piracicaba, 920 pp.
- 451 GHIMIRE M.N. & PHILLIPS T.W. 2010: Suitability of different Lepidopteran host
452 species for development of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). — Environ.
453 Entomol. **39**: 449–458.
- 454 GHIMIRE M.N. & PHILLIPS T.W. 2014: Oviposition and reproductive performance of
455 *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) on six different pyralid host species.
456 — Ann. Entomol. Soc. Am. **107**: 809–817.
- 457 GOULART M.M.P., BUENO A.F., BUENO R.C.O.F. & DINIZ A.F. 2011: Host
458 preference of the egg parasitoids *Telenomus remus* and *Trichogramma pretiosum* in
459 laboratory. — Rev. Bras. Entomol. **55**: 129–133.
- 460 GUEDES J.V.C. & COSTA I.F.D. 2006: Guia de identificação e manejo integrado das
461 pragas e doenças do fumo. Orium, Santa Maria, 88 pp.
- 462 HAGSTRUM D.W. 1983: Self-provisioning with paralyzed hosts and age, density, and
463 concealment of hosts as factors influencing parasitization of *Ephestia cautella* (Walker)
464 (Lepidoptera: Pyralidae) by *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). — Environ.
465 Entomol. **12**: 1727–1732.

- 466 HARVEY J.A. 2005: Factors affecting the evolution of development strategies in
467 parasitoid wasps: the importance of functional constraints and incorporating complexity.
468 — Entomol. Exp. Appl. **117**: 1–13.
- 469 HEIMPEL G.H. & MILLS N.J. 2017: Biological control: ecology and applications.
470 Cambridge University Press, Cambridge, 380 pp.
- 471 JACOMINI D., TEMPONI L.G., ALVES L.F.A., SILVA E.A.A. & JORGE T.C.M.
472 2016: Extrato de tabaco no controle do besouro cascudinho de aviário. — Pesquisa
473 Agropec. Bras. **51**: 680–683.
- 474 KAZUMU K., VICENCIO E.J.M. & KAINOH Y. 2019: Differences in food plant
475 species of the polyphagous herbivore *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae)
476 influence host searching behavior of its larval parasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera:
477 Braconidae). — Arthr. Plant Interact. **13**: 49–55.
- 478 KEHRLI P., LEHMANN M. & BACHER S. 2005: Mass-emergence devices: a
479 biocontrol technique for conservation and augmentation of parasitoids. — Biol. Contr.
480 **32**: 191–199.
- 481 KISHANI FARAHANI H., ASHOURI A., ZIBAEI A., ABROON P. & ALFORD L.
482 2016: The effect of host nutritional quality on multiple components of *Trichogramma*
483 *brassicae* fitness. — Bull. Entomol. Res. **106**: 633–641.
- 484 KRSTESKA V. 2014: *Ephestia elutella* Hüb. on tobacco. — Tobacco (Macedonia) **64**:
485 70–77.
- 486 KURTULUŞ A., PEHLIVAN S., ACHIRI T.D. & ATAKAN E. 2020: Influence of
487 different diets on some biological parameters of the Mediterranean flour moth, *Ephestia*
488 *kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). — J. Stored Prod. Res. **85**: 1–6.

- 489 LIU S.S. & JIANG L.H. 2003: Differential parasitism of *Plutella xylostella* (Lepidoptera:
490 Plutellidae) larvae by the parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) on two
491 host plant species. — Bull. Entomol. Res. **93**: 65–72.
- 492 LORINI I., KRZYŻANOWSKI F.C., FRANÇA-NETO J.B., HENNING A.A. &
493 HENNING F.A. 2015: Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas.
494 Embrapa, Brasília, 84 pp.
- 495 LUCAS E., RIUDAVETS J. & CASTAÑÉ C. 2015: A banker box to improve the impact
496 of *Habrobracon hebetor* on stored product insects. — IOBC/WPRS Bull. **111**: 403–407.
- 497 MAGRINI E.A., BOTELHO P.S.M., PARRA J.R.P. & HADDAD M.L. 1993:
498 Comparação de dietas artificiais para criação massal de *Anagasta kuehniella* (Zeller)
499 (Lepidoptera: Pyralidae). — Anais Soc. Entomol. Brasil **22**: 361–371.
- 500 MAGRINI E.A., PARRA J.R.P., HADDAD M.L. & BOTELHO P.S.M. 1995:
501 Comparação de dietas artificiais e tipos de milho, para criação de *Anagasta kuehniella*
502 (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae). — Sci. Agric. **52**: 60–64.
- 503 MAGRO S.R. & PARRA J.R.P. 2002: Criação in vitro de *Bracon hebetor*. In Parra J.R.P.,
504 Botelho P.S.M., Corrêa-Ferreira B.S. & Bento J.M.S. (eds): Controle biológico no Brasil:
505 parasitoides e predadores. Manole, São Paulo, pp. 277–293.
- 506 MAGRO S.R., DIAS A.B., TERRA W.R. & PARRA J.R.P. 2006: Biological, nutritional,
507 and histochemical basis for improving an artificial diet for *Bracon hebetor* Say
508 (Hymenoptera: Braconidae). — Neotrop. Entomol. **35**: 215–222.
- 509 MCAUSLANE H.J., VINSON S.B. & WILLIAMS H.J. 1990: Effect of host diet on flight
510 behavior of the parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). — J.
511 Entomol. Sci. **25**: 562–570.
- 512 MOHAMMADI S. & MEHRKHOUS F. 2020: Effects of various cereal flour on life table
513 parameters of *Ephesia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). — J. Crop Prot. **9**: 29–39.

- 514 MORATORE C., DEVICARI M., CUNHA S.S. & BARCELOS D. 2009: Utilização de
515 *Drosophila melanogaster* como bioindicador na avaliação da letalidade de extrato de
516 *Nicotiana tabacum*. — Arq. Inst. Biol. **76**: 471–474.
- 517 PARRA J.R.P. 2002: Comercialização de inimigos naturais no Brasil: uma área
518 emergente. In Parra J.R.P., Botelho P.S.M., Corrêa-Ferreira B.S. & Bento J.M.S. (eds):
519 Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores. Manole, São Paulo, pp. 343–349.
- 520 PARRA J.R.P. 2009: A evolução das dietas artificiais e suas interações em ciência e
521 tecnologia. In Panizzi A.R. & Parra J.R.P. (eds): Bioecologia e Nutrição de insetos, base
522 para o manejo integrado de pragas. Embrapa, Brasília, pp. 91–174.
- 523 PARRA J.R.P. 2014: Biological control in Brazil: an overview. — Sci. Agric. **71**: 345–
524 355.
- 525 PARRA J.R.P., COELHO JÚNIO A., GEREMIAS L.D., BERTIN A. & RAMOS C.J.
526 2014: Criação de *Anagasta kuehniella*, em Pequena escala, para produção de
527 *Trichogramma*. Occasio, Piracicaba, 32 pp.
- 528 SAMPAIO R.M. 2018: Controle Biológico: tecnologias na construção de oportunidades
529 no Brasil. — Anál. Indicad. Agroneg. **13**: 1–4.
- 530 SERRA H.J.P. 1992: Bioecologia do ectoparasito *Habrobracon hebetor* (Say, 1836)
531 (Hymenoptera: Braconidae) em *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera:
532 Pyralidae). MSc thesis, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
533 de São Paulo, Piracicaba, 91 pp.
- 534 SILVA A.B. & BRITO J.M. 2015: Controle biológico de insetos pragas e suas
535 perspectivas para o futuro. — Revista Agropec. Técnica **36**: 248–258.
- 536 SINGH D., SINGH R.P. & TRIPATHI C.P.M. 2006: Effect of host diet on life table
537 statistics of *Bracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). — Biol. Contr. **20**: 165–
538 168.

- 539 SOLÀ M., CASTAÑÉ C., LUCAS E. & RIUDAVETS J. 2018: Optimization of a banker
540 box system to rear and release the parasitoid *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera:
541 Braconidae) for the control of stored-product moths. — J. Econ. Entomol. **111**: 2461–
542 2466.
- 543 SOLIMAN H.S. 1940: Studies in the biology of *Microbracon hebetor* Say (Hymenoptera:
544 Braconidae). — Bull. Soc. Entomol. Egypte **24**: 215–247.
- 545 SOLIS D.R., HABIB M.E.E.D.M., FERNANDES E.S.A., HEBLING M.J.A. & SILVA
546 T.F. 2006: Estudo comparativo do desenvolvimento de *Anagasta kuehniella* (Zeller,
547 1879) (Lepidoptera, Pyralidae) em três dietas artificiais. — Rev. Bras. Zoociênc. **8**: 17–
548 21.
- 549 SOUZA D.R. 2016: Isolamento Reprodutivo entre Linhagens Brasileiras de *Helicoverpa*
550 *zea* e *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). MSc thesis, Escola Superior de
551 Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 16 pp.
- 552 SOUZA J.R., BOIÇA JÚNIOR A.L., PERECIN D., COSTA J.T. & PEIXOTO M.L.
553 2014: Preferência de *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) por
554 lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) alimentadas
555 com diferentes cultivares de cana-de-açúcar. — Revista Ceres **61**: 916–923.
- 556 STEIN C.P. & PARRA J.R.P. 1987: Aspectos biológicos de *Anagasta kuehniella* (Zeller,
557 1879) criada em dois substratos alimentares. — Anais Soc. Entomol. Brasil **16**: 173–185.
- 558 TOGNON R., SANT’ANA J. & JAHNKE S.M. 2014: Influence of original host on
559 chemotaxic behaviour and parasitism in *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera:
560 Platygasteridae). — Bull. Entomol. Res. **104**: 781–787.
- 561 UJVÁRY I. 1999: Nicotine and other insecticidal alkaloids. In Yamamoto I. & Casida
562 J.E. (eds): Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor. Springer,
563 Tokyo, pp. 29–69.

- 564 URRUTIA C.M.A., WADE M.R., PHILLIPS C.B. & WRATTEN S.D. 2007: Influence
565 of host diet on parasitoid fitness: unravelling the complexity of a temperate pastoral
566 agroecosystem. — *Entomol. Exp. Appl.* **123**: 63–71.
- 567 VACARI A.M., GENOVEZ G.S., LAURENTIS V.L. & BORTOLI S.A. 2012: Fonte
568 proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e no controle de
569 qualidade de *Cotesia flavipes*. — *Bragantia* **71**: 355–361.
- 570 VASCONCELOS C.J. 2017: Desenvolvimento de uma dieta artificial para criação de
571 *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae), hospedeiro alternativo de
572 *Trichogramma* spp. MSc thesis, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
573 Universidade de São Paulo, Piracicaba, 44 pp.

574

Table 1. Sugar and nicotine concentrations in each class of Virginia tobacco.

Class	Leaf position on the plant	Indoor class*	Concentration (%)	
			Sugar	Nicotine
Tobacco 1	B (leaf)	B2LF	20.37	3.51
Tobacco 2	C (cutters)	C2LS	17.60	1.58
Tobacco 3	B (leaf)	B2MF	6.39	3.97
Tobacco 4	C (cutters)	C4BS	4.57	1.07

575

* Classification followed by JTI Company (leaf position on the plant, quality, color, style)

576 **Table 2.** Treatments evaluated according to the larvae diet (*Ephestia kuehniella*) of the
 577 original host of *Habrobracon hebetor* females and the larvae offered to parasitism.

<i>E. kuehniella</i> diet	
Original host	Offered host
	Wheat flour
	Wheat flour with tobacco 1
Wheat flour	Wheat flour with tobacco 2
	Wheat flour with tobacco 3
	Wheat flour with tobacco 4
Wheat flour with tobacco 1	Wheat flour with tobacco 1
Wheat flour with tobacco 2	Wheat flour with tobacco 2
Wheat flour with tobacco 3	Wheat flour with tobacco 3
Wheat flour with tobacco 4	Wheat flour with tobacco 4

578 Tobacco diets contained 5% of tobacco in addition to the other constituents. Tobacco 1: sugar 20.37%,
 579 nicotine 3.51%. Tobacco 2: sugar 17.60%, nicotine 1.58%. Tobacco 3: sugar 6.39%, nicotine 3.97%.
 580 Tobacco 4: sugar 4.57%, nicotine 1.07%.

581 **Table 3.** Biological data (mean \pm standard deviation) of *Ephestia kuehniella* reared in the
 582 different treatments and tobacco percentage at $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 20\%$ RH and 14-h
 583 photoperiod: Control: wheat flour diet. Tobacco 1: sugar 20.37%, nicotine 3.51%.
 584 Tobacco 2: sugar 17.60%, nicotine 1.58%. Tobacco 3: sugar 6.39%, nicotine 3.97%.
 585 Tobacco 4: sugar 4.57%, nicotine 1.07%.

Treatment/ Percentage of tobacco in diet	Developmental time (days)	Number of adults that emerged	Viability (%)	Sex ratio *	
Control	39.8 \pm 1.10 a	939.0 \pm 91.33 a	32.6	0.50	
5%	48.2 \pm 1.10 c	443.2 \pm 59.86 d	15.4	0.55	
Tobacco 1	10%	65.4 \pm 4.22 e	33.2 \pm 16.61 f	1.2	0.57
15%	-	-	-	-	
5%	42.2 \pm 1.10 ab	858.8 \pm 18.02 ab	29.8	0.51	
Tobacco 2	10%	47.8 \pm 1.10 bc	783.4 \pm 52.45 b	27.2	0.52
15%	57.8 \pm 1.80 d	321.8 \pm 62.15 e	11.1	0.55	
5%	49.4 \pm 1.67 c	360.2 \pm 29.56 de	12.5	0.54	
Tobacco 3	10%	77.4 \pm 8.66 f	5.4 \pm 5.85 f	0.2	0.56
15%	-	-	-	-	
5%	42.2 \pm 1.10 ab	860.2 \pm 53.04 ab	29.8	0.49	
Tobacco 4	10%	45.8 \pm 1.10 bc	811.2 \pm 32.32 b	28.1	0.50
15%	55.0 \pm 1.41d	547.0 \pm 32.21 c	18.9	0.53	

586 – No adults emerged.

587 Different lower case letters in a column indicate significant differences based on a Tukey test ($p < 0.05$).

588 * No significant difference based on χ^2 heterogeneity test ($p > 0.05$).

589 **Table 4.** Reproductive parameters and adult longevity (mean \pm standard deviation) of
 590 *Ephestia kuehniella* under conditions of $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 20\%$ RH and 14-h photoperiod,
 591 recorded in the different treatments. Control: wheat flour diet. Tobacco 1: sugar 20.37%,
 592 nicotine 3.51%. Tobacco 2: sugar 17.60%, nicotine 1.58%. Tobacco 3: sugar 6.39%,
 593 nicotine 3.97%. Tobacco 4: sugar 4.57%, nicotine 1.07%.

Treatment/ Percentage of tobacco in diet	Number of oocytes per female *	Viability of first eggs laid (%)**	Adult longevity (days)	
			♂*	♀*
Control	204.2 \pm 50.71	98.1	10.8 \pm 2.93 a	7.3 \pm 1.88 b
5%	192.2 \pm 33.38	97.7	11.1 \pm 1.17 a	7.5 \pm 1.99 b
Tobacco 1	-	-	-	-
15%	-	-	-	-
Tobacco 2	202.8 \pm 37.31	98.6	10.9 \pm 1.07 a	7.3 \pm 1.86 b
10%	208.4 \pm 41.40	98.7	10.4 \pm 1.13 a	7.2 \pm 1.52 b
15%	187.3 \pm 34.88	97.5	10.3 \pm 1.37 a	7.7 \pm 1.51 b
Tobacco 3	188.8 \pm 43.61	98.1	11.3 \pm 1.26 a	8.3 \pm 2.21 b
10%	-	-	-	-
15%	-	-	-	-
Tobacco 4	182.7 \pm 37.05	98.8	10.5 \pm 1.69 a	7.6 \pm 1.80 b
10%	207.9 \pm 29.17	97.9	10.6 \pm 1.60 a	6.9 \pm 1.87 b
15%	196.2 \pm 43.46	98.9	10.8 \pm 1.47 a	7.9 \pm 2.04 b

594 – No emergence of adults or insufficient for evaluation.

595 * No significant difference based on Tukey test ($p > 0.05$).

596 ** No significant difference based on χ^2 heterogeneity test ($p > 0.05$).

597 Different lower case letters in a line indicate significant differences based on t test ($p < 0.05$).

598 **Table 5.** Number of larvae of *Ephestia kuehniella* paralyzed and parasitized (mean \pm
 599 standard deviation) by *Habrobracon hebetor* in the different treatments, under conditions
 600 of $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 20\%$ RH and 14-h photoperiod.

<i>E. kuehniella</i> diet		Number of larvae paralyzed *	Number of larvae parasitized *
Original host	Offered host		
	Wheat flour	8.5 \pm 1.98 a	3.9 \pm 1.57 b
	Wheat flour with tobacco 1	8.0 \pm 1.20 a	4.2 \pm 1.19 b
Wheat flour	Wheat flour with tobacco 2	8.8 \pm 1.30 a	3.6 \pm 1.31 b
	Wheat flour with tobacco 3	9.1 \pm 0.96 a	4.4 \pm 1.47 b
	Wheat flour with tobacco 4	8.6 \pm 1.14 a	3.6 \pm 1.14 b
Wheat flour with tobacco 1	Wheat flour with tobacco 1	7.9 \pm 1.40 a	4.7 \pm 1.11 b
Wheat flour with tobacco 2	Wheat flour with tobacco 2	9.1 \pm 0.81 a	3.9 \pm 1.33 b
Wheat flour with tobacco 3	Wheat flour with tobacco 3	8.4 \pm 1.19 a	4.2 \pm 1.15 b
Wheat flour with tobacco 4	Wheat flour with tobacco 4	9.0 \pm 1.41 a	3.6 \pm 1.23 b

601 Tobacco diets contained 5% of tobacco in addition to the other constituents. Tobacco 1: sugar 20.37%,
 602 nicotine 3.51%. Tobacco 2: sugar 17.60%, nicotine 1.58%. Tobacco 3: sugar 6.39%, nicotine 3.97%.
 603 Tobacco 4: sugar 4.57%, nicotine 1.07%. Different lower case letters on a line indicate a significant
 604 difference based on t test ($p < 0.05$).

605 * No significant difference based on Tukey test ($p > 0.05$).

606 **Table 6.** Survival of *Habrobracon hebetor* (mean \pm standard deviation) in the larvae of
 607 *Ephestia kuehniella* in the different treatments, under conditions of $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 20\%$
 608 RH and 14-h photoperiod.

<i>E. kuehniella</i> diet		Number				Viability egg-adult (%)	Sex ratio **
Original host	Offered host	Eggs*	Larvae*	Pupae*	Adults*		
Wheat flour	Wheat flour	19.1 \pm 3.81	9.9 \pm 4.39	8.8 \pm 4.22	8.6 \pm 4.22	45.1	0.68
	Wheat flour with tobacco 1	17.9 \pm 3.99	6.9 \pm 4.67	6.2 \pm 3.93	6.1 \pm 4.32	34.2	0.62
	Wheat flour with tobacco 2	18.1 \pm 7.92	9.7 \pm 8.84	8.4 \pm 7.48	8.1 \pm 7.21	44.6	0.69
	Wheat flour with tobacco 3	18.5 \pm 5.33	9.3 \pm 3.86	8.8 \pm 4.81	8.2 \pm 4.14	44.6	0.70
	Wheat flour with tobacco 4	17.9 \pm 6.06	7.4 \pm 3.67	6.6 \pm 3.79	6.2 \pm 3.30	34.9	0.72
Wheat flour with tobacco 1	Wheat flour with tobacco 1	18.5 \pm 3.64	9.0 \pm 5.33	8.2 \pm 4.59	8.1 \pm 4.17	43.5	0.65
Wheat flour with tobacco 2	Wheat flour with tobacco 2	17.1 \pm 3.94	7.7 \pm 4.30	7.1 \pm 4.48	6.9 \pm 4.45	40.7	0.70
Wheat flour with tobacco 3	Wheat flour with tobacco 3	18.1 \pm 2.96	8.9 \pm 3.30	8.1 \pm 3.85	7.9 \pm 3.62	43.7	0.71
Wheat flour with tobacco 4	Wheat flour with tobacco 4	17.9 \pm 6.06	7.4 \pm 3.67	6.6 \pm 3.79	6.2 \pm 3.30	34.9	0.72

609 Tobacco diets contained 5% of tobacco in addition to the other constituents. Tobacco 1: sugar 20.37%,
 610 nicotine 3.51%. Tobacco 2: sugar 17.60%, nicotine 1.58%. Tobacco 3: sugar 6.39%, nicotine 3.97%.
 611 Tobacco 4: sugar 4.57%, nicotine 1.07%.

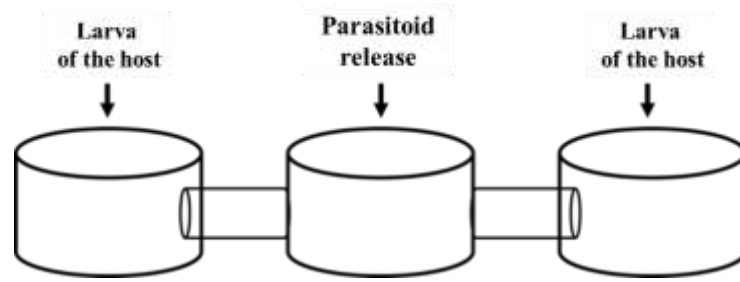
612 * No significant difference based on Tukey test ($p > 0.05$).

613 ** No significant difference based on χ^2 heterogeneity test ($p > 0.05$).

614 **Table 7.** Mean numbers (\pm standard deviation) of larvae of *Ephestia kuehniella* that were
 615 reared in the different treatments that were paralyzed and parasitized and of the eggs laid
 616 on them by females of *Habrobracon hebetor*, under conditions of $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 20\%$
 617 RH and 14-h photoperiod.

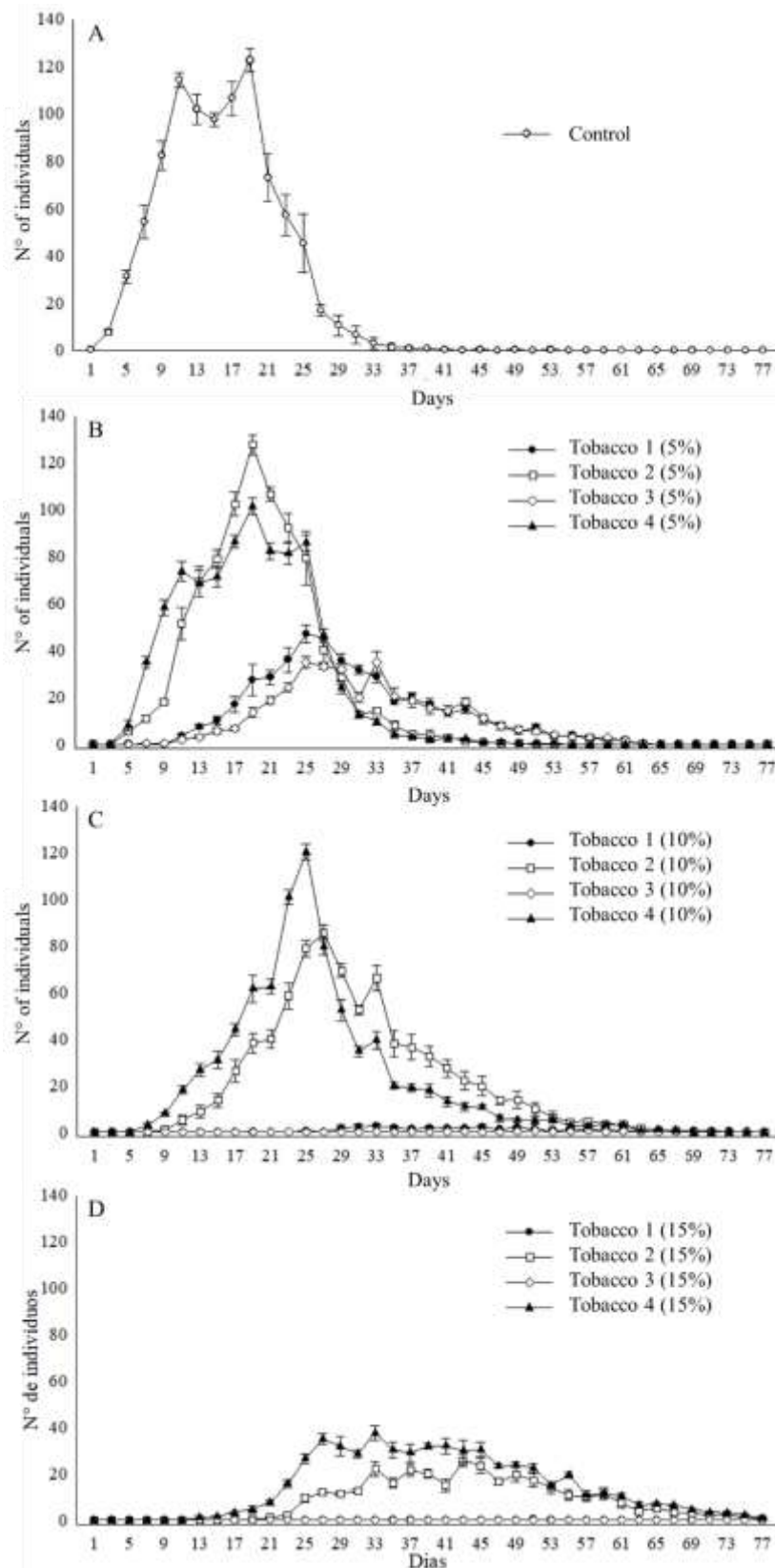
<i>E. kuehniella</i> diet		Number of larvae paralyzed *	Number of larvae parasitized *	Number of eggs*
Original host	Offered host			
	Wheat flour	6.5 \pm 1.27	3.4 \pm 1.19	14.3 \pm 5.24
Wheat flour	Wheat flour with tobacco (5%)	7.3 \pm 1.28	3.7 \pm 1.38	15.6 \pm 7.23
	Wheat flour	6.9 \pm 1.21	2.8 \pm 1.02	13.5 \pm 5.97
Wheat flour with tobacco (5%)	Wheat flour with tobacco (5%)	6.3 \pm 1.51	2.9 \pm 0.99	14.3 \pm 5.94

618 * No significant differences based on Tukey test ($p > 0.05$).



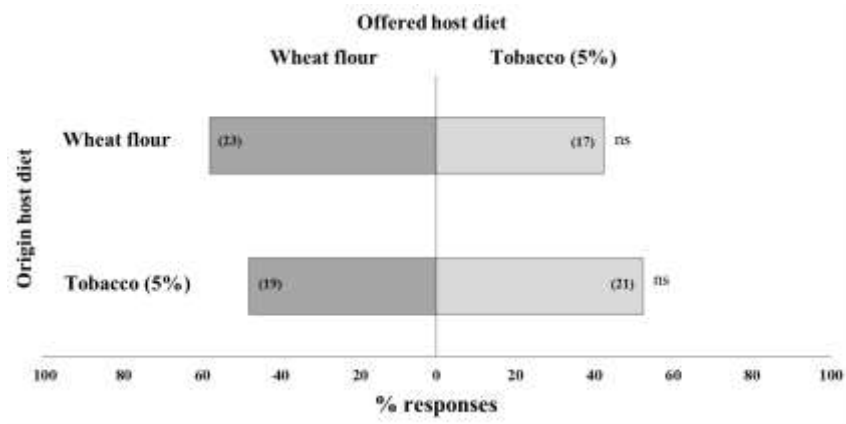
619

620 **Fig. 1.** Schematic diagram of the double choice arena for determining parasitism
621 preferences of *Habrobracon hebetor*.



622

623 **Fig. 2.** Average number (\pm standard error) of adult *Ephestia kuehniella* that emerged over
 624 time in the different treatments. A – control, B – 5% tobacco added to the diet, C – 10%,
 625 D – 15%. Control: wheat flour diet. Tobacco 1: sugar 20.37%, nicotine 3.51%. Tobacco
 626 2: sugar 17.60%, nicotine 1.58%. Tobacco 3: sugar 6.39%, nicotine 3.97%. Tobacco 4:
 627 sugar 4.57%, nicotine: 1.07%.



628

629 **Fig. 3.** Percentage of females of *Habrobracon hebetor* that emerged from larvae reared
 630 on either a diet of wheat flour or the same diet to which 5% tobacco added, which
 631 responded to simultaneously exposed larvae of *Ephestia kuehniella* fed on the above two
 632 diets, under conditions of $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 20\%$ RH 14-h photoperiod. Values in
 633 parentheses indicate the number of responses to each parasitism unit. (ns – no significant
 634 difference based on the χ^2 heterogeneity test, $p > 0.05$).

4 ARTIGO 2

Chemotaxis of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) in response to larvae of *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) and host food substrate with tobacco *

*Artigo configurado segundo as normas da revista Journal of Stored Products Research

Artigo publicado: PEZZINI, C.; ROSA, K. P.; JAHNKE, S. M.; KÖHLER, A. Chemotaxis of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) in response to larvae of *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) and host food substrate with tobacco. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 89, 101680, 2020.

1 **Chemotaxis of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) in response**
2 **to larvae of *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) and host food**
3 **substrate with tobacco**

4

5 Cleder Pezzini^{a,b,*}, Karla Puntel Rosa^b, Simone Mundstock Jahnke^a, Andreas Köhler^b

6

7 ^a Laboratory of Biological Control of Insects, Faculty of Agronomy, Federal University
8 of Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, Rio
9 Grande do Sul, Brazil

10 ^b Laboratory of Entomology, Department of Life Sciences, University of Santa Cruz do
11 Sul (UNISC), Avenida Independência, 2293, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul,
12 Brazil

13

14 *Corresponding author

15

16 E-mail addresses: cleder.pezzini@gmail.com (C. Pezzini), karlapuntelr@gmail.com (K.P.
17 Rosa), mundstock.jahnke@ufrgs.br (S.M. Jahnke), andreas@unisc.br (A. Köhler).

18 **Abstract**

19 *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) is one of the most studied
20 parasitoids for biological control of pest's moths in postharvest environment. However,
21 little is known about the searching behavior and learning ability of this braconid regarding
22 host localization. Thus, this study aimed to evaluate the chemotaxic behavior of female
23 *H. hebetor* with and without parasitism experience to olfactory signals associated with
24 types of stored tobacco and white wheat flour, and the presence of the host *Ephestia*
25 *kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) developed in different diets. The chemotaxic
26 responses of 2-4 day old *H. hebetor* females with and without previous experience of
27 parasitism were observed in a "Y" type olfactometer. The odors of Virginia and Burley
28 tobacco, wheat flour and *E. kuehniella* larvae reared with or without tobacco in their diet
29 were evaluated. As a control, only air was used. Females of *H. hebetor* with no previous
30 experience of parasitism were more responsive to both the host larvae and the different
31 food substrates contrasted with air. In relation to tobacco substrate, both Virginia and
32 Burley, when contrasted with larvae that developed in diet with tobacco, females were
33 more responsive to tobacco volatile. On the other hand, mostly *H. hebetor* females with
34 parasitism experience were more attracted to host larvae when compared to substrates.
35 The number of non-responsive females with parasitism experience, was significantly
36 lower than in the group of females without experience. Through previous experience, the
37 parasitoid was able to develop associative learning, which may increase the efficiency of
38 host search. This is the first record of tobacco attractiveness for the parasitoid *H. hebetor*,
39 an important aspect for the success of biological control programs in tobacco storage.

40

41 **Keywords:** biological control, larval parasitoid, parasitism experience, stored products

42 **1. Introduction**

43 During postharvest, pest insects can be very harmful to stored products and their
44 derivatives (Lorini et al., 2015). Damage can be caused directly through food, resulting
45 in qualitative (nutritional) and quantitative (weight) losses, as well as indirect damage
46 through contamination of live or dead insects and other residues left by their presence in
47 the environment (Nayak and Daglish, 2018). Among the main pest insects that occur in
48 grain and other products in storage environments are *Ephestia elutella* (Hübner), *Ephestia*
49 *kuehniella* and *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) (Navarro and
50 Navarro, 2018). In stored tobacco, these three species cause significant damage by
51 feeding on leaves, and infestation varies by tobacco type, variety and class (Ryan, 1999;
52 Gallo et al., 2002; Guedes and Costa, 2006; Collins and Hawks, 2011).

53 Although chemical control is still the main postharvest control strategy, biological
54 control using parasitoids has been expanding, associated with integrated stored pest
55 management techniques (Schöller et al., 2018). The expansion of biological control in
56 postharvest is due to the low availability of chemical active ingredients authorized for
57 use, in addition to the emergence of resistant insect populations (Lorini et al., 2015).
58 Biological control in warehouses has certain advantages, such as the protection of natural
59 enemies from adverse conditions in the external environment, the location and control of
60 pests in spaces of the storage unit that pesticides may sometimes not reach and the
61 reduction of chemical residues in food (Soares et al., 2009). *Habrobracon hebetor* is a
62 larval ectoparasitoid widely studied for biological control of Pyralidae, Gelechiidae,
63 Noctuidae, Erebidae and Crambidae caterpillars (Farag et al., 2015; Ghimire and Phillips,
64 2014; Cantori, 2019; Mbata and Warsi, 2019).

65 The search behavior of *H. hebetor* for hosts in storage environments can be
66 influenced by several factors such as environmental conditions, host density and food

67 availability (Akinkurolere et al., 2009). These stimuli modify the movement pattern of
68 females searching for hosts (Darwish et al., 2003; Mbata and Warsi, 2019). Similarly, the
69 diet of the host in which the parasitoid was reared may also affect the search behavior (Faal
70 and Shishehbor, 2013). *Habrobracon hebetor* uses chemical, visual, vibrational, and
71 tactile signals/cues to locate hosts (Darwish et al., 2003; Favaris, 2016; Castañé et al.,
72 2018). The parasitoid can respond to volatiles from different sources, which are classified
73 as long or short distance cues (Belda and Riudavets, 2010). Long distance or wide-
74 reaching signals are the first cues used by the parasitoid to search for their hosts and are
75 usually emitted by the host's food (Suma et al., 2014). Short distance cues usually
76 originate from the host itself and are used to locate a specific or preferred host stage for
77 parasitism (Mbata et al., 2017).

78 It is known that *H. hebetor* recognizes volatiles emitted by their hosts and derived
79 from stored products such as grains and cereals (Fukushima et al., 1989; Strand et al.,
80 1989; Parra et al., 1996; Darwish et al., 2003). However, there is no information on how
81 the parasitoid behaves in relation to the volatiles associated with tobacco. The tobacco
82 plant, in general, offers a special challenge to parasitoids associated with herbivore pests,
83 due to the presence of toxins and natural repellents in this plant (Ujváry, 1999). Even so,
84 *H. hebetor* has already been captured in tobacco storage (Figueiredo et al., 2015) and
85 released in augmentation form (Parra, 2014), indicating that this species may have
86 adaptations to toxins present in environments with tobacco storage (Brower et al., 1995).

87 The processes by which parasitoids find and recognize their hosts in the field can
88 also be influenced by the foods used in the rearing of the host, which can adversely affect
89 their effectiveness as biocontrol agents (McAuslane et al., 1990). Parasitoid populations
90 that occur in other crops and those that are produced commercially, are probably sensitive
91 to tobacco and must be selected for resistance for many generations in order to acquire

92 tolerance. This is because in natura, processed products or hosts that feed on it can be
93 toxic to strains of parasitoids that are not adapted to tobacco (Ujváry, 1999). For
94 parasitoids that have mass rearing on *E. kuehniella* larvae, in general, based on the best
95 development, nutritional quality, cost of production and ease of acquisition, the most
96 recommended diet for its rearing is composed of whole wheat flour (97%) and yeast (3%)
97 (Vasconcelos, 2017). Thus, when producing *H. hebetor* for biological control programs
98 in tobacco storage and its processed products the addition of tobacco to the diet used for
99 rearing the host could help the parasitoid to recognize the moth larvae when released in
100 tobacco storage places.

101 Search behavior may be innate, genetically inherited behavior in response to
102 previously experienced stimuli, or individuals may learn patterns as a result of experience
103 (Vet and Groenewold, 1990; Wajnberg and Colazza, 2012). Studies have shown that
104 certain parasitoid species are able to learn and improve responses to the stimuli that they
105 are subjected in adulthood or during development, thus generating learning (Darwish et
106 al., 2003; Vargas et al., 2017; Wajnberg and Colazza, 2012).

107 Determining parasitoid performance against volatiles of tobacco and their learning
108 capacity are important parameters for using *H. hebetor* in biological control programs in
109 tobacco storage. However, little is known about *H. hebetor* search behavior and learning
110 ability for host localization. Thus, this study aimed to evaluate the chemotaxic behavior
111 of female *H. hebetor* with and without parasitism experience to olfactory signals
112 associated with types of stored tobacco and white wheat flour, and the presence of the
113 host *E. kuehniella* developed on different diets.

114 2. Materials and methods

115 2.1. Rearing of organisms

116 The experiments were conducted in the Entomology Laboratory at the University
117 of Santa Cruz do Sul (UNISC). The insects used in the bioassays came from pre-existing
118 laboratory rearing. The eggs used to implant the rearing of *E. kuehniella* came from the
119 Centro de Pesquisa em Florestas da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
120 (FEPAGRO), municipality of Santa Maria - RS. The rearing of *H. hebetor* started after
121 an involuntary contamination in the rearing room (UNISC) of *E. kuehniella*. The insects
122 were kept in climate-controlled rooms with 28 ± 2 °C, relative humidity (RH) of $50 \pm$
123 20% and 14 hours photophase according to Faal and Shishehbor (2013).

124 *Ephestia kuehniella* was fed with two types of artificial diet. The first consisted of
125 type 1 white wheat flour (97%) and brewer's yeast (3%), following the methodology
126 proposed by Parra et al. (2014) and the second contained the same ingredients plus 10%
127 ground Virginia tobacco (3 mm). *Habrobracon hebetor* was reared by offering *E.*
128 *kuehniella* fifth-instar larvae (from a non-tobacco diet); adults were not fed at all.

129

130 2.2. Olfactometry bioassays

131 The bioassays were conducted in a climate-controlled room during photophase,
132 under fluorescent light (60 W, 980 lux). A double choice “Y” type glass olfactometer (1
133 cm diameter, common arm of 12 cm, and each arm with 5 cm) was used. At each end of
134 the olfactometer arms, a treatment in a glass container with air input and outlet was added.
135 An air stream, which was previously filtered with activated charcoal, was conducted into
136 the system with a vacuum pump connected to a flowmeter and humidifier at a rate of 0.5
137 L/min. During the bioassay, the olfactometer was inverted horizontally (180° rotation)
138 every five repetitions, and every ten repetitions was washed with neutral soap and hexane,

139 and then dried in a sterilization oven at 100 °C. After this procedure, the substances were
140 replenished.

141 Responses were considered positive when parasitoids reached the odor source or
142 went at least 3 cm into the arms and remained in this area for at least 1 min. Insects that
143 did not move within the first 5 min or did not reach either arm were considered non-
144 responsive. For each treatment were performed 40 repetitions of responsive insects.

145 The chemotaxis of *H. hebetor* was evaluated in 2-4 day old and mated females
146 that emerged from *E. kuehniella* larvae. Before the bioassays, the females were separated
147 in 1.5 ml Eppendorf-type micro tubes, acclimated for 30 min in the test room, after they
148 were individually inserted into the arena.

149

150 2.2.1. Response of females without experience to white wheat flour and stored tobacco

151 The response of *H. hebetor* females with no previous experience of parasitism and
152 olfactory signals associated with stored products was contrasted between type 1 white
153 wheat flour (always the same brand), pure ground Virginia and Burley tobacco and the
154 control (only odor-free air flow) (Table 1). The same volume of each product was packed
155 (1 g white wheat flour and 0.5 g tobacco for both varieties) at each end of the olfactometer.
156 The products were sieved (1mm mesh) and frozen (-20 °C for 12 h) before starting the
157 bioassays to eliminate any insects that might influence the parasitoid behavior. Both types
158 of tobacco were supplied by Japan Tobacco International (JTI) with records of the
159 appropriate concentrations of nicotine and sugars (Glucose, Maltose, Sucrose, Inositol
160 and Fructose) measured by Near Infrared Rays equipment through electromagnetic waves
161 from 80 nm to 2500 nm. The Virginia tobacco used is frequently affected by pests and
162 had 17.6% sugar and 1.58% nicotine, while sugar-free Burley tobacco with 4.83%
163 nicotine is generally not attacked by pests, possibly due to the high nicotine concentration.

164 **Table 1.** Stored products and control (air) contrasted for attraction by *Habrobracon*
 165 *hebetor* females placed at each end of the olfactometer arms.

Extremity 1		Extremity 2
White wheat flour	X	Control (Air)
Virginia tobacco	X	Control (Air)
Burley tobacco	X	Control (Air)
Virginia tobacco	X	White wheat flour
Burley tobacco	X	White wheat flour
Burley tobacco	X	Virginia tobacco

166

167 *2.2.2. Response of females without experience to E. kuehniella larvae reared on different*
 168 *diets*

169 The chemotaxic behavior of *H. hebetor* females without parasitism experience in
 170 response to the presence of the host was measured with *E. kuehniella* larvae raised on
 171 both diets explained in the item “Rearing of organisms”. In each treatment, 10 last-instar
 172 larvae alive, without the presence of diet (clean), were confined into containers at the ends
 173 of the olfactometer. As a control, only odorless air flow was used (Table 2).

174

175 **Table 2.** Larvae of *Ephestia kuehniella* reared on different diets contrasted regarding
 176 attractiveness to *Habrobracon hebetor* females placed at each end of the olfactometer
 177 arms.

Extremity 1		Extremity 2
<i>E. kuehniella</i> larvae (WF)	X	Control (Air)
<i>E. kuehniella</i> larvae (WF+VT)	X	Control (Air)
<i>E. kuehniella</i> larvae (WF)	X	<i>E. kuehniella</i> larvae (WF+VT)

178 (WF) *E. kuehniella* larvae rearing on diet with wheat flour + yeast.

179 (WF + VT) *E. kuehniella* larvae rearing on diet with wheat flour + yeast + Virginia tobacco.

180

181 *2.2.3. Response of H. hebetor females with and without parasitism experience to larvae*
 182 *presence or stored products*

183 The chemotaxic responses of *H. hebetor* females with and without previous
 184 parasitism experience (24 h of continuous contact with the host) were contrasted in the
 185 treatments comparing the host and stored products (Table 3). The bioassays with
 186 experienced females were performed immediately after 24 h of stimulation with the host

187 larvae. The larvae offered for parasitism experience were raised on the wheat flour/yeast
188 diet. The contrasts used in this bioassay are listed below (Table 3).

189

190 **Table 3.** *Ephestia kuehniella* larvae from different diets and stored products contrasted at
191 each end of the olfactometer arms.

Extremity 1		Extremity 2
<i>E. kuehniella</i> larvae (WF)	X	White wheat flour
<i>E. kuehniella</i> larvae (WF+VT)	X	White wheat flour
<i>E. kuehniella</i> larvae (WF)	X	Virginia tobacco
<i>E. kuehniella</i> larvae (WF+VT)	X	Virginia tobacco
<i>E. kuehniella</i> larvae (WF)	X	Burley tobacco
<i>E. kuehniella</i> larvae (WF+VT)	X	Burley tobacco

192 (WF) *E. kuehniella* larvae rearing on diet with wheat flour + yeast.

193 (WF + VT) *E. kuehniella* larvae rearing on diet with wheat flour + yeast + Virginia tobacco.

194

195 2.3. Data analysis

196 The percentages of chemotactic responses were compared by the nonparametric
197 chi-square heterogeneity test. Mean values were tested for normality by Shapiro-Wilk (p
198 > 0.05). Differences in the average of non-responsive parasitoids in contrast bioassays in
199 the response of *H. hebetor* females with and without parasitism experience to the presence
200 of larvae or stored products were submitted to One-way ANOVA and compared by Tukey
201 test. Analyzes were performed using the Bioestat 5.0[®] program (Ayres et al., 2007), with
202 a significance level of 5%.

203

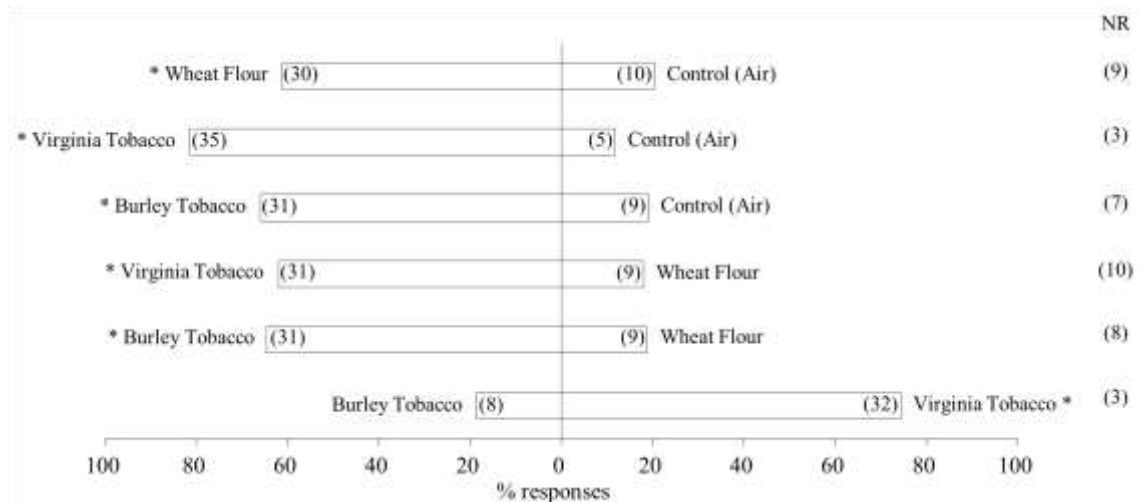
204 3. Results

205 3.1. Response of females without experience to white wheat flour and stored tobacco

206 *Habrobracon hebetor* females without experience were significantly more
207 attracted to the odors of the evaluated stored products than to the control (air) for wheat
208 flour ($\chi^2 = 10.00$; $df = 1$; $p = 0.0016$), Virginia tobacco ($\chi^2 = 22.50$; $df = 1$; $p < 0.0001$)
209 and Burley tobacco ($\chi^2 = 12.10$; $df = 1$; $p = 0.0005$) (Fig. 1).

210 When products were contrasted, Virginia-type tobacco was more attractive to
 211 females than wheat flour ($\chi^2 = 12.10$; $df = 1$; $p = 0.0005$) and the Burley tobacco ($\chi^2 =$
 212 12.10 ; $df = 1$; $p = 0.0005$). Compared to other products, wheat flour was the least
 213 attractive (Fig. 1). When comparing the two types of tobacco, *H. hebetor* females
 214 preferred the Virginia tobacco ($\chi^2 = 14.40$; $df = 1$; $p = 0.0001$) (Fig. 1).

215

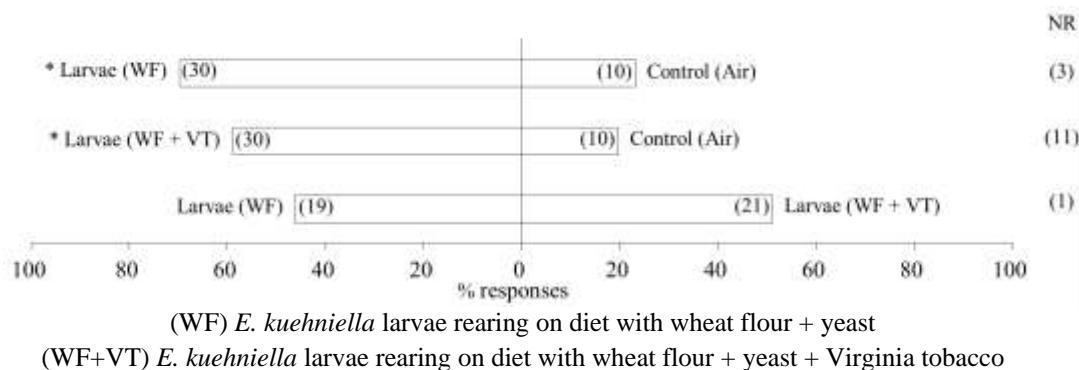


216

217 **Fig. 1.** Percentage of chemotactic responses of *Habrobracon hebetor* females without
 218 experience, tested in double-choice olfactometer with *Ephestia kuehniella* food products.
 219 Numbers in parentheses represent the number of responsive or non-responsive insects
 220 (NR) in the treatments. Value followed by asterisk differs ($p < 0.05$) between treatments.
 221

222 3.2. Response of females without experience to *E. kuehniella* larvae reared on different 223 diets

224 Parasitoids were significantly more responsive to host larvae, regardless of the
 225 type of diet used in rearing of *E. kuehniella* ($\chi^2 = 10.00$; $df = 1$; $p = 0.0016$), when
 226 contrasted to the control (air) (Fig. 2). When odors between larvae of different host diets
 227 were compared, no preference was observed for *H. hebetor* females ($\chi^2 = 0.10$; $df = 1$; p
 228 $= 0.7518$) (Fig. 2).



229
230
231
232
233
234
235
236
237
238

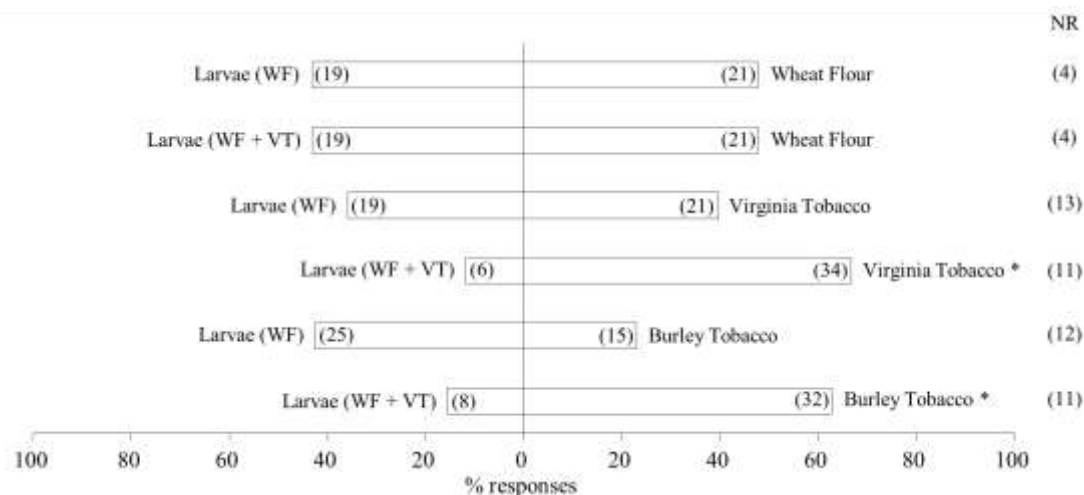
Fig. 2. Percentage of chemotactic responses from *Habrobracon hebetor* females without experience with *Ephestia kuehniella* larvae reared on different diets tested in a double choice olfactometer. Numbers in parentheses represent the number of responsive and non-responsive insects (NR) in the treatments. Value followed by asterisk differs ($p < 0.05$) between treatments.

239 *3.3. Response of H. hebetor females with and without parasitism experience to larvae*
240 *presence or stored products*

241 *Habrobracon hebetor* females without parasitism experience did not distinguish
242 between flour substrate and larvae, regardless of host food and substrate (Fig. 3). An
243 exception occurred in relation to tobacco substrate, both Virginia and Burley, when
244 contrasted with larvae that developed on wheat flour þ yeast þ tobacco, with females being
245 more responsive to tobacco volatile (Fig. 3).

246 On the other hand, *H. hebetor* females with parasitism experience were more
247 attracted to host larvae, regardless of their food type, when contrasted to wheat flour or
248 Burley tobacco substrates (Fig. 4). However, when the Virginia-type tobacco substrate
249 was contrasted with the larvae of both diet types, there was no difference in choice (Fig.
250 4).

251 The average number of non-responsive *H. hebetor* females with parasitism
252 experience, (4.0 ± 0.37) was significantly lower than in the group of females without
253 experience (9.2 ± 1.66) ($F = 9.2226$; $df = 5$; $p < 0.05$).

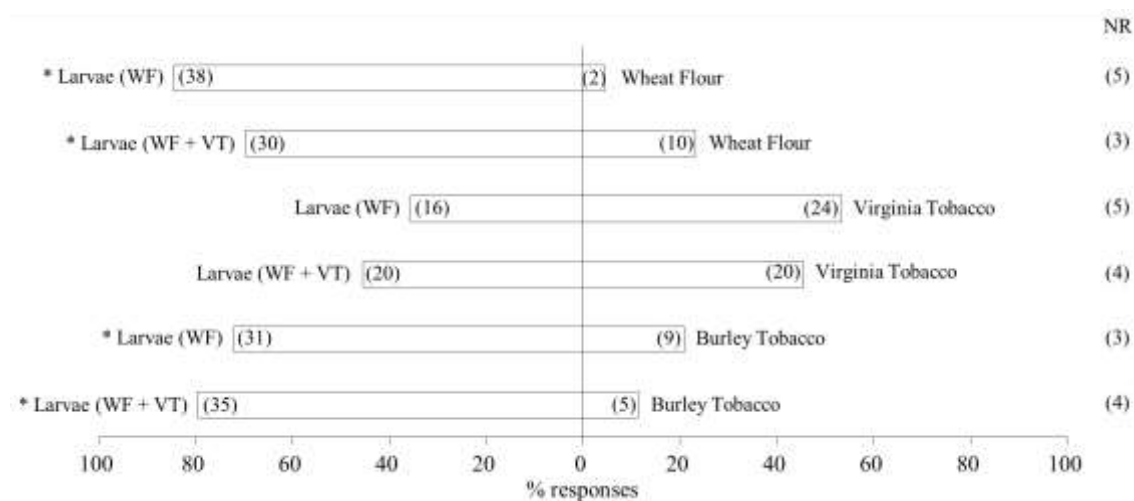


(WF) *E. kuehniella* larvae rearing on diet with wheat flour + yeast

(WF+VT) *E. kuehniella* larvae rearing on diet with wheat flour + yeast + Virginia tobacco

254
255
256
257
258
259
260
261
262
263

Fig. 3. Percentage of chemotactic responses of *Habrobracon hebetor* females, without previous parasitism experience, to *Ephesia kuehniella* larvae tested in double-choice olfactometer with stored products and their host. Numbers in parentheses represent the number of responsive or non-responsive insects (NR) for treatments. Value followed by asterisk differs ($p < 0.05$) between treatments.



(WF) *E. kuehniella* larvae rearing on diet with wheat flour + yeast

(WF+VT) *E. kuehniella* larvae rearing on diet with wheat flour + yeast + Virginia tobacco

264
265
266
267
268
269
270
271
272

Fig. 4. Percentage of chemotactic responses of *Habrobracon hebetor* females with previous parasitism experience to *Ephesia kuehniella* larvae tested in double-choice olfactometer with stored products and their host. Numbers in parentheses represent the number of responsive or non-responsive insects (NR) for treatments. Value followed by asterisk differs ($p < 0.05$) between treatments.

273 4. Discussion

274 Stored product odors attracted *H. hebetor* females, demonstrating that the
275 parasitoid is induced by volatiles of wheat flour and tobacco, which are registered as their
276 hosts' food (Guedes and Costa, 2006; Lorini et al., 2015). However, parasitoids have also
277 been attracted to Burley, although this type of tobacco is not suitable for the development
278 of the host (Ashworth, 1993; Ryan, 1999). The attractiveness of *H. hebetor* to its host's
279 habitat, even without its presence, has already been recorded by Darwish et al. (2003) for
280 other stored products, showing that the volatiles emitted by the host food are the first
281 chemical cues followed. In this case, the parasitoids would be responding to long-distance
282 cues, produced by the spot where the host is found (Belda and Riudavets, 2010). Volatiles
283 emitted from a nonliving (inert) source such as grains and stored products are called
284 apneumones (Vilela and Della Lucia, 2001). These volatiles induce a behavioral or
285 physiological reaction that favors the recipient organism and harms another organism that
286 may be present in that environment (Buzzi, 2003).

287 Similar behavior was reported by Suma et al. (2014) for another parasitoid of
288 stored product pests, *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera, Ichneumonidae).
289 The authors found that the species was attracted to the volatiles emanating from oatmeal
290 and wheat flour, even if they were not infested with pest insects. Another parasitoid of
291 stored product pests, *Anisopteromalus calandrae* (Howard) (Hymenoptera:
292 Pteromalidae), also responded positively to chemical signals from products that their
293 hosts feed on (Belda and Riudavets, 2010). Such results indicate that these parasitoids,
294 are able to perceive volatiles emitted by inert substrates. Thus, in response to chemical
295 mediators, parasitoids can respond to both their host and the substrate where their hosts
296 may be (Belda and Riudavets, 2010; Suma et al., 2014).

297 The present study showed that *H. hebetor* females have a preference for tobacco
298 volatiles, especially for the Virginia variety. The chemical composition of tobacco is
299 already well known (Leffingwell, 2001; Rodgman and Perfetti, 2013), and according to
300 Collins and Hawks (2011), dry tobacco has on average 0-20% sugar and 1-5% nicotine,
301 and these concentrations vary depending on the tobacco variety, type, leaf position and
302 curing process. Although nicotine in tobacco often repels some insect species (Jacomini
303 et al., 2016; Moratore et al., 2009), this action was not observed for this parasitoid.

304 The positive response of the parasitoid in our studies indicate a specialization
305 associated with the substrate. Corroborating our results, this repelling action is not always
306 evident for parasitoids, as shown by Charleston et al. (2001) and Dequech et al. (2010),
307 who evaluated aqueous extracts of nicotine from tobacco on parasitoids *Cotesia plutellae*
308 (Kurdjumov) (Hymenoptera: Braconidae) and *Diadromus collaris* (Gravenhorst)
309 (Hymenoptera: Ichneumonidae) that were parasitizing larvae of *Plutella xylostella*
310 (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae). The authors also did not record any repelling effect
311 for these natural enemies, and even suggested using biological control and this botanical
312 extracts together to control the pest in question.

313 Comparing the results of the two varieties of tobacco tested, the Virginia type,
314 which was preferred by females of *H. hebetor*, has a sweet aroma due to the high sugar
315 concentration of its leaves, associated with the position of the leaf in the plant and the
316 process of curing (drying) (Sumner and Cundiff, 1983). According to Krsteska (2014),
317 this type of tobacco is also the most affected by the action of pests during storage, causing
318 significant lose and quantitative damage. The reason why *H. hebetor* females are attracted
319 to tobacco volatile is unknown. It is assumed that greater attraction of *H. hebetor* to the
320 volatiles of Virginia tobacco is because the parasitoid is more likely to find its host in this
321 product. Another hypothesis is that the different types of carbohydrates present in

322 tobacco, such as fructose, glucose and sucrose, are capable of promoting chemotactic
323 responses of attraction to parasitoid. This can be explained by the fact that the
324 transformation of starch into simple sugars makes parasitoids more attracted to samples
325 with higher concentrations of these components (Meirelles et al., 2009).

326 Recognizing and responding to a mixture of chemicals can be particularly
327 adaptive in environments (Hilker and McNeil, 2008) such as storage. In an applied
328 context, the positive responses of *H. hebetor* females to stored products show that the
329 search behavior of this species towards stored products may result in a greater possibility
330 of host localization in a storage environment, as host larvae are found in these places.

331 *Habrobracon hebetor* females with no previous host experience were more
332 responsive to *E. kuehniella* larvae regardless of the type of diet used for rearing when
333 contrasted with air. This is explained by the fact that the parasitoid, after locating the
334 substrate, initiates the process of localization of the host, using short-distance cues that
335 usually come from the host itself (Belda and Riudavets, 2010). This relationship is
336 directly related to endocrine, physiological and behavioral factors of the organisms
337 (Vinson, 1984).

338 During the bioassays, *H. hebetor* females presented an exploratory behavior,
339 roaming the arena by moving their antennae on the olfactometer walls, as was previously
340 observed by Favaris (2016) for this species. This behavior is associated with the sensory
341 structures located on the insect antennae, which are responsible for perceiving chemical
342 volatiles (Dweck and Gadallah, 2008). There are odors that are released by the host, such
343 as the secretions of the mandibular gland of larvae released during feeding, as well as
344 their feces and secretions. These stimuli are related to search behavior of *H. hebetor*
345 parasitoid for its host and result in probing actions, responding to the kairomone released,
346 which intensifies their search and oviposition behavior (Darwish et al., 2003).

347 The *E. kuehniella* larvae frass is an attractive volatile for *H. hebetor* females at
348 close range, according to olfactometry tests. (Favaris, 2016). In our work, it was observed
349 that the larvae fed a diet with or without tobacco did not change the behavior of the
350 parasitoid, was attracted to the host in the same way. Even without parasitism experience,
351 females were significantly more attracted to the host larvae in this study, when contrasted
352 to the control (air), possibly due to the different volatiles emitted by the host. The acid
353 9,10-dehidroxi-cis-12-octadecenoic was found in the *E. kuehniella* mandibular structures,
354 isolated and described as being responsible for attracting the parasitoid *H. hebetor*
355 (Favaris, 2016; Parra et al., 1996), corroborating the results found herein.

356 When we compare the response of females with and without experience of
357 parasitism in the choice between the larvae and the substrates, we observe that the
358 inexperienced ones respond in the same proportion to the two contrasts. On the other
359 hand, registered that the females with experience, prefer in general the larvae. These
360 results demonstrate that learning from previous contact with the host seems to play an
361 important role in the subsequent recognition of this host (Darwish et al., 2003).

362 As highlighted in several studies, *H. hebetor* females experienced with parasitism
363 tend to develop a much more efficient and rapid response to their host semiochemicals
364 and associated cues than when they have no prior contact with the host (Darwish et al.,
365 2003; Favaris, 2016; Parra et al., 1996; Shonuda and Nasr, 1998). This change is due to
366 the fact that experience acquisition can be triggered even in adulthood after contact with
367 the host (Barron and Corbet, 1999), possibly associated with changes in the nervous
368 system (Vinson, 1984).

369 In our results, there was an exception, when the larvae were developed on flour
370 plus tobacco, females without experience preferred the substrate (Burley and Virginia)
371 instead of the larvae. In experienced females, there was no distinction in the choice

372 between larvae and the substrate Virgínia. This unexpected aspect, however, is
373 interesting, since this is the first record of tobacco attractiveness for the parasitoid *H.*
374 *hebetor*. The choice of substrate instead or in the same proportion as the larvae indicates,
375 probably, a recognition of long distance chemical clues, related to the environment (Belda
376 and Riudavets, 2010). This interesting aspect may be related to the environment in which
377 the species is found. The laboratory rearing of *H. hebetor* of this work started from
378 parasitoids that were naturally attracted by the frass of the last instar larvae *E. kuehniella*,
379 contaminating the host populations. Considering that the region in which the laboratory
380 is located is known for tobacco production (Silveira, 2013), it is possible that the
381 parasitoids, even if currently in artificial creations, recognize tobacco volatiles as host
382 locations. Gas chromatography studies isolating tobacco volatiles and subsequently
383 testing them on electroantennograms with female parasitoids may provide a better
384 understanding of which substances are involved in the recognition of the substrate and
385 host by *H. hebetor*.

386 The importance of experience in parasitoid performance is made explicit at work
387 when comparing the average number of responsive or non responsive females to those
388 with and without parasitism experience. It was found that previous contact with the host
389 significantly affected the incidence of probing. This is clear by the average number of
390 unresponsive individuals, which was 50% smaller in the group of experienced females
391 than in the other. Host search efficiency is achieved through associative learning,
392 allowing the female parasitoid to recognize the host and the volatiles associated with it
393 (Aquino, 2011; Vet and Groenewold, 1990). This may indicate that releasing parasitoids
394 into the environment after previous experience with their hosts may increase their control
395 action.

396 *Habrobracon hebetor* females were attracted by volatile of the host food
397 substrates being virginia type tobacco the most attractive. Regardless of the feeding diet
398 of *E. kuehniella* larvae, females were attracted to the odors emitted by the host. In general,
399 *H. hebetor* females without parasitism experience did not distinguish between substrate
400 and host larvae. On the other hand, females with parasitism experience were more
401 attracted to *E. kuehniella* larvae. This is the first record of tobacco attractiveness for the
402 parasitoid *H. hebetor*, an important aspect for the success of biological control programs
403 in tobacco storage.

404

405 **Acknowledgements**

406 To the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
407 for the doctor degree scholarship granted to the first author and MCTI/CT-Agro/CNPq
408 38/2013. To Japan Tobacco International (JTI) for the financial support.

409

410 **References**

- 411 Akinkurolere, R.O., Boyer, S., Chen, H., Zhang, H., 2009. Parasitism and host-location
412 preference in *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae): role of refuge, choice,
413 and host instar. J. Econ. Entomol. 102, 610-615. <https://doi.org/10.1603/029.102.0219>.
- 414 Aquino, M.F.S.de, 2011. Estudo do comportamento de busca e seleção de hospedeiros
415 dos parasitoides de ovos *Trissolcus basal* e *Telenomus podisi* (Hymenoptera:
416 Scelionidae). Masters dissertation. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.
417 Universidade de Brasília, Brasília, p. 119.
- 418 Ashworth, J.R., 1993. The biology of *Ephesia elutella*. J. Stored Prod. Res. 29, 199-205.
419 [https://doi.org/10.1016/0022-474X\(93\)90001-K](https://doi.org/10.1016/0022-474X(93)90001-K).

- 420 Ayres, M., Ayres Júnior, M., Ayres, D.L., Santos, A.S.dos, 2007. BioEstat 5.0 aplicações
421 estatísticas na área das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém.
- 422 Barron, A.B., Corbet, S.A., 1999. Preimaginal conditioning in *Drosophila* revisited.
423 Anim. Behav. 58, 621-628. <https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1169>.
- 424 Belda, C., Riudavets, J., 2010. Attraction of the parasitoid *Anisopteromalus calandrae*
425 (Howard) (Hymenoptera: Pteromalidae) to odors from grain and stored product pests in
426 a Y-tube olfactometer. Biol. Contr. 54, 29-34. [https://doi.org/10.1016/](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.02.005)
427 [j.biocontrol.2010.02.005](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.02.005).
- 428 Brower, J.H., Smith, L., Vail, P.V., Flinn, P.W., 1995. Biological control. In:
429 Subramanyam, B., Hagstrum, D.W. (Eds.), Integrated management of insects in stored
430 products. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 223-286.
- 431 Buzzi, Z.J., 2003. Coletânea de termos técnicos de entomologia. Editora UFPR, Curitiba.
- 432 Cantori, L.V., 2019. Potencial do ectoparasitoide *Habrobracon hebetor* Say, 1857
433 (Hymenoptera: Braconidae) para controle biológico de treze espécies de lepidópteros
434 praga. Masters dissertation. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz.
435 Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 49.
- 436 Castañé, C., Riudavets, J., Lucas, E., 2018. Parasitism of single or combined pyralid
437 populations by *Venturia canescens* and *Habrobracon hebetor* in laboratory and storeroom
438 conditions. J. Pest. Sci. 91, 1421-1428. [https://doi.org/10.1007/](https://doi.org/10.1007/s10340-018-1010-0)
[s10340-018-1010-0](https://doi.org/10.1007/s10340-018-1010-0).
- 439 Charleston, D.S., Dicke, M., Vet, L.E.M., Kfir, R., 2001. Integration of biological control
440 and botanical pesticides: evaluation in a tritrophic context. In: Endersby, N.M., Ridland,
441 P.M. (Eds.), The management of diamondback moth and other crucifer pests. Proceedings
442 of the Fourth International Workshop on the Management of Diamondback Moth and
443 Other Crucifer Pests, 26-29 November 2001, Melbourne, Australia. The Regional
444 Institute Ltd, Gosford, Australia, pp. 207-216.

- 445 Collins, W.K., Hawks, S.N., 2011. Fundamentos da produção do tabaco de estufa. Editora
446 EDUNISC, Santa Cruz do Sul.
- 447 Darwish, E., El-Shazly, M., El-Sherif, H., 2003. The choice of probing sites by *Bracon*
448 *hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) foraging for *Ephestia kuehniella* Zeller
449 (Lepidoptera: Pyralidae). J. Stored Prod. Res. 39, 265-276. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(02)00023-1)
450 10.1016/S0022-474X(02)00023-1.
- 451 Dequech, S.T.B., Sturza, V.S., Ribeiro, L.doP., Sausen, C.D., Egewarth, R., Milani, M.,
452 Schirmann, J., 2010. Inseticidas botânicos sobre *Liriomyza huidobrensis* Blanchard
453 (Diptera: Agromyzidae) e seus parasitoides em feijão-de-vagem cultivado em estufa.
454 Biotemas 23, 37-43. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2010v23n2p37>.
- 455 Dweck, H.K.M., Gadallah, N.S., 2008. Description of the antennal sensilla of
456 *Habrobracon hebetor*. BioControl 53, 841-856. [https://doi.org/10.1007/s10526-007-](https://doi.org/10.1007/s10526-007-9145-6)
457 9145-6.
- 458 Faal, M.A.H., Shishehbor, P., 2013. Biological parameters of *Bracon hebetor*
459 (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae):
460 effect of host diet. J. Crop Prot. 2, 411-419.
- 461 Farag, N.A., Ismail, I.A., Elbehery, H.H.A., Abdel-Rahman, R.S., Abdel-Raheem, M.A.,
462 2015. Life table of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) reared on different
463 hosts. Int. J. ChemTech Res. 8, 123-130.
- 464 Favaris, A.P., 2016. Isolamento do Cairo-mônio de *Anagasta kuehniella* Zeller
465 (Lepidoptera: Pyralidae) responsável pela atração do parasitoide *Habrobracon hebetor*
466 Say (Hymenoptera: Braconidae). Masters dissertation. Programa de Pós- Graduação em
467 Entomologia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz. Universidade de São
468 Paulo, Piracicaba, p. 49.

- 469 Figueiredo, R.S., Pezzini, C., Zilch, K.C.F., Köhler, A., 2015. Levantamento de
470 himenópteros parasitoides associados à larvas de *Ephestia* sp. (Lepidoptera, Pyralidae) e
471 *Lasioderma* sp. (Coleoptera, Anobiidae) em tabaco armazenado no Rio Grande do Sul,
472 Brasil. In: Proceedings of the XXI Seminário de Iniciação Científica, 2015. Santa Cruz
473 do Sul, Editora EDUNISC, Santa Cruz do Sul.
- 474 Fukushima, J.I., Kuwahara, Y., Suzuki, T., 1989. Isolation and identification of a
475 kairomone responsible for the stinging behavior of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera:
476 Braconidae) from frass of the almond moth *Cadra cautella* Walker. Agric. Biol. Chem.
477 5311, 3057-3059. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869759>.
- 478 Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E.,
479 Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S.,
480 Omoto, C., 2002. Entomologia Agrícola. Fealq, Piracicaba.
- 481 Ghimire, M.N., Phillips, T.W., 2014. Oviposition and reproductive performance of
482 *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) on six different pyralid host species.
483 Ann. Entomol. Soc. Am. 107, 809-817. <https://doi.org/10.1603/AN14046>.
- 484 Guedes, J.V.C., Costa, I.F.D.da, 2006. Guia de identificação e manejo integrado das
485 pragas e doenças do fumo. Orium, Santa Maria.
- 486 Hilker, M., McNeil, J., 2008. Chemical and behavioral ecology in insect parasitoids: how
487 to behave optimally in a complex odorous environment. In: Wajnberg, E., Bernstein, C.,
488 van Alphen, J.J.M. (Eds.), Behavioral Ecology of Insect Parasitoids: from Theoretical
489 Approach to Field Application. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 92-112.
- 490 Jacomini, D., Temponi, L.G., Alves, L.F.A., Silva, E.A.A.da, Jorge, T.C.M., 2016.
491 Extrato de tabaco no controle do besouro cascudinho de aviário. Pesqui. Agropecuária
492 Bras. 51, 680-683. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500032>.
- 493 Krsteska, V., 2014. *Ephestia elutella* Hüb. on tobacco. ТутуН/Tobacco 64, 70-77.

- 494 Leffingwell, J.C., 2001. Chemical Constituents of tobacco leaf and differences among
495 tobacco types. Science Direct Working Paper, Amsterdam.
- 496 Lorini, I., Krzyzanowski, F.C., França-Neto, J.deB., Henning, A.A., Henning, F.A., 2015.
497 Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas. Embrapa, Brasília.
- 498 Mbata, G.N., Eason, J., Payton, M.E., Davis, M.F., 2017. Putative host volatiles used by
499 *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) to locate larvae of *Plodia*
500 *interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). J. Insect Behav. 30, 287-299. <https://doi.org/10.1007/s10905-017-9619-z>.
- 502 Mbata, G.N., Warsi, S., 2019. *Habrobracon hebetor* and *Pteromalus cerealellae* as tools
503 in post-harvest integrated pest management. Insects 10, 1-12. <https://doi.org/10.3390/insects10040085>.
- 505 McAuslane, H.J., Vinson, S.B., Williams, H.J., 1990. Effect of host diet on flight behavior
506 of the parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). J. Entomol. Sci.
507 25, 562-570. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-25.4.562>.
- 508 Meirelles, A.P., Carneiro, T.R., Fernandes, O.A., 2009. Efeito de diferentes fontes de
509 carboidrato e da privação de alimento sobre aspectos biológicos de *Telenomus remus*
510 Nixon (Hymenoptera, Scelionidae). Rev. Bras. Entomol. 53, 457-460.
511 <https://doi.org/10.1590/S0085-56262009000300022>.
- 512 Moratore, C., Devicari, M., Cunha, S.S., Barcelos, D., 2009. Utilização de *Drosophila*
513 *melanogaster* como bioindicador na avaliação da letalidade de extrato de *Nicotiana*
514 *tabacum*, vol. 76. Arquivos do Instituto de Biologia, pp. 471-474.
- 515 Navarro, S., Navarro, H., 2018. Insect pest management of oilseed, corps, tree nuts and
516 dried fruits. In: Athanassiou, C.G., Arthur, F.H. (Eds.), Recent Advances in stored
517 product protection. Springer, Berlin, pp. 99-142.

- 518 Nayak, M.K., Darglish, G.J., 2018. Importance of stored product insects. In: Athanassiou,
519 C.G., Arthur, F.H. (Eds.), Recent advances in stored product protection. Springer, Berlin,
520 pp. 1-18.
- 521 Parra, J.R.P., 2014. Biological control in Brazil: an overview. *Sci. Agric.* 71, 345-355.
522 <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0167>.
- 523 Parra, J.R.P., Coelho Júnior, A., Geremias, L.D., Bertin, A., Ramos, C.J., 2014. Criação
524 de *Anagasta kuehniella*, em pequena escala, para produção de *Trichogramma*. Occasio,
525 Piracicaba.
- 526 Parra, J.R.P., Vinson, S.B., Gomes, S.M., Cônsoli, F.L., 1996. Flight response of
527 *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) in a wind tunnel to volatiles
528 associated with infestations of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Biol.*
529 *Contr.* 6, 143-150. <https://doi.org/10.1006/bcon.1996.0018>.
- 530 Rodgman, A., Perfetti, T.A., 2013. The Chemical components of tobacco and tobacco
531 smoke. CRC Press, Boca Raton.
- 532 Ryan, L., 1999. Post-harvest tobacco infestation control. Springer, Netherlands.
- 533 Schöller, M., Prozell, S., Suma, P., Russo, A., 2018. Biological control of stored-product
534 insects. In: Athanassiou, C.G., Arthur, F.H. (Eds.), Recent advances in stored product
535 protection. Springer, Berlin, pp. 183-210.
- 536 Shonouda, M.L., Nasr, F.N., 1998. Impact of larval-extract (kairomone) of *Ephestia*
537 *kuehniella* Zell. (Lep., Pyralidae), on the behaviour of the parasitoid *Bracon hebetor* Say.
538 (Hym., Braconidae). *J. Appl. Entomol.* 122, 33-35. [https://doi.org/10.1111/j.1439-](https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1998.tb01457.x)
539 [0418.1998.tb01457.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1998.tb01457.x).
- 540 Silveira, R.L.L.da, 2013. Tabaco, sociedade e território: relações e contradições no sul do
541 Brasil. Editora Unisc, Santa Cruz do Sul.

- 542 Soares, M.A., Zanuncio, J.C., Leite, G.L.D., Reis, T.C., Silva, M.A., 2009. Controle
543 biológico de pragas em armazenamento: uma alternativa para reduzir o uso de agrotóxicos
544 no Brasil? Unimontes Cient. 11, 52-59.
- 545 Strand, M.R., Williams, H.J., Vinson, S.B., Mudd, A., 1989. Kairomonal activities of 2-
546 acylcyclohexane-1,3-diones produced by *Ephestia kuehniella* Zeller in eliciting searching
547 behavior by the parasitoid *Bracon hebetor* (Say). J. Chem. Ecol. 15, 1491-1500.
548 <https://doi.org/10.1007/BF01012378>.
- 549 Suma, P., Pergola, A.Ia, Bella, S., Russo, A., 2014. Olfactometer responses of a wild
550 strain of the parasitic wasp *Venturia canescens* (Hymenoptera, Ichneumonidae) obtained
551 from its natural host *Cadra figulilella* (Lepidoptera, Pyralidae) to odours from three
552 stored food products infested with pyralid pests. J. Stored Prod. Res. 59, 55-60.
553 <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2014.05.001>.
- 554 Sumner, P.E., Cundiff, J.E., 1983. Guidelines for Temperature, humidity, and airflow
555 control in tobacco curing, vol. 299. Research bulletin, Georgia.
- 556 Ujváry, I., 1999. Nicotine and other insecticidal alkaloids. In: Yamamoto, I., Casida, J.E.
557 (Eds.), Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor. Springer, Tokyo,
558 pp. 29-69.
- 559 Vargas, C.C., Redaelli, L.R., Sant'Ana, J., Morais, R.M., Padilha, P., 2017. Influência da
560 idade do hospedeiro e da aprendizagem no comportamento quimiotáxico e no parasitismo
561 de *Trichogramma pretiosum*. Iheringia. Série Zool. 107, 1-7. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2017015>.
- 563 Vasconcelos, C.J., 2017. Desenvolvimento de uma dieta artificial para criação de
564 *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae), hospedeiro alternativo de
565 *Trichogramma* spp. Masters dissertation. Escola Superior de Agricultura "Luiz de
566 Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 44.

- 567 Vet, L.E.M., Groenewold, A.W., 1990. Semiochemicals and learning in parasitoids. J.
568 Chem. Ecol. 16, 3119-3135. <https://doi.org/10.1007/BF00979615>.
- 569 Vilela, E.F., Della Lucia, T.M.C., 2001. Feromônios de insetos: biologia, química e
570 emprego no manejo de pragas 2º, ed. Holos, Ribeirão Preto.
- 571 Vinson, S.B., 1984. Parasitoid - host relationship. In: Bell, W.J., Cardé, R.T. (Eds.),
572 Chemical Ecology of Insects. Chapman and Hall, London, pp. 205-233.
- 573 Wajnberg, E., Colazza, S., 2012. Chemical ecology of insect parasitoids. Wiley-
574 Blackwell, Chichester.

5 ARTIGO 3

Influence of tobacco on the behavior, parasitism and mortality of *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associated with eggs of *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae)*

*Artigo configurado segundo as normas da revista Journal of Stored Products Research

Artigo publicado: PEZZINI, C.; RAUBER, M. I.; JAHNKE, S. M.; KÖHLER, A. Influence of tobacco on the behavior, parasitism and mortality of *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associated with eggs of *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 93, 101822, 2021.

1 **Influence of tobacco on the behavior, parasitism and mortality of *Trichogramma***
2 ***pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associated with eggs of**
3 ***Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae)**

4

5 Cleder Pezzini^{ab*}, Milena Isabel Rauber^b, Simone Mundstock Jahnke^a, Andreas Köhler^b

6

7 ^a Laboratory of Biological Control of Insects, Faculty of Agronomy, Federal University
8 of Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, Rio
9 Grande do Sul, Brazil.

10 ^b Laboratory of Entomology, Department of Life Sciences, University of Santa Cruz do
11 Sul (UNISC), Avenida Independência, 2293, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul,
12 Brazil.

13

14 *Corresponding author

15

16 E-mail addresses: cleder.pezzini@gmail.com (C. Pezzini), raubermilena@outlook.com
17 (M.I. Rauber), mundstock.jahnke@ufrgs.br (S.M. Jahnke), andreas@unisc.br (A.
18 Köhler).

19 **Abstract**

20 *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae), is widely used in
21 augmentative biological control programs. However, there is no information on the
22 behavior and biology of this parasitoid in stored tobacco. Thus, this study aims to evaluate
23 the chemotactic response, parasitism, and mortality of females of *T. pretiosum*
24 parasitizing eggs of *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) in the presence
25 of different tobacco types. The chemotactic responses of *T. pretiosum* females were
26 observed with a double and multiple choice olfactometer. The odors of dry Burley and
27 Virginia tobacco and of Virginia tobacco seedlings were evaluated. Treatments with or
28 without the presence of *E. kuehniella* eggs were compared. To evaluate parasitism with
29 and without choice, eggs of *E. kuehniella* adhered to the same tobacco used in the
30 olfactometer. The eggs of *E. kuehniella* were offered to a female of *T. pretiosum* for two
31 hours, with adult parasitoid mortality recorded. In double-choice olfactometer there was
32 no attraction of *T. pretiosum* females to the odors of the different types and classes of dry
33 tobacco evaluated when compared to the control (air). Only tobacco seedlings and *E.*
34 *kuehniella* eggs attracted the parasitoid. Females of *T. pretiosum* preferred tobacco
35 infested with host eggs regardless of the type and class of tobacco. In multiple-choice
36 olfactometer *T. pretiosum* females spent the same time in the area of the arms containing
37 tobacco as in the area of arm containing control (air). The percentage of apparent
38 parasitism of *T. pretiosum* varied according to the surface on which the host's eggs
39 adhered. Although females of *T. pretiosum* responded positively to the host's volatiles,
40 even with the presence of dry tobacco, when they came into direct contact with some
41 types and classes of tobacco there was no parasitism.

42 **Keywords:** Chemotaxis, Biological control, Stored products, Nicotine

43 1. Introduction

44 The egg endoparasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera:
45 Trichogrammatidae), has been widely studied. Its wide use in biological control programs
46 is due to its efficiency, wide geographical distribution, and ease of rearing on a large scale
47 (Mills, 2010). The multiplication of *T. pretiosum* in laboratories and bio-factories is done
48 in factitious hosts, mainly in moth eggs that attack stored products, such as *Ephestia*
49 *kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) and *Sitotroga cerealella* (Olivier)
50 (Lepidoptera: Gelechiidae) (Pratissoli et al., 2004; Wang et al., 2014).

51 *Trichogramma pretiosum* has a wide range of hosts. It is considered a generalist
52 parasitoid (Pizzol et al., 2012). In Brazil, it is commonly found parasitizing eggs of
53 various species of Lepidoptera that are pests of agricultural importance, especially
54 *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Eribidae), *Spodoptera frugiperda* (J.E.
55 Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), and *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:
56 Gelechiidae). It is used especially in biological control programs for soybean, corn, and
57 tomato (Medeiros et al., 2009; Vianna et al., 2011; Balestrin and Bordin, 2016).

58 Although not widely used in grain and food storage environments, biological
59 control with *T. pretiosum* can also be a promising alternative to chemical insecticides
60 applied in these environments (Parra and Zucchi, 2004). There are some records of its use
61 during postharvest to control the moth *S. cerealella* in stored corn, both in bulk and on
62 the ear (Inoue, 1997), and to the moths *Plodia interpunctella* (Hübner) and *Ephestia*
63 *cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) in peanuts stored with shells (Brower and
64 Press, 1990). In addition, other species of *Trichogramma* spp. have been investigated in
65 order to select new candidate for use in mass rearing and biological control against moths
66 in storages (Nasir et al., 2017; Hegazi et al., 2019).

67 The success in using *T. pretiosum* as a bio-control agent depends on the
68 knowledge of its bioecological characteristics related to the interaction with the host, such
69 as its ability to locate and parasitize the target pest (Monje et al., 1999; Wajnberg and
70 Colazza, 2012). The host's location is related to the presence of allelochemicals, such as
71 kairomones, which may attract the pest long and short distances or even by contact
72 (Norlund et al., 1987; Vet and Groenewold, 1990). Several factors may influence the
73 search behavior of *T. pretiosum* for hosts, such as environmental conditions, host density,
74 and food availability (Gross Jr. et al., 1984). These stimuli modify the movement pattern
75 of females in search for hosts (Vinson, 1984).

76 In tobacco crops, there are pest insects that could be controlled using *T. pretiosum*,
77 such as *Manduca sexta paphus* (Cramer) (Lepidoptera: Sphingidae), *Agrotis ipsilon*
78 (Hufnagel) (Lepidoptera, Noctuidae), and *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera,
79 Noctuidae), which cause damage to crops (Slone and Burrack, 2016; Edde, 2018). During
80 post-harvest conditions the parasitoid can be developed in eggs of *Ephestia elutella*
81 (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), *E. kuehniella*, and *P. interpunctella* (Guedes and
82 Costa, 2006; Guedes and Sulzbach, 2006). Meantime, the use of *T. pretiosum* in tobacco
83 crops, whether in the field or in products stored in a warehouse, may face challenges
84 related to some characteristics of this plant, such as the presence of toxins and natural
85 repellents (Ujváry, 1999).

86 There are different types of tobacco grown around the world, in Brazil, the most
87 produced are Virginia and Burley (Kist et al., 2020). Each type of tobacco requires
88 particularities for the cultivation and curing processes. In the processing of tobacco, the
89 leaves already harvested and cured are divided into class, according to the leaf position
90 on the plant, quality, color, style and sugar and nicotine concentration (Collins and
91 Hawks, 2011).

92 Nicotine is the main alkaloid that accumulates in tobacco leaves (Nölke et al.,
93 2018). In commercial cultivars, this compound represents 90% to 95% of all alkaloids, or
94 2-5% of the total leaf dry weight (Saitoh et al., 1985). Nicotine is synthesized in the roots
95 and transported by the xylem to plant shoots, where it accumulates and is stored in the
96 vacuole of leaf cells and may be exudated by trichomes in response to insect herbivory
97 (Hildreth et al., 2011). It is known that *T. pretiosum* recognizes the volatile compounds
98 emitted by plants where its host is located (Peñaflor et al., 2011; Xavier et al., 2011).
99 However, there is no information on how the parasitoid behaves due to volatiles
100 associated with tobacco.

101 The physical characteristics of the host plant may also affect the foraging of
102 parasitoids and the parasitism (Romeis et al., 2005). It is known that the parasitism of *T.*
103 *pretiosum* varies in relation to its leaf area, structures present in the abaxial and adaxial
104 part of leaves (such as trichomes), thorns, and its density, which may affect the walking
105 speed, propensity to fly, parasitism rate, and parasitoid survival (Olson and Andow,
106 2006).

107 Little is known about how the behaviour and the biology of this parasitoid are
108 affected under tobacco conditions and how this may affect its efficiency as a biocontrol
109 agent. Our hypothesis is that tobacco, especially types and classes with high levels of
110 nicotine, can negatively affect the performance of the parasitoid *T. pretiosum* in the
111 control of stored product pests. Thus, this study aims to evaluate the chemotactic
112 response, the parasitism, and the mortality of females of *T. pretiosum* parasitizing eggs
113 of *E. kuehniella* in the presence of different types and classes of tobacco.

114 2. Material and methods

115 2.1 Insect rearing

116 The experiments were conducted in the Entomology Laboratory at the University
117 of Santa Cruz do Sul (UNISC). The insects used in the bioassays came from pre-existing
118 laboratory rearing. The eggs used to implant the rearing of *E. kuehniella* came from the
119 Centro de Pesquisa em Florestas da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
120 (FEPAGRO), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. The moths were reared on an
121 artificial diet consisting of whole-wheat flour (97%) and yeast (3%), in a climate room at
122 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ temperature, $50 \pm 20\%$ relative humidity (RH) under a 14:10 h (L: D)
123 photoperiod.

124 A colony of *T. pretiosum* was established from parasitized egg-masses collected
125 from maize fields. The parasitoids were reared on *E. kuehniella* eggs that were previously
126 sterilized by ultraviolet irradiation. The 0–24-h-old sterilized eggs of *E. kuehniella* were
127 glued on white sheet of paper (10 x 10 cm) with 10% arabic gum, placed in plastic
128 container (15 × 15 x 15 cm) and exposed to the adults of *T. pretiosum*. To maintain the
129 colony, parasitized eggs of *E. kuehniella* were transferred into new plastic container after
130 8 days and kept at the same conditions until emergence of the parasitoids (Parra et al.,
131 2014).

132

133 2.2 Bioassays

134 *Trichogramma pretiosum* females ≤ 48 hours old that emerged from eggs of *E.*
135 *kuehniella*, paired (assume that the females had been mated) and without previous
136 experience of parasitism (they had not yet received eggs) were evaluated. Before the
137 beginning of the bioassays, the females were individualized in 0.5-ml Eppendorf

138 microtubes, arranged in the room for acclimatization under the same conditions as
139 described of rearing during the photophase.

140

141 2.2.1 Double-choice olfactometry

142 The attractiveness of *T. pretiosum* females by different types and classes of
143 tobacco, with or without the host, was evaluated using a double-choice olfactometer. A
144 glass, “Y” tube with 1 cm in diameter, 10 cm in initial arena, and 5 cm in each arm was
145 used. At each end of the olfactometer's arms, a treatment in a glass container with air inlet
146 and outlet was added. An airflow, previously filtered with active carbon, was injected into
147 the system using a vacuum pump connected to a flow meter and a humidifier at a rate of
148 0.3 L/min. The olfactometer was inverted horizontally (180° rotation) every five
149 replications and, every ten replications, it was washed with neutral soap and hexane and
150 then dried in a sterilization oven at 100 °C for two hours. After this procedure, the
151 substances were renewed.

152 To compare the treatments, the response of *T. pretiosum* females was recorded,
153 contrasting (A): dry Burley tobacco vs air (control); (B): dry Virginia tobacco with more
154 nicotine vs air (control); (C): dry Virginia tobacco with less nicotine vs air (control); (D):
155 Virginia tobacco seedling vs air (control); (E): eggs of *E. kuehniella* vs air (control); (F,
156 G, H): different types of dry tobacco infested with host eggs vs different types of dry
157 tobacco (without eggs); and (I): Virginia tobacco infested with host eggs vs Virginia
158 tobacco seedling (without eggs).

159 The dry tobacco was supplied by Japan Tobacco International (JTI). The records of
160 the appropriate concentrations of nicotine were measured using a Near Infrared Rays
161 equipment by measurements of electromagnetic waves from 80 nm to 2500 nm. Three
162 types of dry tobacco were evaluated. Two of the Virginia type, one with a high

163 concentration of nicotine (3.97%), another with a low concentration of nicotine (1.58%),
164 and one of the Burley type, with 4.83% of nicotine. Before starting the bioassays, they
165 were sieved and frozen to eliminate any insects. At the end of each arm of the olfactometer
166 tube, 0.5 g of the product was placed.

167 To obtain seedlings, seeds of Virginia variety was sown in trays in the float system
168 using Carolina Soil® as substrate, without applying any type of chemical pesticide and
169 fertilization. The tobacco seedlings used in the bioassay had around 40 days of
170 development, with five leaves and 10 cm in height. They did not show any herbivory
171 process. In addition, they were inspected to eliminate the presence of any insects that
172 could affect the behavior of the parasitoid. In the olfactometer, the substrate was covered
173 with aluminum foil.

174 A white sheet of paper (75g/m²) with 2 x 2 cm, containing 20 glued eggs of *E.*
175 *kuehniella*, was added to the different types of dry tobacco and live seedlings and placed
176 at the end of one of the olfactometer's arms. At the other end, only the paper with the
177 tobacco was placed.

178 The responses were considered positive when the parasitoids reached the odor
179 source or traveled at least three centimeters inside the arms and remained in this area for
180 at least one minute. Insects that did not move in the first five minutes or that did not reach
181 either arm were considered nonresponsive. For each treatment, 40 responsive parasitoids
182 were evaluated. In cases where there was a very large number of nonresponsive insects,
183 a greater number of parasitoids was assessed, up to a maximum of 40 nonresponsive
184 insects.

185 2.2.2 Multiple-choice olfactometry

186 To assess our hypothesis that the types of dry tobacco, Burley and Virginia with
187 more nicotine and are repellent to females of *T. pretiosum*, they were evaluated by
188 multiple-choice olfactometry. These two types of tobacco were contrasted with air.

189 The multiple-choice olfactometer consisted of a central arena (5 x 5 cm) and four
190 arms (5 cm long x 1 cm wide). Three arms of the olfactometer received one type of
191 tobacco (0.5 g) and one arm received only air (control), following the methodology used
192 to test repellency, proposed by Hassemer et al. (2015). The airflow for each arm and the
193 total vacuum were adjusted to 0.3 L / min. The conditioning of treatments at the
194 extremities of the arms, replacement of odor sources, and cleaning of the olfactometer
195 followed the same procedures as described for the “Y” type olfactometer (2.2.1).

196 The females were released at the center of the olfactometer. The residence time in
197 one of the odor sources was considered when the insect moved 2.0 cm into the arm. In a
198 five-minute interval, the total time spent in each arm was computed as a response variable
199 (Hassemer et al., 2015). For each treatment, 40 responsive parasitoids were evaluated.
200 Insects that remained only in the central area for five minutes (1 cm circle) were
201 considered nonresponsive.

202

203 2.2.3 Apparent parasitism of *T. pretiosum*

204 The purpose of the experiment was to observe whether *T. pretiosum* females
205 parasitized eggs adhered to tobacco. To assess parasitism with no chance of choice, 40
206 eggs of *E. kuehniella* were offered in a Petri dish (6 cm in diameter) for each female of
207 *T. pretiosum* for two hours. Different surfaces were used in each container to glue eggs
208 with arabic gum (2 x 2 cm), being (A and B) Virginia dry tobacco leaves with high and
209 low nicotine concentration, (C) Burley dry tobacco leaves, and (D) fresh leaves of

210 Virginia tobacco seedlings, (E) white sheet of paper (control). The assay comprised five
211 treatments. After two hours, the females were removed, and the eggs were stored under
212 the same rearing conditions until the emergence of parasitoids.

213 To evaluate parasitism in a double-choice test, each substrate described above
214 (types of tobacco) containing 20 eggs of *E. kuehniella* was placed inside a Petri dish (6
215 cm in diameter) at one end of a white sheet of paper (5 x 2 cm). At the other end, the 20
216 eggs adhered directly to a piece of paper. The two groups of eggs were approximately 1
217 cm apart. After two hours, the females were removed, and the eggs of each treatment
218 were stored until the emergence of parasitoids, following the methodology proposed by
219 Vargas et al. (2017).

220 Thirty replications were performed for each treatment and each type of test. The
221 number of emerged parasitoids and the apparent parasitism (number of emerged/eggs
222 offered/*100) were evaluated.

223

224 2.2.4 Mortality of *T. pretiosum*

225 To evaluate the tobacco effect on mortality of adult females of *T. pretiosum*, the
226 same substrates of the parasitism bioassay with no chance of choice, were used. Mortality
227 was recorded every five minutes after the female came into contact with the treatments
228 for the two-hour interval. The evaluation was made using a stereoscopic microscope
229 (40x). Females that did not move with the touch of a brush were considered dead. Thirty
230 replications (females) were made for each treatment.

231

232 2.3 Data analysis

233 Insects considered nonresponsive were not used in the statistical analysis. A
234 binomial generalized linear model was fit to the parasitoid response with a linear predictor

235 (treatment). The goodness-of-fit was evaluated using half-normal plots with a simulated
236 envelope using hnp package (Moral et al., 2017) in R (R Core Team, 2020). An analysis
237 of deviance was performed to assess the significance of the treatment ($p \leq 0.05$).

238 Mean values of residence time in each arm of the multiple-choice olfactometry
239 were assessed by the Friedman test. Apparent parasitism means data were analyzed for
240 normality by D'Agostino test and homoscedasticity by Hartley's test. The assumptions of
241 ANOVA were met and therefore we decided to use the Tukey test. The survival curves
242 were compared with each other using the log rank test. The analyses were performed
243 using the software SPSS 22 (IBM Corp, 2013).

244

245 **3. Results**

246 3.1 Double-choice olfactometry

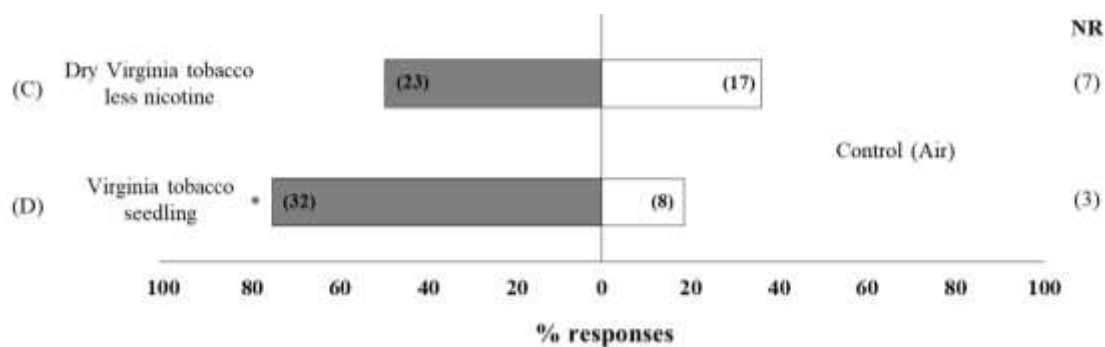
247 There were a large number of nonresponsive insects when comparing dry Burley
248 tobacco (A) and Virginia with more nicotine (B) to the control (ar), 80 and 71%,
249 respectively. These insects responded neither to tobacco nor to air. It was not possible to
250 reach a number of 40 responsive individuals in these treatments. Thus, they were excluded
251 from the statistical analyzes.

252 There was no difference in the percentage of responses of *T. pretiosum* females to
253 the odor of the dry Virginia tobacco with less nicotine when compared to the control (air)
254 (deviance residual = 1.806, $p = 0.1789$) (Fig. 1 C). When contrasting air with Virginia
255 tobacco seedlings, females were more responsive to fresh tobacco volatiles (deviance
256 residual = 30.839, $p < 0.001$) (Fig. 1 D).

257 When evaluating the substrates with the presence of eggs from the host *E.*
258 *kuehniella* or only from the eggs, the females of *T. pretiosum* were significantly more
259 responsive to the host's volatiles than to the control (air) (deviance residual = 10.011, $p <$

260 0,001) (Fig. 2 E). When comparing the different types of tobacco with or without the
 261 presence of the host, females of *T. pretiosum* always preferred substrates infested with
 262 eggs of *E. kuehniella* regardless of the type and class of tobacco (Fig. 2 F, G, H, I).

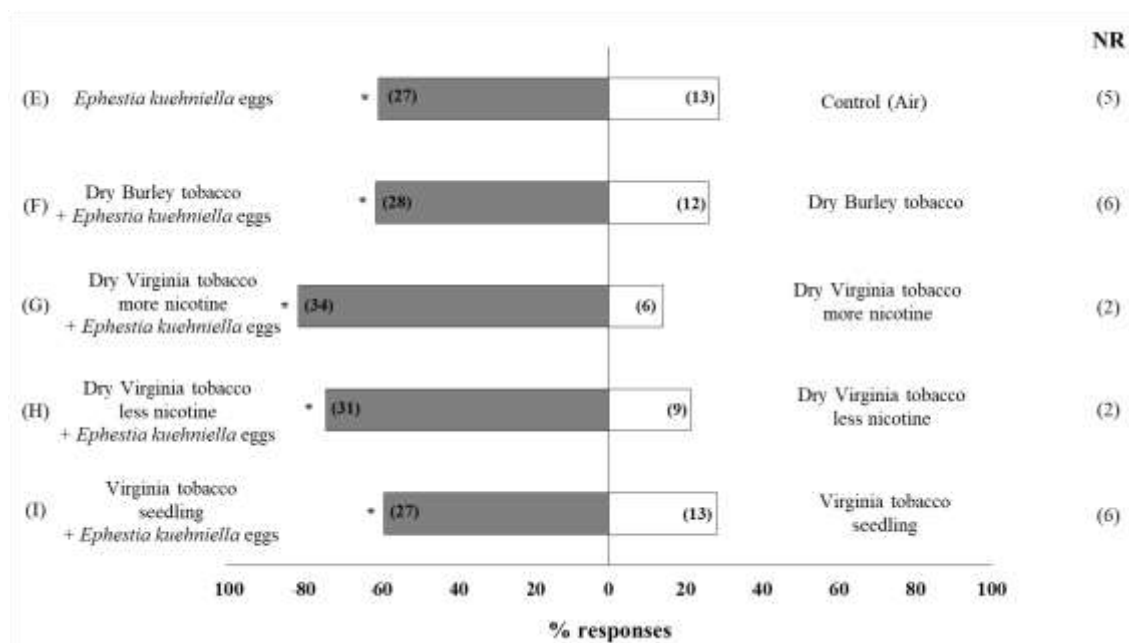
263



264

265 **Fig 1.** Percentage of chemotactic responses of females of *Trichogramma pretiosum*
 266 without parasitism experience evaluated for different types of tobacco in a double-choice
 267 olfactometer (n = 40). The numbers in parentheses are the number of responsive or
 268 nonresponsive (NR) insects to treatments. * indicate difference between treatments
 269 according to chi-square test (p < 0.001) from deviance analysis with binomial generalized
 270 linear model (GLM).

271



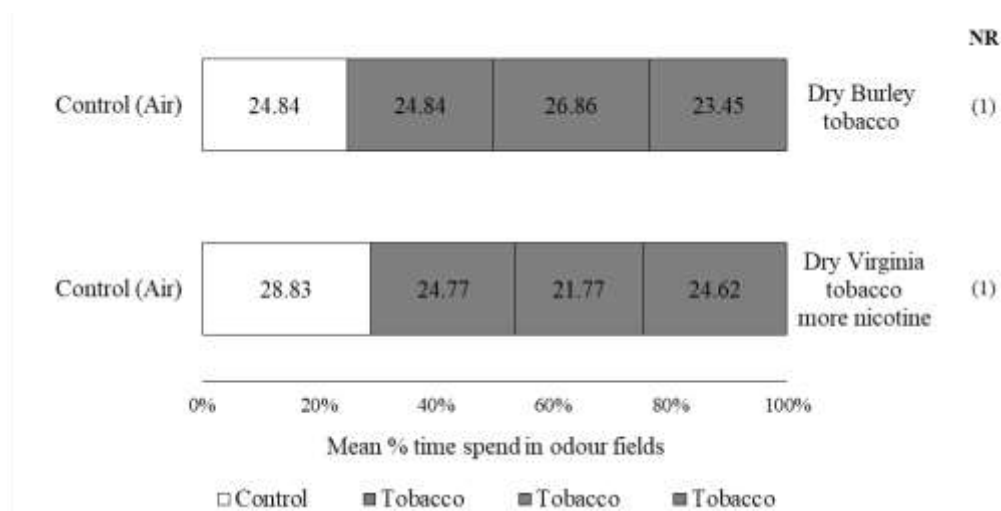
272

273 **Fig. 2.** Percentage of chemotactic responses of females of *Trichogramma pretiosum*
 274 without parasitism experience evaluated for different types of tobacco infested or not with
 275 eggs of *Ephestia kuehniella* in a double-choice olfactometer (n = 40). The numbers in
 276 parentheses are the number of responsive or nonresponsive (NR) insects to treatments. *
 277 indicate difference between treatments according to chi-square test (p < 0.001) from
 278 deviance analysis with binomial generalized linear model (GLM).

279 3.2 Multiple-choice olfactometry

280 In the multiple-choice test, females of *T. pretiosum* spent the same time in the area
 281 of the arm containing air (control) as in the areas of arms containing dry Burley tobacco
 282 (Fn = 0.2; DF = 3; p = 0.9) and dry Virginia tobacco with more nicotine (Fn = 4.3 ; DF =
 283 3; p = 0.2) (Fig. 3). There was no choice preference between treatments.

284



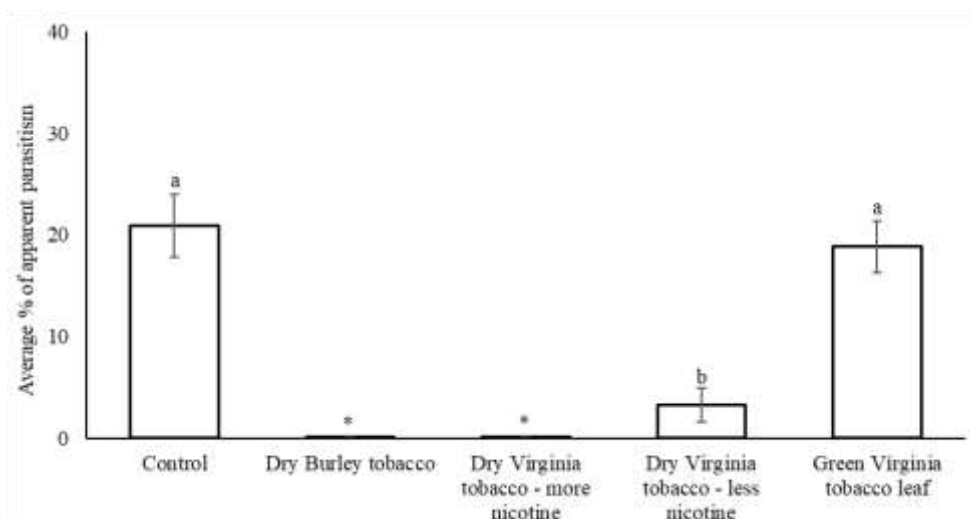
285

286 **Fig. 3.** Residence time (%) of females of *Trichogramma pretiosum* in the four arms of
 287 the olfactometer (n = 40). The numbers in parentheses are the number of nonresponsive
 288 (NR) insects. There was no significant difference (p > 0.05) according to the Friedman
 289 test.

290

291 3.3 Apparent parasitism of *T. pretiosum*

292 In the assay with no choice, the average percentage of apparent parasitism of *T.*
 293 *pretiosum* varied according to the surface on which the host's eggs adhered. There was no
 294 difference in the mean number of parasitized eggs in the control and in green leaves of
 295 Virginia tobacco (Fig. 4). Parasitism in eggs adhered to Virginia dry tobacco leaves with
 296 less nicotine was significantly lower, with only one parasitoid emerging in both Burley
 297 and Virginia dry tobacco with more nicotine (Fig. 4).

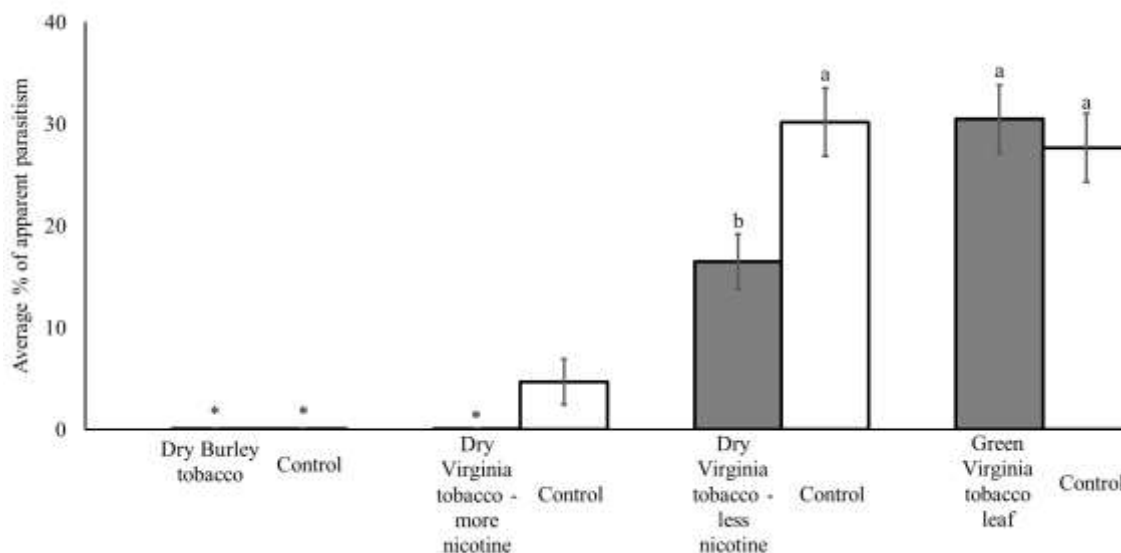


298

299 **Fig. 4.** Average percentage (\pm SE) of apparent parasitism of *Trichogramma pretiosum*
 300 exposed to eggs of *Ephesia kuehniella* adhered to different surfaces. Control (white sheet
 301 of paper) (n = 30). Different lower case letters differ between treatments ($p \leq 0.05$) by
 302 Tukey test. * treatments excluded from the analysis since there was no variability, because
 303 of adult female mortality.

304

305 In the double-choice tests, there was no significant difference in the number of
 306 parasitized eggs between the host adhered to the green Virginia tobacco leaves versus the
 307 paper (control) (Fig. 5). However, females showed a preference for parasitizing eggs
 308 adhered to the paper (control) when exposed simultaneously to dry Virginia tobacco with
 309 less nicotine concentration (Fig. 5). There was no parasitism in the eggs of *E. kuehniella*
 310 adhered to dry leaves of Virginia tobacco with more nicotine, it parasitized the eggs only
 311 in the control. For Burley tobacco there was no parasitism on any of the surfaces due to
 312 the death of parasitoids (Fig. 5).



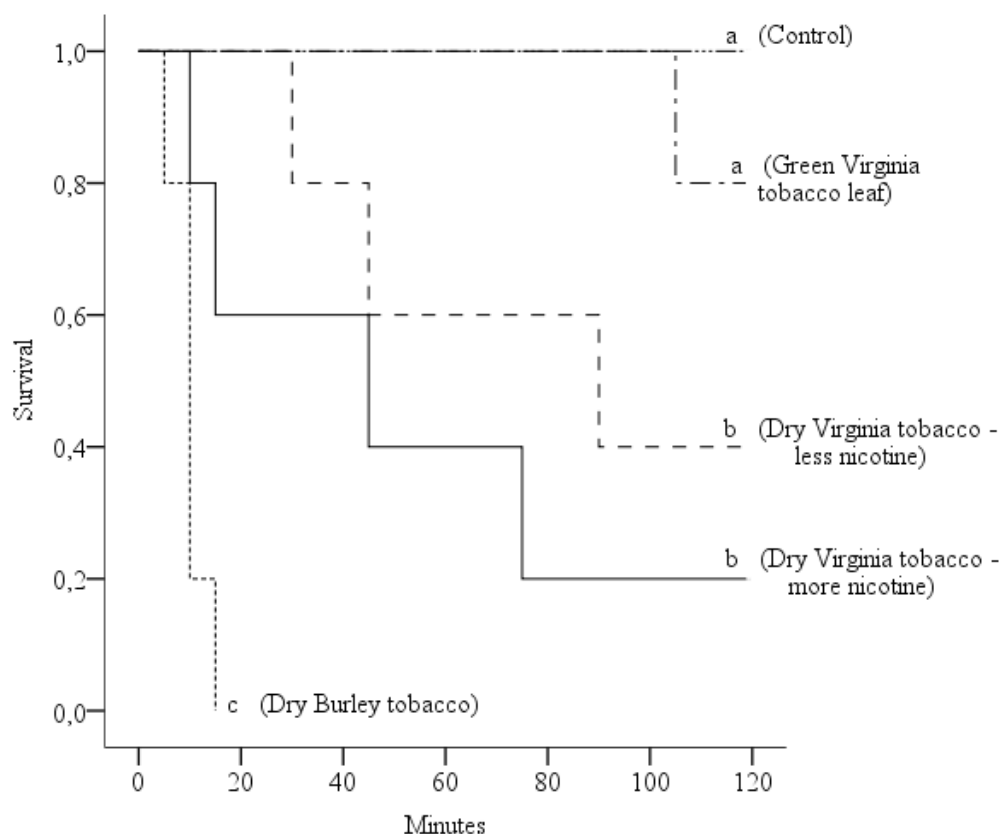
313

314 **Fig. 5.** Average percentage (\pm SE) of apparent parasitism of *Trichogramma pretiosum*
 315 exposed simultaneously to eggs of *Ephesia kuehniella* adhered to two different surfaces.
 316 Control (white sheet of paper) ($n = 30$). Different lower case letters differ between
 317 treatments ($p \leq 0.05$) by Tukey test. * treatments excluded from the analysis since there
 318 was no variability, because of adult female mortality.

319

320 3.4 Mortality of *T. pretiosum*

321 Within two hours, there was no mortality of *T. pretiosum* in the control, which did
 322 not differ from the green Virginia tobacco (Fig. 6). For dry tobacco types, there was an
 323 increase in mortality over time. For Virginia with low and high concentrations of nicotine,
 324 at the end of 120 minutes, only 40 and 20% of the parasitoids remained alive, respectively
 325 (Fig. 6). The Burley tobacco caused the mortality of 100% of females of *T. pretiosum* in
 326 just 15 minutes of exposure (Fig. 6).



327

328 **Fig. 6.** Survival over time for adults of *Trichogramma pretiosum* exposed to eggs of
 329 *Ephestia kuehniella* fixed on different surfaces. Control (white sheet of paper) (n = 30).
 330 Different letters differ between treatments ($p \leq 0.05$) by Log rank test.

331

332 4. Discussion

333 The lack of attractiveness to dry Burley and Virginia tobacco with a high nicotine
 334 content, recorded in the double-choice bioassay by females of *T. pretiosum* may be an
 335 indication that nicotine can inhibit the response to other volatiles present in tobacco that
 336 attract the parasitoid, despite being food for its hosts (Guedes and Costa, 2006; Lorini et
 337 al., 2015). This may indicate that *T. pretiosum* is not adapted to the nicotine. Although
 338 *T. pretiosum* parasitism has been reported on *P. interpunctella*, *E. cautella* and *S.*
 339 *cereallega* eggs, it occurs in stored peanuts and corn (Brower and Press, 1990; Inoue,
 340 1997), but not associated with tobacco.

341 The large number of nonresponsive insects recorded in tobacco treatments with a
 342 high concentration of nicotine could also indicate a inhibition in behavior of *T. pretiosum*.

343 On the other hand, in the multiple-choice arena the parasitoids had the same residence
344 time in the areas of the arms with dry tobacco, even in those with a higher concentration
345 of nicotine, as in air, showing that in this system, there was no repellent or attractive effect
346 of dry tobacco on females of *T. pretiosum*. It is possible that the odor of tobacco has
347 spread throughout the arena, making it difficult to distinguish sources of odor for females.
348 Perhaps the arena size was insufficient to assess the behavior, however, as we follow the
349 methodology proposed by Hassemer et al. (2015), we assume that the test is sufficient to
350 infer that, although there was no attractiveness in the double-choice olfactometer, the odor
351 does not repel the female from the parasitoid.

352 Unlike what we observed in the double-choice bioassays with dry tobacco in the
353 present study, the larval ectoparasitoid *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera:
354 Braconidae), which also has *E. kuehniella* as a host, responded positively to chemical
355 signals from dry tobacco regardless of the amount of nicotine in leaves (Pezzini et al.,
356 2020), evidencing a greater adaptation to the stored tobacco/moth system, with a greater
357 success in parasitism by this species.

358 The attraction or not of females of *T. pretiosum* to the different types and classes
359 of dry or green tobacco may be associated with nicotine concentration in leaves. It is
360 known, as previously mentioned, that nicotine represents most of the alkaloids present in
361 tobacco leaves (Nölke et al., 2018) and that it is accumulated in leaf cell vacuoles and can
362 be exudated by trichomas in response to herbivory (Hildreth et al., 2011). This mechanism
363 is part of the plant's direct defense against herbivores and is known to be a type of
364 secondary defense metabolite (Leffingwell, 2001; Kessler and Baldwin, 2002). However,
365 the indirect defense, by attracting natural enemies, is known only to a few insects
366 associated with the system, such as the larval parasitoid *H. hebetor* that parasitizes moths
367 with *E. kuehniella* in stored tobacco (Pezzini et al, 2020).

368 Unlike that observed in bioassays with dry tobacco, females of *T. pretiosum* were
369 responsive to green tobacco seedlings, possibly by the present substances, such as
370 terpenes and almost absence of nicotine. Plants can respond to feeding or egg deposition
371 by herbivorous by changing the volatile blend that they emit. These volatiles can attract
372 parasitoids, a phenomenon that is called indirect plant defense (Mumm and Dicke, 2010).
373 Elevated CO₂ levels can also result in higher or lower concentrations of defensive
374 secondary metabolites (Valkama et al., 2007). Furthermore, the accumulation of nicotine
375 in the tobacco plant increases at the final stage of growth, especially after the removal of
376 the stem apex (Shi et al., 2006; Wang et al., 2008). In addition, when starting to harvest
377 lower leaves, there is also an increase in the concentration of this alkaloid in the
378 intermediate and upper leaves of the plant, indicating that nicotine synthesis may be
379 affected by a response to mechanical injuries (Rodgman and Perfetti, 2013). This may
380 explain why *T. pretiosum* females were attracted to tobacco seedlings and not to dry
381 tobacco.

382 Since nicotine is toxic to most herbivores, natural enemies, especially generalists,
383 should not respond to the plant's volatiles precisely because they recognize that in this
384 plant, there may be no prey or hosts. The examples of the action of natural enemies in the
385 tobacco system are restricted to certain groups such as the Reduviidae *Cosmoclopius* spp.,
386 which feed on tobacco bugs, aphids, and fleas, with a strict population relationship with
387 plants (Jahnke et al., 2002). *Trichogramma pretiosum*, on the other hand, is a generalist
388 parasitoid of lepidopteran eggs (Pizzol et al., 2012); therefore, one should expect that it
389 does not respond as well to plants with a higher concentration of nicotine.

390 On the other hand, in addition to the volatiles of plants or substrates of the host,
391 the orientation of the parasitoids can occur towards chemical clues derived from the host's
392 eggs (Vinson, 1998). As expected, the females of *T. pretiosum* were responsive to eggs

393 of *E. kuehniella* even with the presence of different types and classes of dry or green
394 tobacco. This relationship is directly associated with organisms' endocrine, physiological,
395 and behavioral factors (Vinson, 1984). However, host eggs generally emit only small
396 amounts of volatiles and are therefore useful as short-distance clues. For this reason, egg
397 parasitoids usually first explore chemical clues from other sources to locate the host
398 (Peñaflor et al., 2011).

399 Females parasitized the host's eggs that adhered to the paper (control) and to
400 tobacco seedlings. This happens despite the presence of trichomes on leaves, which may
401 affect walking speed, propensity to fly, parasitism rate, and parasitoid survival (Olson and
402 Andow, 2006). Plant structural complexity and leaf surface features may also affect
403 parasitoid attack efficiency and host egg handling time (Reay-Jones et al., 2006), thus egg
404 parasitoids may spend more time and experience more difficulty foraging on tobacco
405 plants. The percentages of *Helicoverpa assulta* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae) eggs
406 parasitized by *Trichogramma dendrolimi* Matsumura and *Trichogramma chilonis* Ishii
407 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) on tobacco plants was 10 and 1%, respectively (Hou
408 et al., 2006).

409 On the other hand, the parasitism was significantly lower or absent in *E.*
410 *kuehniella* eggs attached to dry tobacco, regardless of bioassays with or without a choice.
411 A low level of parasitism occurred due to the mortality of parasitoids a few minutes after
412 coming into direct contact with dry tobacco, especially in types and classes with more
413 nicotine. Although *T. pretiosum* females responded positively to the host's egg volatiles,
414 even with the presence of dry tobacco, when it came into direct contact with the substrate,
415 there was no parasitism, which was possibly due to the toxic action of nicotine.

416 The increase in the parasitism index in the double-choice experiment, in relation
417 to the simple-choice, may be related to the distribution and eggs' density. In the simple-

418 choice, there was a mass of 40 eggs, while in the double-choice the eggs were distributed
419 in two masses. It is known that parasitoids respond to the different densities of their hosts,
420 as verified by Li and Henderson (1993) for *Trichogramma* sp. in which there was an
421 increase in the functional response up to 20 eggs, then stabilizing up to 30 eggs. It is also
422 known that for some parasitoids the rates of parasitism are inversely dependent on high
423 densities (Vargas and Nishida, 1982). So, it is possible that, with a larger number of eggs
424 in the same mass, the time for inspection and recognition of the eggs has increased, since
425 the time for each of these behaviors is related to the increase in the number of parasitized
426 eggs (Zuim et al., 2017).

427 The nicotine in tobacco is described as an insect repellent and is often used as an
428 insecticide (Moratore et al., 2009; Jacomini et al., 2016). This substance, as well as the
429 insecticides of the neonicotinoid group, act as competitive modulators of acetylcholine
430 nicotinic receptors and have a rapid effect, leading to hyperexcitation of the nervous
431 system, and this can be fatal for many insects (Kessler and Baldwin, 2002; Reigart and
432 Roberts 2013; Silva et al., 2017), which explains the mortality that occurred in our study.
433 From the results obtained, *T. pretiosum* should not be considered a choice as a biological
434 pest control agent in warehouses with stored tobacco, principally by the action of nicotine
435 in the mortality of parasitoids. On the other hand, in open field conditions, during plant
436 growth, its use may be feasible, since the accumulation of nicotine in the plant occurs
437 only at the end of its development. However, further field studies are needed to prove this
438 hypothesis.

439 **Acknowledgements**

440 To the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
441 for the doctor degree scholarship granted to the first author and MCTI/CT-Agro/CNPq
442 38/2013. To Japan Tobacco International (JTI) for the financial support.

443

444 **References**

445 Balestrin, A.L., Bordin, S., 2016. Uso de *Trichogramma pretiosum* no controle de
446 *Spodoptera frugiperda* em lavoura de milho. Revista Eletrônica Científica da UERGS 2,
447 259-266. <https://doi.org/10.21674/2448-0479.23.259-266>.

448 Brower, J.H., Press, J.W., 1990. Interaction of *Bracon hebetor* (Hymenoptera;
449 Braconidae) and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in
450 suppressing stored-product moth populations in small peanut storages. Journal of
451 Economic Entomology 83, 1096-1101. <https://doi.org/10.1093/jee/83.3.1096>.

452 Collins, W.K., Hawks, S.N., 2011. Fundamentos da produção do tabaco de estufa.
453 Edunisc, Santa Cruz do Sul.

454 Core Team, R., 2020. R: A language and environment for statistical computing. The R
455 Foundation for statistical computing. Vienna, Austria.

456 Edde, P.A., 2018. Principal insects affecting tobacco plants in the field. Beiträge zur
457 Tabakforschung International Contributions to Tobacco Research 28, 117-165.
458 <https://doi.org/10.2478/cttr-2018-0013>.

459 Gross Jr., H.R., Lewis, W.J., Beevers, M., Nordlund, D.A., 1984. *Trichogramma*
460 *pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Effects of augmented densities and
461 distributions of *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) host eggs and kairomones on field
462 performance. Environmental Entomology 13, 981-985.
463 <https://doi.org/10.1093/ee/13.4.981>.

- 464 Guedes, J.V.C., Costa, I.F.D.da, 2006. Guia de identificação e manejo integrado das
465 pragas e doenças do fumo. Orium, Santa Maria.
- 466 Guedes, J.V.C., Sulzbach, F., 2006. Guia de identificação e manejo integrado das pragas
467 do fumo. Orium, Santa Maria.
- 468 Hassemer, M.J., Sant'ana, J., Oliveira, M.W.M.de, Borges, M., Laumann, R.A., Caumo,
469 M., Blassioli-Moraes, M.C., 2015. Chemical composition of *Alphitobius diaperinus*
470 (Coleoptera: Tenebrionidae) abdominal glands and the influence of 1,4-benzoquinones
471 on its behaviour. *Journal of Economic Entomology* 108, 2107-2116.
472 <https://doi.org/10.1093/jee/tov147>.
- 473 Hegazi, E., Adler, C., Khafagi, W., Agamy, E., 2019. Host-preference and parasitic
474 capacity of new candidates of *Trichogramma* species (Hym.: Trichogrammatidae) against
475 some stored product moths. *Journal of Stored Products Research* 80, 71-78.
476 <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2018.11.006>.
- 477 Hildreth, S.B., Gehman, E.A., Yang, H., Lu, R.H., Ritesh, K.C., Harich, K.C., Yu, S.,
478 Lin, J., Sandoe, J.L., Okumoto, S., Murphy, A.S., Jelesko, J.G., 2011. Tobacco nicotine
479 uptake permease (NUP1) affects alkaloid metabolism. *Proceedings of the National*
480 *Academy of Sciences of the United States of America* 108, 18179-18184.
481 <https://doi.org/10.1073/pnas.1108620108>.
- 482 Hou, M., Wang, F., Wan, F., Zhang, F., 2006. Parasitism of *Helicoverpa assulta* Guenée
483 (Lepidoptera: Noctuidae) eggs by *Trichogramma* spp. (Hymenoptera:
484 Trichogrammatidae): Implications for inundative release on tobacco plants. *Applied*
485 *Entomology and Zoology* 41, 577-584. <https://doi.org/10.1303/aez.2006.577>.
- 486 IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk,
487 New York: IBM Corp.
- 488 Inoue, M.S.R., 1997. Bioecologia da traça-dos-cereais *Sitotroga cerealella* (Olivier,
489 1819) e seu controle biológico em milho armazenado com *Trichogramma*

- 490 *pretiosum* Riley, 1879 e *Bracon hebetor* Say, 1857. Masters dissertation. Escola Superior
491 de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 101 p.
- 492 Jacomini, D., Temponi, L.G., Alves, L.F.A., Silva, E.A.A.da, Jorge, T.C.M., 2016.
493 Extrato de tabaco no controle do besouro cascudinho de aviário. Pesquisa Agropecuária
494 Brasileira 51, 680-683. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500032>.
- 495 Jahnke, S.M., Redaelli, L.R., Diefenbach, L.M.G., 2002. Population dynamics of
496 *Cosmoclopius nigroannulatus* Stal (Hem; Reduviidae) in tobacco culture. Revista
497 Brasileira de Biologia 62, 819-826. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000500011>.
- 498 Kessler, A., Baldwin, I.T., 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging
499 molecular analysis. Annual Review of Plant Biology 53, 299-328.
500 <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135207>.
- 501 Kist, B.B., Carvalho, C.de, Fardin, I., Garcia, P., Beling, R.R., 2020. Anuário brasileiro
502 do tabaco 2020. Editora Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul.
- 503 Leffingwell, J.C., 2001. Chemical constituents of tobacco leaf and differences among
504 tobacco types. Science Direct Working Paper, Amsterdam.
- 505 Li, S.Y., Henderson, D.E., 1993. Response of *Trichogramma* sp. nr. *sibericum*
506 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to age and density of its natural hosts, the eggs of
507 *Rhopobota naevana* (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of the Entomological Society of
508 British Columbia 90, 18-24.
- 509 Lorini, I., Krzyzanowski, F.C., França-Neto, J.deB., Henning, A.A., Henning, F.A., 2015.
510 Manejo Integrado de Pragas de Grãos e Sementes Armazenadas. Embrapa, Brasília.
- 511 Medeiros, M.A.de, Villas Bôas, G.L., Vilela, N.J., Carrijo, A.O., 2009. Estudo preliminar
512 do controle biológico da traça-do-tomateiro com o parasitoide *Trichogramma pretiosum*
513 em ambientes protegidos. Horticultura Brasileira 27, 80-85.
514 <https://doi.org/10.1590/S0102-05362009000100016>.

- 515 Mills, N., 2010. Egg parasitoids in biological control and integrated pest management. In:
516 CÔnsoli, F.L., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A. (Eds), Egg parasitoids in agroecosystems with
517 emphasis on *Trichogramma*. Springer, New York, pp. 389-412.
- 518 Monje, J.C., Zebitz C.P., Ohnesorge B., 1999. Host and host age preference
519 of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared on
520 different hosts. *Journal of Economic Entomology* 92, 97-
521 103. <https://doi.org/10.1093/jee/92.1.97>.
- 522 Moral, R.A., Hinde, J., Demétrio, C.G.B., 2017. Half-normal plots and overdispersed
523 models in R: The hnp package. *Journal of Statistical Software* 81, 1-23.
524 <https://doi.org/10.18637/jss.v081.i10>.
- 525 Moratore, C., Devicari, M., Cunha, S.S., Barcelos, D., 2009. Utilização de *Drosophila*
526 *melanogaster* como bioindicador na avaliação da letalidade de extrato de *Nicotiana*
527 *tabacum*. *Arquivos do Instituto de Biologia* 76, 471-474.
- 528 Mumm, R., Dicke, M., 2010. Variation in natural plant products and the attraction of
529 bodyguards involved in indirect plant defense. *Canadian Journal of Zoology* 88, 628-667.
530 <https://doi.org/10.1139/Z10-032>.
- 531 Nasir, M.F., Ulrichs, Ch., Prozell, S., Schöller, M., 2017. Laboratory studies on parasitism
532 of *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) by two species of
533 *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in different grains, and
534 evaluation of traps for their monitoring. *Journal of Stored Products Research* 74, 6-12.
535 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2017.08.005>.
- 536 Nölke, G., Volke, D., Chudobová, I., Houdelet, M., Lusso, M., Frederick, J., Adams, A.,
537 Kudithipudi, C., Warek, U., Strickland, J.A., Xu, D., Schinkel, H., Schillberg, S., 2018.
538 Polyamines delay leaf maturation in low-alkaloid tobacco varieties. *Plant Direct* 2, 1-12.
539 <https://doi.org/10.1002/pld3.77>.

- 540 Norlund, D.A., Strand, M.R., Lewis, W.J., Vinson, S.B., 1987. Role of kairomones from
541 host accessory gland secretion in host recognition by *Telenomus remus* and
542 *Trichogramma pretiosum*, with partial characterization. *Entomologia Experimentalis et*
543 *Applicata* 44, 37-43. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1987.tb02237.x>.
- 544 Olson, D.M., Andow, D.A., 2006. Walking pattern of *Trichogramma nubilale* Ertle &
545 Davis (Hymenoptera; Trichogrammatidae) on various surfaces. *Biological Control* 39,
546 329-335. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.08.018>.
- 547 Parra, J.R.P., Coelho Jr., A., Geremias, L.D., Bertin, A., Ramos, C.J., 2014. Criação de
548 *Anagasta kuehniella*, em pequena escala, para produção de *Trichogramma*. *Occasio*,
549 Piracicaba.
- 550 Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., 2004. *Trichogramma* in Brazil: Feasibility of use after twenty
551 years of research. *Neotropical Entomology* 33, 271-281. [https://doi.org/10.1590/S1519-](https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000300001)
552 [566X2004000300001](https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000300001).
- 553 Peñaflor, M.F.G.V., Erb, M., Miranda, L.A., Werneburg, A.G., Bento, J.M.S., 2011.
554 Herbivore-induced plant volatiles can serve as host location cues for a generalist and a
555 specialist egg parasitoid. *Journal of Chemical Ecology* 37, 1304-1313.
556 <https://doi.org/10.1007/s10886-011-0047-9>.
- 557 Pezzini, C., Rosa, K.P., Jahnke, S.M., Köhler, A., 2020. Chemotaxis of *Habrobracon*
558 *hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) in response to larvae of *Ephestia kuehniella*
559 (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) and host food substrate with tobacco. *Journal of Stored*
560 *Products Research* 89, 101680. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101680>.
- 561 Pizzol, J., Desneux, N., Wajnberg, E., Thiéry, D., 2012. Parasitoid and host egg ages have
562 independent impact on various biological traits in a *Trichogramma* species. *Journal of*
563 *Pest Science* 85, 489-496. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0434-1>.
- 564 Pratisoli, D., Holtz, A.M., Gonçalves, J.R., Oliveira, R.C.de, Vianna, U.R., 2004.
565 Características biológicas de linhagens de *Trichogramma pretiosum*, criados em ovos de

- 566 *Sitotroga cerealella* e *Anagasta kuehniella*. Horticultura Brasileira 22, 562-
567 565. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362004000300012>.
- 568 Reay-Jones, F.P.F., Rochat, J., Goebel, R., Tabone, E., 2006. Functional response of
569 *Trichogramma chilonis* to *Galleria mellonella* and *Chilo sacchariphagus* eggs.
570 Entomologia Experimentalis et Applicata 118, 229-236. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00380.x>.
- 572 Reigart, J.R., Roberts, J.R., 2013. Biologicals and insecticides of biological origin. In:
573 Reigart, J.R., Roberts, J.R. (Eds.), Recognition and management of pesticide poisonings,
574 6th Edition. United States Environmental Protection Agency (EPA), Washington, pp 70-
575 79.
- 576 Rodgman, A., Perfetti, T.A., 2013. The chemical components of tobacco and tobacco
577 smoke. CRC Press, Boca Raton.
- 578 Romeis, J., Babendreier, D., Wäckers, F.L., Shanower, T.G., 2005. Habitat and plant
579 specificity of *Trichogramma* egg parasitoids - underlying mechanisms and implications.
580 Basic and Applied Ecology 6, 215-236. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2004.10.004>.
- 581 Saitoh, F., Nona, M., Kawashima, N., 1985. The alkaloid contents of sixty *Nicotiana*
582 species. Phytochemistry 24, 477-480. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80751-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80751-7).
- 583 Shi, Q., Li, C., Zhang, F., 2006. Nicotine synthesis in *Nicotiana tabacum* L. induced by
584 mechanical wounding is regulated by auxin. Journal of Experimental Botany 57, 2899-
585 2907. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl051>.
- 586 Silva, L.M., Caldas, A.P., Rodrigues, A.L.M., Oliveira, J.S., Simonetti, E.R.deS., 2017.
587 O uso do extrato de fumo (*Nicotina tabacum*) como alternativa para o controle de pragas
588 em hortaliças. Proceedings of the II Congresso Internacional das Ciências Agrárias -
589 COINTER - PDVAgro, 4-8 December 2017, Instituto Federal do Rio Grande do Norte
590 (IFRN), Campus Natal, pp. 1-9.

- 591 Slone, J.D., Burrack, H.J., 2016. Integrated Pest management practices reduce insecticide
592 applications, preserve beneficial insects, and decrease pesticide residues in flue-cured
593 tobacco production. *Journal of Economic Entomology* 109, 2397-2404.
594 <https://doi.org/10.1093/jee/tow191>.
- 595 Ujváry, I., 1999. Nicotine and other insecticidal alkaloids. In: Yamamoto, I., Casida, J.E.
596 (Eds), *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor*. Springer, Tokyo,
597 pp. 29-69.
- 598 Valkama, E., Koricheva, J., Oksanen, E., 2007. Effects of elevated O₃, alone and in
599 combination with elevated CO₂, on tree leaf chemistry and insect herbivore performance:
600 a meta- analysis. *Global Change Biology* 13, 184-201. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01284.x)
601 [2486.2006.01284.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01284.x).
- 602 Vargas, C.C., Redaelli, L.R., Sant'Ana, J., Morais, R.M., Padilha, P., 2017. Influência da
603 idade do hospedeiro e da aprendizagem no comportamento quimiotáxico e no parasitismo
604 de *Trichogramma pretiosum*. *Iheringia Série Zoologia*, 107, 1-7.
605 <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2017015>.
- 606 Vargas, R.I., Nishida, T., 1982. Parasitization by *Trichogramma chilonis* Ishii of corn
607 earworm eggs on sweet corn in Hawaii. *Proceedings Hawaiian Entomological Society*
608 24, 123-126.
- 609 Vet, L.E.M., Groenewold, A.W., 1990. Semiochemicals and learning in parasitoids.
610 *Journal of Chemical Ecology* 16, 3119-3135. <https://doi.org/10.1007/BF00979615>.
- 611 Vianna, U.R., Pratisoli, D., Zanuncio, J.C., Alencar, J.R.C.C.de, Zinger, F.D., 2011.
612 Espécies e/ou linhagens de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para
613 o controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Arquivos do Instituto*
614 *Biológico* 78, 81-87. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v78p0812011>.
- 615 Vinson, S.B., 1984. Parasitoid - Host Relationship. In: Bell, W.J., Cardé, R.T. (Eds.),
616 *Chemical Ecology of Insects*. Chapman and Hall, London, pp. 205-233.

- 617 Vinson, S.B., 1998. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and
618 a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species.
619 *Biological Control* 11, 79-96. <https://doi.org/10.1006/bcon.1997.0601>.
- 620 Wajnberg, E., Colazza, S., 2012. *Chemical ecology of insect parasitoids*. Wiley-
621 Blackwell, Chichester.
- 622 Wang, S.S., Shi, Q.M., Li, W.Q., Niu, J.F., Li, C.J., Zhang, F.S., 2008. Nicotine
623 concentration in leaves of flue-cured tobacco plants as affected by removal of the shoot
624 apex and lateral buds. *Journal of Integrative Plant Biology* 50, 958-964.
625 <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00684.x>.
- 626 Wang, Z.Y., He, K.L., Zhang, F., Lu, X., Babendreier, D., 2014. Mass rearing and release
627 of *Trichogramma* for biological control of insect pests of corn in China. *Biological*
628 *Control* 68, 136-144. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.06.015>.
- 629 Xavier, L.M.S., Laumann, R.A., Borges, M., Magalhães, D.M., Vilela, E.F., Blassioli-
630 Moraes, M.C., 2011. *Trichogramma pretiosum* attraction due to the *Elasmopalpus*
631 *lignosellus* damage in maize. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46, 578-585.
632 <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000600002>.
- 633 Zuim, V., Rodrigues, H.S., Pratisoli, D., Torres, J.B., Fragoso, D.F.M., Bueno, R.C.O.F.,
634 2017. Age and density of eggs of *Helicoverpa armigera* influence on *Trichogramma*
635 *pretiosum* parasitism. *Acta Scientiarum* 39, 513-520.
636 <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v39i4.34943>.

6 ARTIGO 4

Efeito da liberação de *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) na infestação de *Ephestia* spp. Guenée (Lepidoptera: Pyralidae) em ambientes de armazenamento de tabaco *

*Artigo configurado segundo as normas da revista Crop Protection

1 **Efeito da liberação de *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) na**
2 **infestação de *Ephestia* spp. Guenée (Lepidoptera: Pyralidae) em ambientes de**
3 **armazenamento de tabaco**

4

5 Cleder Pezzini^{1,2,*}, Kássia Cristina Freire Zilch^{1,2}, Simone Mundstock Jahnke¹, Andreas
6 Köhler²

7

8 ¹Laboratory of Biological Control of Insects, Faculty of Agronomy, Federal University
9 of Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, Rio
10 Grande do Sul, Brazil.

11 ²Laboratory of Entomology, Department of Life Sciences, University of Santa Cruz do
12 Sul (UNISC), Avenida Independência, 2293, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul,
13 Brazil.

14

15 *Corresponding author

16

17 E-mail addresses: cleder.pezzini@gmail.com (C. Pezzini), kassiazilch@gmail.com
18 (K.C.F. Zilch), mundstock.jahnke@ufrgs.br (S.M. Jahnke), andreas@unisc.br (A.
19 Köhler).

20 **Resumo**

21 Durante o período de armazenagem do tabaco seco e seus derivados, existem
22 insetos praga que causam danos ao produto, como espécies de *Ephestia* Guenée
23 (Lepidoptera: Pyralidae), conhecidas popularmente como traças e que tem sido
24 controlada principalmente com práticas físicas e produtos químicos sintéticos, entretanto
25 com limitações no uso e resultados. Alguns agentes de controle biológico, como o
26 parasitoide *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae), apresentam
27 potencial para controle destas pragas. Este estudo objetivou avaliar o efeito da liberação
28 de *H. hebetor* infestação de *Ephestia* spp. em ambientes de armazenamento de tabaco.
29 Foram realizadas liberações de parasitoides em paióis/galpões em produtores de tabaco e
30 armazéns na indústria (CL), entre 2016-2018, compreendendo dois anos/safras. Cada
31 liberação foi constituída de aproximadamente 1.000 parasitoides em galpões de
32 produtores (70 m²) e 30.000 nos armazéns da indústria (8.000 m²). Foram utilizadas
33 armadilhas adesivas com feromônio sexual para monitorar semanalmente o número
34 médio de adultos de *Ephestia* spp. nos ambientes com e sem liberação do parasitoide
35 (SL). O número médio de adultos de *Ephestia* spp. capturados nas armadilhas nos
36 ambientes CL em nível de produtor e indústria, foram significativamente menores do que
37 naqueles SL a partir da terceira e quinta semanas. Nas semanas seguintes, as médias de
38 *Ephestia* spp. foram sempre significativamente menores nos locais CL até o final do
39 monitoramento. Portanto, o uso de *H. hebetor* para controle de traças deve ser considerada
40 como parte de um programa de manejo integrado de pragas em ambientes com tabaco
41 estocado.

42

43 PALAVRAS-CHAVE: Manejo integrado de pragas; pós-colheita; parasitoide, traça-do-
44 tabaco

45 1. Introdução

46 O Brasil é o maior exportador de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) em folha na
47 atualidade e o segundo maior país produtor, atrás apenas da China (Kist et al., 2019; Kist
48 et al., 2020). A cultura apresenta grande importância econômica, devido ao elevado valor
49 comercial e à capacidade de empregar um grande número de pessoas, tanto no cultivo,
50 como na industrialização (Kist et al., 2014; Mendes et al., 2015). No Brasil, é plantado
51 principalmente na Região Sul e o estado do Rio Grande do Sul possui as maiores áreas
52 de cultivo com 127 mil hectares (Kist et al., 2020).

53 Desde a produção das mudas até a pós-colheita do tabaco, há um conjunto de
54 patógenos e insetos que atacam a cultura, causando perdas na produção, no rendimento e
55 na qualidade (Edde, 2018). Durante o período de armazenamento do tabaco existem dois
56 grupos de insetos que causam danos expressivos, o besouro-do-fumo *Lasioderma*
57 *serricornis* Fabricius (Coleoptera: Ptinidae) e as traças *Ephestia elutella* (Hübner) (traça-
58 do-tabaco), *Ephestia kuehniella* (Zeller) (traça-das-farinhas), *Ephestia cautella* (Walker)
59 (traça-do-cacau) e *Plodia interpunctella* (Hübner) (traça-indiana-da-farinha)
60 (Lepidoptera: Pyralidae) (Krsteska and Stojanoski, 2013; Krsteska, 2014). As espécies de
61 traças ocorrem em conjunto, porém, em diferentes proporções, conforme a região e sua
62 identificação é complexa, pois são espécies crípticas (Slone and Burrack, 2016).

63 Apesar dos danos causados por insetos durante o armazenamento serem elevados,
64 é difícil quantificá-los, sendo que na cultura do tabaco, estima-se que aproximadamente
65 3% da produção é perdida devido à presença destes na armazenagem (Li and Yu, 1993;
66 Carvalho et al., 2003). Os métodos atualmente utilizados no controle desses insetos praga
67 são restritos, baseando-se, de forma geral, na utilização de inseticidas químicos, que são
68 altamente tóxicos ao ser humano e ao meio ambiente (Daglish et al., 2018; Sabbour,
69 2020). No Brasil, somente a fosfina (fosfeto de alumínio ou magnésio) está autorizada

70 para ser utilizada como produto fitossanitário no controle destas pragas em armazéns com
71 tabaco estocado (AGROFIT, 2021).

72 Com isso, eleva-se a necessidade de desenvolver novas tecnologias para serem
73 adotadas como estratégias de manejo. O controle biológico aumentativo é um exemplo,
74 no qual utilizam-se inimigos naturais como parasitoides para diminuir populações de
75 organismos que são considerados pragas em sistemas agrícolas (Schöller et al., 2018). Os
76 inimigos naturais de produtos armazenados podem oferecer vantagens em relação aos
77 tratamentos químicos tradicionais. Os parasitoides, por exemplo, continuam se
78 reproduzindo enquanto seus hospedeiros estão disponíveis e podem ser liberados em
79 pontos específicos e se espalhar ativamente para encontrar o alvo em locais escondidos
80 (Soares et al., 2009). Isso porque, muitas vezes, as traças podem se desenvolver na poeira
81 acumulada nos cantos e fendas de instalações de armazenamento ou processamento de
82 alimentos de difícil acesso para limpeza (Castañé et al., 2018).

83 Dentre as espécies que têm potencial como agentes de biocontrole destaca-se o
84 ectoparasitoide larval *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) (Mbata
85 and Warsi, 2019). Esta espécie tem se mostrado promissora em experimentos de
86 laboratório no controle de várias traças praga presentes em diferentes ambientes com
87 produtos armazenados (Ghimire and Phillips, 2014; Farag et al., 2015; Ou et al., 2020).

88 A eficiência no controle desta espécie já foi avaliada sobre várias traças em
89 diferentes produtos e ambientes de armazenamento, de forma isolada ou em combinação
90 com outros parasitoides, considerando o parasitismo, insetos praga adultos capturados em
91 armadilhas, forma de liberação e capacidade de busca (Belda and Riudavets, 2013;
92 Castañé et al., 2018). Existem estudos da utilização da espécie em trigo a granel (Press et
93 al., 1982; Adarkwah and Schöller, 2012), amendoim a granel (Brower and Press, 1990),

94 fubá e arroz embalados (Cline et al., 1984; Adarkwah et al., 2014), padarias e moinhos
95 (Prozel and Schöller 2003) e fábricas de chocolate (Trematerra et al., 2016).

96 No tabaco armazenado há o registro do parasitoide *H. hebetor*, parasitando larvas
97 de *Ephestia* spp. (Parra, 2014). Em laboratório, sabe-se que, *H hebetor* parasita larvas de
98 quinto ínstar de *E. kuehniella* alimentadas em dieta com tabaco (Pezzini et al., 2020a) e
99 que é traído pelos odores de diferentes tipos de tabaco (Pezzini et al., 2020b). No entanto,
100 existe uma carência de informações sobre a capacidade de controle das pragas alvo nos
101 ambientes em que o tabaco fica armazenado. Assim este estudo objetivou avaliar o efeito
102 da liberação de *H. hebetor* na infestação de *Ephestia* spp. Guenée (Lepidoptera:
103 Pyralidae) em ambientes de armazenamento de tabaco em nível de produtor e indústria.

104

105 **2. Material e métodos**

106 *2.1 Multiplicação do parasitoide*

107 A multiplicação de *H. hebetor* foi feita em recipientes plásticos, contendo larvas
108 de último ínstar de *E. kuehniella* em meio à dieta de criação do hospedeiro (97% farinha
109 de trigo e 3% levedo de cerveja). Utilizou-se recipientes de tamanhos diferente para as
110 liberações: 10 cm de altura x 10 cm de diâmetro para liberações nas propriedades
111 produtoras de tabaco (com aproximadamente 500 parasitoides); 12 cm de altura x 16 cm
112 de largura e comprimento (com aproximadamente 2.000 parasitoides) para liberações nos
113 armazéns da indústria de tabaco. Isto porque o número de parasitoides liberado nos
114 ambientes foi diferente, conforme o volume de tabaco estocado. A razão sexual era 0,7.
115 A partir do início da emergência dos parasitoides, estes foram transportados até os locais
116 de liberação.

117 2.2 Liberação em paióis/galpões de produtores

118 Foram selecionados 22 produtores de tabaco tipo Virgínia com histórico de
119 problema com infestações de *Ephestia* spp., associados à empresa JTI (Japan Tobacco
120 International) em locais de grande produção de tabaco, nos municípios de Arroio do
121 Tigre, Novo Cabrais, Paraíso do Sul e Sobradinho, em um raio de 25 km, na região central
122 do Rio Grande do Sul. O tamanho médio dos paióis/galpões foi de 70 m² com capacidade
123 média de 5,3 toneladas de tabaco estocados ao final da safra. Os paióis/galpões são, de
124 modo geral, estruturas de madeira, sem fechamento hermético, no qual transitam os
125 produtores para armazenar e selecionar o tabaco após a cura, permanecendo em
126 temperatura ambiente e sem controle de umidade. Não foram utilizados os mesmos
127 paióis/galpões nas distintas safras.

128 Em cada paiol/galpão foram realizadas quatro liberações de *H. hebetor* ao longo
129 da safra, sendo a primeira no momento em que os primeiros fardos (aproximadamente
130 700 kg de tabaco seco) foram armazenados no local. As demais foram feitas com intervalo
131 de duas a três semanas entre elas. Cada liberação foi constituída de dois recipientes com
132 parasitoides. Dentro do paiol/galpão os recipientes com parasitoides foram abertos e
133 dispostos sobre as pilhas de tabaco, a uma altura média de 1,8 metros, em dois pontos
134 distintos. Os recipientes permaneceram no local até a próxima liberação, quando eram
135 recolhidos.

136 O monitoramento de *Ephestia* spp. dentro dos paióis/galpões foi feito com o uso
137 de armadilhas adesivas com pastilha de feromônio sexual Gachon® (Acetato de (Z,E)-
138 9,12-tetradecadienil). Este iniciou uma semana antes da primeira liberação de *H. hebetor*,
139 para verificar a infestação inicial de adultos de *Ephestia* spp. seguindo até quando o
140 produtor iniciou a comercialização do tabaco com as empresas do setor fumageiro.

141 Conforme o fabricante, para o monitoramento é recomendado uma armadilha para
142 cada 300 m² (AGROFIT, 2021). Portanto, em cada paiol/galpão foi utilizada uma
143 armadilha semanalmente, que era sempre instalada na segunda-feira e permanecia
144 exposta por 48 horas, sendo retirada na quarta-feira da mesma semana. A armadilha foi
145 instalada em uma parede a uma altura de dois metros, sendo que os próprios produtores
146 foram orientados a fazer a troca semanal, sendo preservada em embalagem fechada. Na
147 safra 2016/2017 o monitoramento foi de 12/12/2016 à 22/03/2017 e, na safra 2017/2018
148 entre 11/12/2017 e 21/03/2018, totalizando 15 semanas por safra.

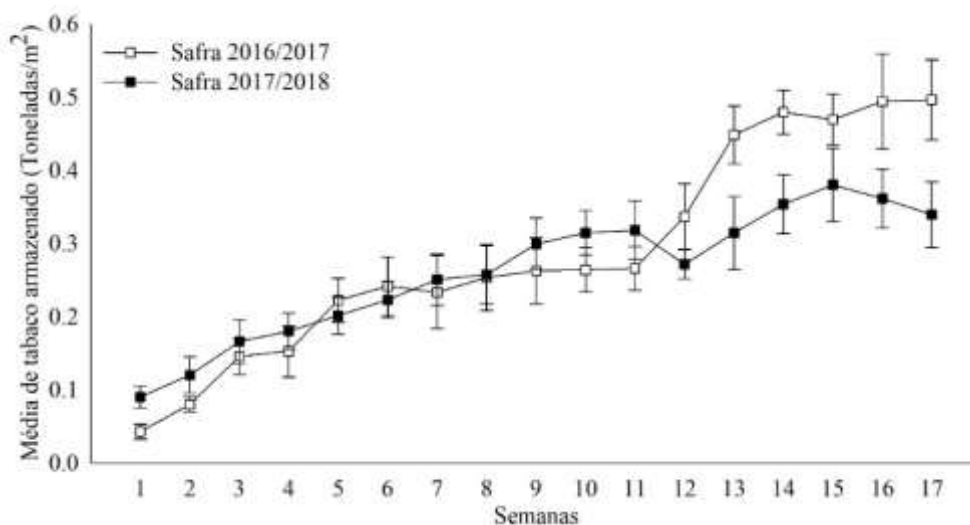
149 O delineamento experimental foi constituído por 16 paióis/galpões (produtores),
150 selecionados aleatoriamente para a liberação de *H. hebetor* (CL) e seis paióis/galpões nos
151 quais não foram liberados parasitoides, constituindo-se o controle (SL). Cada paiol foi
152 considerado uma réplica semanalmente.

153

154 *2.3 Liberação em armazéns na indústria*

155 A empresa JTI disponibilizou dois depósitos de tabaco cru tipo Virgínia (produto
156 não processado) localizados no município de Santa Cruz do Sul para fazer o experimento.
157 Cada ambiente possuía área de aproximadamente 8.000 m² e capacidade de armazenar
158 5,5 mil toneladas de tabaco. O volume de tabaco que havia estocado dentro dos armazéns
159 durante as safras aumentou conforme realizada a compra dos produtos (Fig. 1).

160 A metodologia de liberação e monitoramento aplicado foi similar à utilizada nos
161 produtores de tabaco. Foram realizadas cinco liberações ao longo de cada safra, sendo a
162 primeira quando a empresa iniciou a compra do tabaco dos produtores e as demais, com
163 intervalo de duas a três semanas entre elas. Cada liberação foi constituída de 15
164 recipientes com parasitoides.



165

166 **Fig. 1.** Quantidade média (\pm erro padrão) de tabaco armazenado por metro quadrado
 167 dentro dos dois armazéns ao longo das semanas durante as safras 2016-2017 e 2017-2018.
 168

169 Devido à circulação de empilhadeiras dentro do armazém, os recipientes com os
 170 parasitoides adultos foram abertos e dispostos no chão, em linha, próximos a uma parede
 171 lateral, com distância de oito metros entre cada recipiente, permanecendo no local até a
 172 data da próxima liberação, quando eram recolhidos.

173 O monitoramento de adultos de *Ephestia* spp. foi feito semanalmente com 10
 174 armadilhas, descritas no tópico anterior (2.2), em cada depósito, a uma altura de dois
 175 metros. No armazém onde ocorreram as liberações, as armadilhas foram dispostas na
 176 mesma parede onde foi realiza a liberação, com distância de dez metros entre cada
 177 armadilha. As armadilhas ficavam expostas semanalmente por 48 horas. O
 178 monitoramento das traças iniciou uma semana antes da primeira liberação de *H. hebetor*
 179 para verificar a infestação inicial e seguiu até o momento que iniciou o processamento e
 180 beneficiamento do tabaco. Na safra 2016/2017 o monitoramento foi entre 13/03/2017 e
 181 05/07/2017 e na safra seguinte, 2017/2018 entre 19/03/2018 e 11/07/2018, completando
 182 17 semanas por safra.

183 O delineamento experimental contou com um armazém no qual foram feitas as
184 liberações dos parasitoide (CL) e outro, como controle, sem liberações (SL). Cada
185 armadilha foi considerada uma pseudoréplica com 10 repetições semanais.

186

187 2.4 Análise dos dados

188 Os dados médios obtidos foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de
189 Shapiro-Wilk, à homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos
190 por análise gráfica. As médias de captura de adultos de *Ephestia* spp. nos ambientes com
191 e sem liberação de *H. hebetor* por armadilha, foram comparados pelo teste *t*. Para
192 relacionar o volume de tabaco armazenado na indústria com número médio de insetos
193 capturados ao longo das semanas, foi utilizado o teste de correlação de Pearson seguindo
194 de uma regressão de potência. A análise foi efetuada utilizando-se o programa Bioestat
195 5.0[®] (Ayres et al., 2007), ao nível de significância de 5%.

196

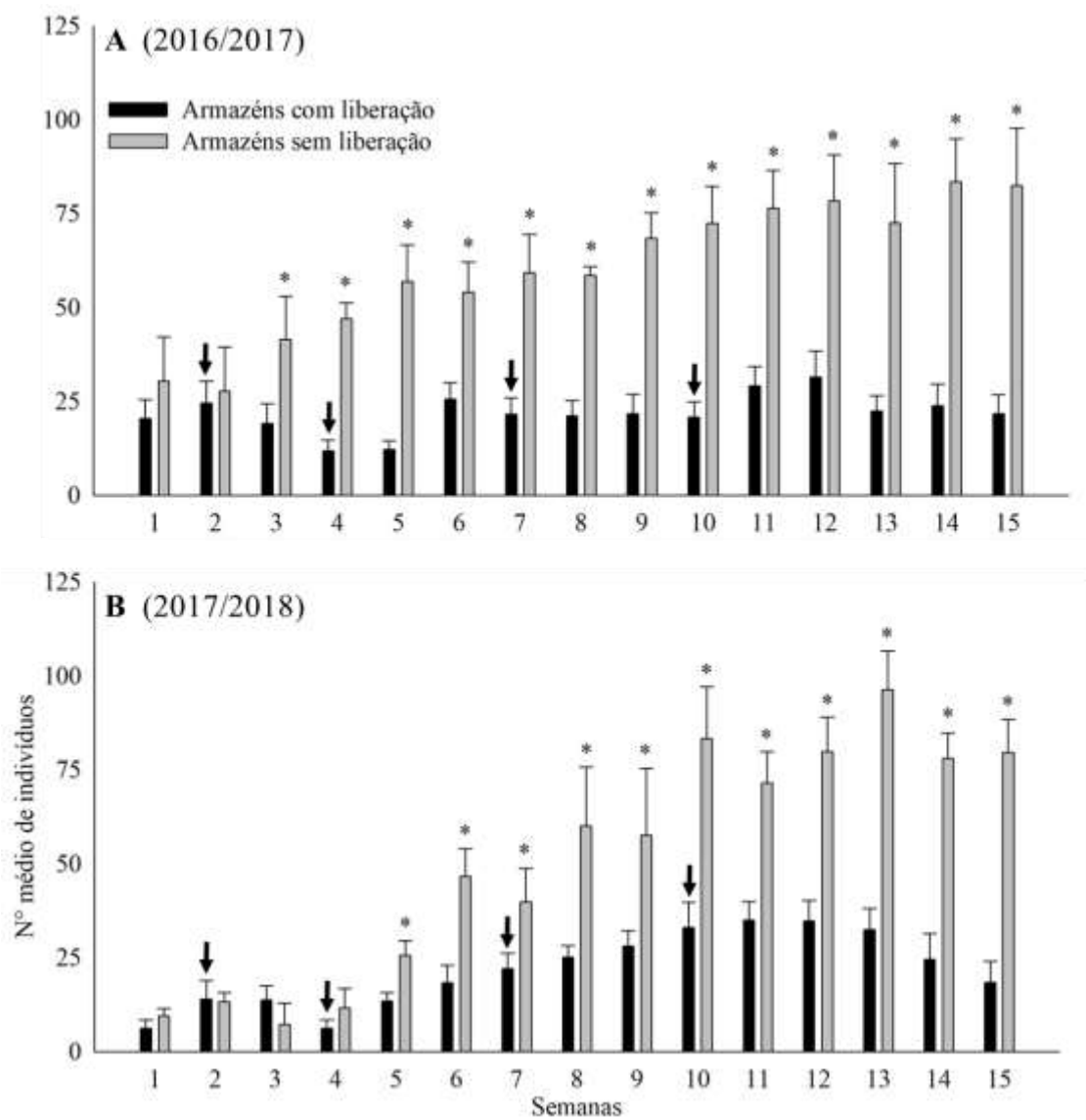
197 3. Resultados

198 O número médio de adultos de *Ephestia* spp. capturados nas armadilhas nos
199 paióis/galpões com liberação de *H. hebetor* em nível de produtor, foi significativamente
200 menor do que os dos locais sem liberação, a partir da terceira semana, na primeira safra.
201 Na segunda safra, essa diferença ocorreu a partir da quinta semana (Fig. 2AB). Nas
202 semanas subsequentes, em ambas as safras, as médias de *Ephestia* spp. foram sempre
203 significativamente maiores nos paióis/galpões sem liberação do parasitoide, sendo que os
204 valores continuaram aumentando até o final do monitoramento (Fig. 2AB).

205 No monitoramento nos armazéns na indústria, o número médio de capturas de
206 *Ephestia* spp. foi significativamente menor a partir da terceira semana, no ambiente com
207 liberação de *H. hebetor*, na safra 2016/2017 (Fig. 3A). No armazém testemunha, sem a

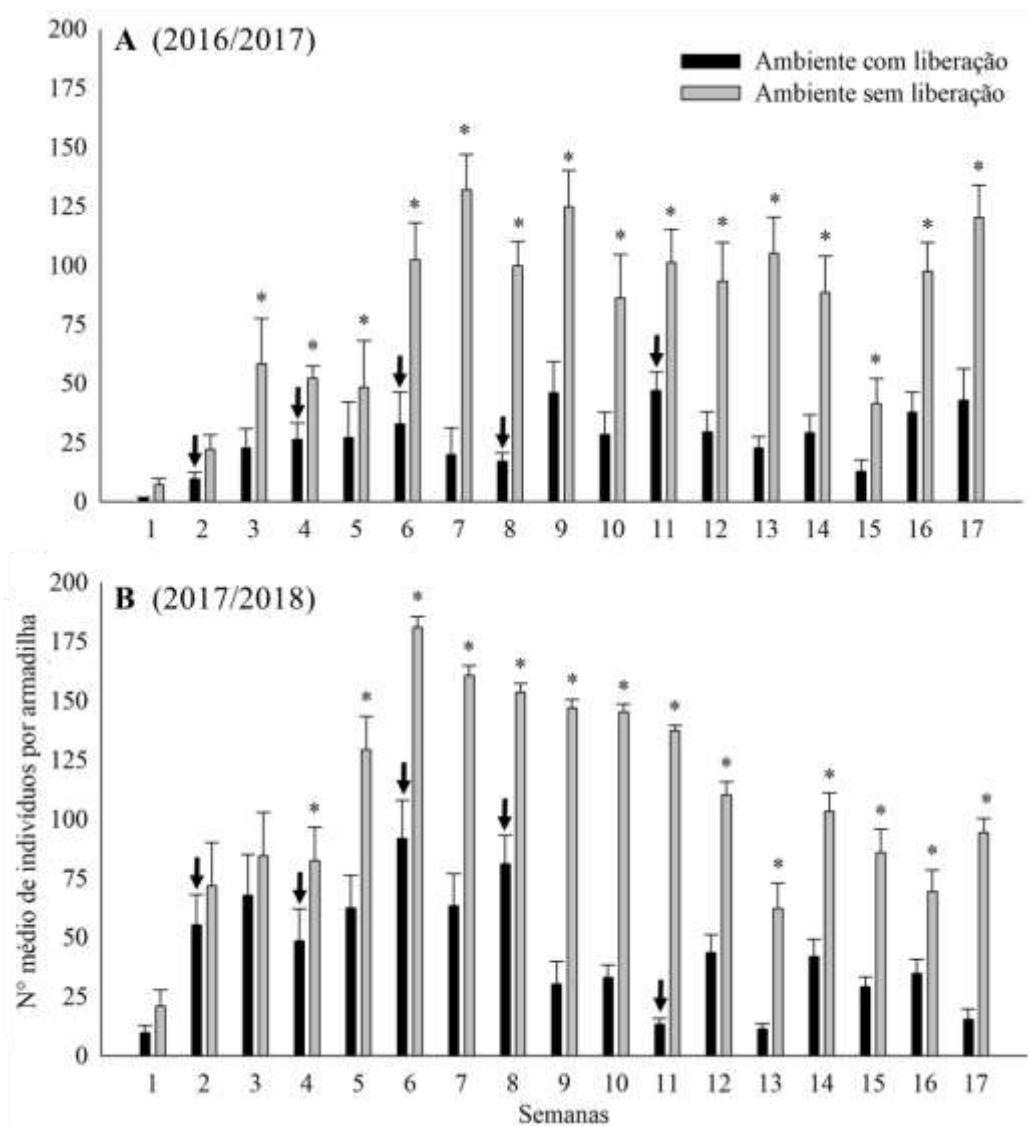
208 liberação de parasitoides, a população da traça continuou crescendo e apresentou um pico
209 na sétima semana (Fig. 3A). Na safra 2017/2018, a diferença significativa na média
210 capturas de *Ephestia* spp. ocorreu a partir da quarta semana de amostragem (Fig. 3B). O
211 pico de insetos capturados por armadilha no armazém testemunha foi na sexta semana
212 (Fig. 3B).

213 Na safra 2016/2017, houve uma correlação positiva entre o volume de tabaco
214 armazenado na indústria e o número médio de adultos de *Ephestia* spp. capturados por
215 armadilha a cada semana no ambiente sem liberação de *H. hebetor* (Fig. 4), sendo que
216 60% dessa variação pode ser explicada pela relação entre o volume de tabaco e o número
217 de insetos capturados. Por outro lado, no ambiente com liberação dos parasitoides não
218 houve correlação entre esses parâmetros ($p>0,05$). Na safra 2017/2018, entretanto, tanto
219 no armazém com liberação, como no sem, não houve correlação entre volume de tabaco
220 estocado e o número médio de insetos capturados por armadilha ($p>0,05$).



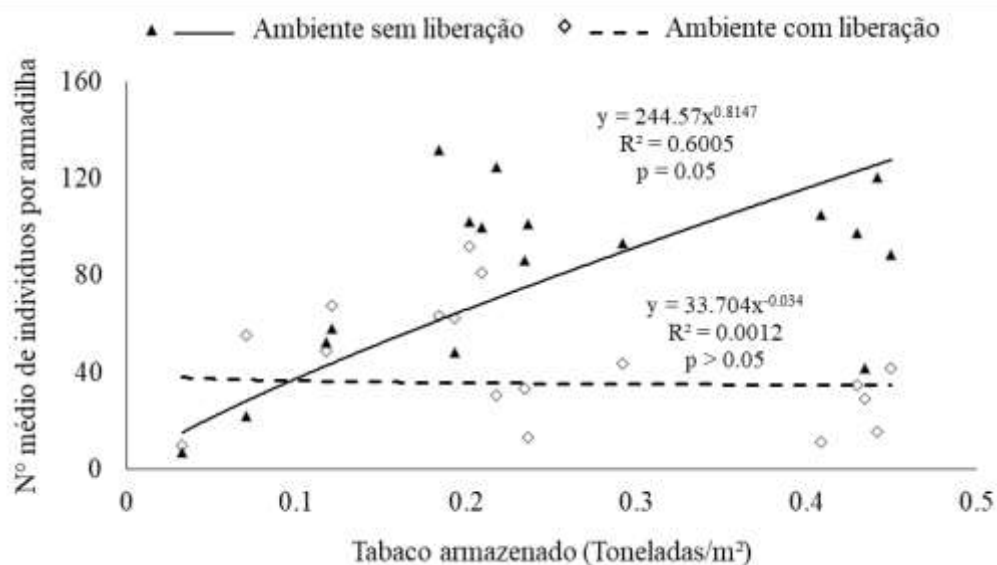
221

222 **Fig. 2.** Número médio (\pm erro padrão) de adultos de *Ephestia* spp. por armadilha
 223 capturados em paióis/galpões de produtores de tabaco, com (16 paióis) e sem liberação
 224 (6 paióis) de *Habrobracon hebetor* a cada semana (setas indicam quando ocorreu cada
 225 liberação = 1.000 parasitoides) nas três safras (A - 2016/2017 e B - 2017/2018). Barras
 226 com asterisco diferem significativamente entre os tratamentos pelo teste *t* ($p \leq 0,05$).



227

228 **Fig. 3.** Número médio (\pm erro padrão) de adultos de *Ephestia* spp. por armadilha
 229 capturados em dois armazéns na indústria, com e sem liberação de *Habrobracon hebetor*
 230 a cada semana (setas indicam quando ocorreu cada liberação = 30.000 parasitoides) nas
 231 duas safras (A - 2016/2017 e B - 2017/2018). Barras com asterisco diferem
 232 significativamente entre os tratamentos pelo teste *t* ($p \leq 0,05$).



233

234 **Fig. 4.** Correlação entre o volume de tabaco armazenado e número médio de adultos de
 235 *Ephestia* spp. capturados por armadilha a cada semana nos armazéns com e sem liberação
 236 de *Habrobracon hebetor* na indústria durante a safra 2016/2017.
 237

238 4. Discussão

239 O aumento no número de indivíduos capturados nas armadilhas nos paióis/galpões
 240 dos produtores ao longo das semanas ocorreu pois, o volume de tabaco dentro dos
 241 ambientes de armazenagem foi aumentando gradativamente ao longo da safra, conforme
 242 era feita a colheita e cura do tabaco. Esse aumento da densidade das pragas é esperado
 243 em ambientes de armazenamento, já que o volume de produto, crescendo, disponibiliza
 244 maiores recursos alimentares aos insetos (Jian and Jayas, 2012). Além disso, com a maior
 245 quantidade de produto disponível, há um aumento de pistas químicas que atraem mais
 246 insetos, somada à reprodução que ocorre no próprio local (Anukiruthika et al., 2021).
 247 Apesar disso, o aumento do número de indivíduos de *Ephestia* spp. capturados nas
 248 armadilhas de feromônio foi significativamente menor nos ambientes com a liberação de
 249 *H. hebetor*, mostrando que o parasitoide pode frear o crescimento das populações destas
 250 traças, mesmo em nível de produtor.

251 Nos armazéns da indústria, durante a primeira safra, observou-se uma correlação
252 positiva entre o volume de tabaco estocado e insetos capturados por armadilha no local
253 sem liberação. Por outro lado, no ambiente com liberação de *H. hebetor* não houve essa
254 correlação, possivelmente porque a população de *Ephestia* spp. estava sendo controlada
255 pelo parasitoide e não permitiu que houvesse um aumento na incidência de insetos. Na
256 safra seguinte, não foi observada uma correlação entre o volume e *Ephestia* spp.
257 capturados no local sem liberação, o que pode ter ocorrido pelo fato de que, dentro da
258 indústria, havia um fluxo contínuo de entrada e saída de tabaco nos armazéns, conforme
259 era feita a compra e beneficiando do produto, não sendo um estoque estático. Além disso,
260 o volume de tabaco armazenado no final da safra era menor em comparação ao primeiro
261 ano.

262 Durante o período de armazenamento, vários são os fatores que podem influenciar
263 na flutuação populacional de insetos, como é o caso da tolerância condições ambientais
264 de temperatura, umidade e luz, quantidade e qualidade da fonte alimentar, entre outros
265 (Nascimento, 2011; Jian and Jayas, 2012). Entretanto, estes aspectos não foram avaliados
266 no presente estudo. Além disso, a procedência do tabaco que chega à indústria não tem a
267 mesma regularidade de uma safra para outra, podendo vir de distintos produtores ou
268 regiões, com qualidade superior ou inferior, o que interfere na infestação dos insetos no
269 armazém.

270 Possivelmente o tabaco que entrava na empresa já vinha infestado do produtor,
271 com *Ephestia* spp., visto que Collins and Hawks (2011) e Deng et al. (2018) registram a
272 ocorrência das traças em propriedades rurais. Como *H. hebetor* parasita a fase larval das
273 traças (Mbata and Warsi, 2019), mesmo depois dos parasitoides liberados no armazém da
274 indústria, aquelas traças que vinham do produtor e já estavam na fase de pupa, emergiam
275 e eram capturadas nas armadilhas. Por esta razão registrou-se esta oscilação de indivíduos

276 conforme a quantidade de estoque de tabaco. Desse modo podemos inferir que *H. hebetor*
277 não resguarda a infestação já presente nos produtos armazenados, no entanto, irá prevenir
278 o aumento destas, reduzindo a próxima geração de traças (Grieshop et al., 2006). Portanto,
279 para que a supressão adequada de *Ephestia* spp. ocorra, as liberações devem ser feitas o
280 mais cedo possível, para que os parasitoides tenham chance de controlar as populações
281 da traça antes que atinjam o nível de ação.

282 De forma semelhante à registrada nos paióis/galpões de produtores, apesar da
283 flutuação, o número de indivíduos capturados foi significativamente menor no ambiente
284 com liberação do parasitoide, a partir da terceira e quarta semanas, indicando que a
285 espécie consegue realizar o controle da população da praga nestes ambientes. A
286 efetividade de *H. hebetor* tem sido registrada na Europa, especialmente em combinação
287 com *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para
288 controlar *E. kuehniella* e *P. interpunctella* na Alemanha (Prozel and Schöller 2003) e
289 Itália (Trematerra et al. 2016).

290 De fato, o potencial de *H. hebetor* para controlar traças já havia sido registrada,
291 como no trabalho de Trematerra et al. (2016), para o controle de *P. interpunctella* em
292 liberações dentro de uma fábrica de chocolate durante quatro anos. Os autores observaram
293 que a ação de *H. hebetor* reduziu o número de adultos de *P. interpunctella* capturado nas
294 armadilhas de feromônio dentro da fábrica. Adarkwah and Schöller, 2012, avaliaram a
295 capacidade de parasitismo de *H. hebetor* em larvas de *P. interpunctella* em trigo
296 armazenado a granel e verificaram parasitismo entre 50 e 80% das larvas de acordo com
297 a densidade de parasitoides liberados. A supressão da população de *P. interpunctella* e *E.*
298 *cautella* por *H. hebetor* também foi registrada em armazéns de amendoim, sendo de 60 e
299 90%, respectivamente.

300 No Brasil, o uso de parasitoides em instalações de armazenamento ou
301 processamento é ainda incipiente. Existe o registro da utilização de *H. hebetor* para
302 controlar *E. elutella* em cerca de 1.500 galpões/armazéns de tabaco no Brasil (Parra
303 2014). No entanto, o autor apenas relata a utilização, sem informar dados referentes a
304 número, época, intervalo de liberação, dose ou eficiência de controle. Nosso estudo
305 detalha estas informações com o registro da aplicação prática do uso de *H. hebetor* em
306 liberações inundativas no armazenamento do tabaco, demonstrando o potencial da espécie
307 para o controle das traças.

308 A utilização de parasitoides em ambientes de pós-colheita apresenta uma série de
309 desafios, sendo que no armazenamento do tabaco, existe mais um obstáculo. A nicotina
310 presente no tabaco é descrita como repelente para insetos e usada, muitas vezes, como
311 inseticida (Moratore et al., 2009; Jacomini et al., 2016; Ou et al., 2019). Essa substância,
312 assim como os inseticidas do grupo dos neonicotinóides, atuam como moduladores
313 competitivos de receptores nicotínicos da acetilcolina e tem efeito rápido levando à
314 hiperexcitação do sistema nervoso, podendo ser fatal para muitos insetos (Kessler and
315 Baldwin, 2002; Reigart and Roberts 2013). Apesar disso, neste trabalho observamos que
316 *H. hebetor* consegue se estabelecer em locais de armazenamento de tabaco e atuar no
317 controle das pragas associadas, sem que seja repelido, indicando uma adaptação ao
318 ambiente que, para outros organismos, mostra-se tóxico. Esta adaptação já foi
319 comprovada em estudo que mostrou que *H. hebetor* apresentou uma resposta
320 quimiotática positiva, respondendo a odores de diferentes tipos de tabaco, especialmente
321 ao Virgínia (Pezzini, et al, 2020b). Também, *H. hebetor* é capaz de se reproduzir e se
322 desenvolver no hospedeiro criado em dieta contendo tabaco (Pezzini et al., 2020a), assim,
323 embora a prole oriunda daquelas fêmeas liberadas não tenha sido estudada no presente

324 estudo, é possível que haja emergência da prole e a segunda geração possa reforçar o
325 controle das populações alvos nos galpões.

326 Embora *H. hebetor* seja comercializado em alguns países, apenas poucas empresas
327 vendem esta espécie de parasitoide, existindo exemplos de sucesso somente em pequena
328 escala (Castañé et al., 2018). Apesar do grande potencial da espécie demonstrada em
329 nosso estudo, um dos entraves para o uso de parasitoides em ambientes de
330 armazenamento é que os inimigos naturais podem ser considerados como um tipo de
331 contaminante presente no local (Cox and Wilkin, 1996). Porém, em alguns países já existe
332 uma legislação específica sobre isso, como nos Estados Unidos, que permitiu a liberação
333 aumentativa de insetos benéficos em produtos armazenados, sendo que todos os gêneros
334 de parasitoides e predadores comumente conhecidos por controlar insetos praga de
335 produtos armazenados foram isentos pela Environmental Protection Agency (EPA) de
336 um requisito de tolerância em grãos inteiros armazenados e alimentos embalados em
337 armazéns, desde que os insetos não se tornem um componente do alimento (Flinn and
338 Hagstrum, 2001). Além disso, conforme os mesmos autores, foi demonstrado que os
339 fragmentos de insetos praga foram reduzidos em grãos tratados com parasitoides. Durante
340 o processamento do tabaco, especificamente, o produto passa por várias peneiras e fluxos
341 de ar que retiram pequenas partículas estranhas que possam estar presentes (Graudejus and
342 Briem, 1994), esta técnica pode também retirar insetos mortos ou fragmentos do produto
343 que está sendo processado.

344 Embora a liberação de parasitoides em ambientes de armazenamento, em si seja
345 fácil e não exija trabalhadores qualificados, as decisões sobre quando e onde liberar não
346 o são. Como em qualquer outra técnica de controle, a situação do armazém deve ser
347 analisada e as etapas de armazenamento ou processamento previstas devem ser levadas
348 em consideração. Além disso, um sistema de manejo integrado de pragas na pós-colheita

349 deve compreender diferentes estratégias, como higiene, métodos tecnológicos e
350 biotecnológicos, controle físico, químico e biológico. Essas técnicas devem ser
351 harmonizadas de forma a conceder a proteção da saúde humana e do meio ambiente
352 juntamente com um controle eficiente das pragas.

353

354 **5. Conclusão**

355 A quantidade e número de liberações de *H. hebetor* desde o início do
356 armazenamento do tabaco em paióis/galpões de produtores de tabaco e armazéns na
357 indústria, mostrou que o parasitoide foi eficaz para controlar a população de adultos de
358 *Ephestia* spp nestas condições. Portanto, essa técnica deve ser considerada como parte de
359 um programa de manejo integrado de pragas na pós-colheita.

360

361 **Agradecimentos**

362 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
363 pela bolsa de doutorado concedida ao primeiro autor. À *Japan Tobacco International*
364 (JTI) pelo apoio financeiro e apoio logístico na liberação dos parasitoides.

365

366 **Referências**

367 Adarkwah, C., Schöller M., 2012. Biological control of *Plodia interpunctella*
368 (Lepidoptera: Pyralidae) by single and double releases of two larval parasitoids in bulk
369 stored wheat. J. Stored Prod. Res. 51, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2012.06.001>.

370 Adarkwah, C., Ulrichs, C., Schaarschmidt, S., Badii, B.K., Addai, I.K., Obeng-Ofori, D.,
371 Schöller, M., 2014. Potential of Hymenopteran larval and egg parasitoids to control stored
372 product beetle and moth infestation in jute bags. Bull. Entom. Res. 104, 534-542.
373 <https://doi.org/10.1017/S0007485314000285>.

- 374 AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2021. Consulta de praga/doença.
375 http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons (accessed 15
376 February 2021).
- 377 Anukiruthika, T. Jian, F. Jayas, D.S., 2021. Movement and behavioral response of stored
378 product insects under stored grain environments - A review. *J. Stored Prod. Res.* 90,
379 101752. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101752>.
- 380 Ayres, M., Ayres Júnior, M., Ayres, D.L., Santos, A.S.dos, 2007. BioEstat 5.0 aplicações
381 estatísticas na área das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém.
- 382 Belda, C., Riudavets J., 2013. Natural enemies associated with lepidopteran pests in food
383 and feed processing companies. *J. Stored Prod. Res.* 53, 54-60.
384 <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2013.02.006>.
- 385 Brower, J.H., Press, J.W., 1990. Interaction of *Bracon hebetor* (Hymenoptera:
386 Braconidae) and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in
387 suppressing storedproduct moth populations in small inshell peanut storages. *J. Econ.*
388 *Entom.* 83, 1096-1101. <https://doi.org/10.1093/jee/83.3.1096>.
- 389 Carvalho, M.O., Pereira, A.P., Mexia, A., 2003. Adoção de protecção integrada em tabaco
390 armazenado em Portugal. In: Proceedings of the 6º Encontro Nacional de Protecção
391 Integrada, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária, ENPI, 14-
392 16 May 2003, Castelo Branco, Portugal, pp. 297-306.
- 393 Castañé, C., Riudavets, J., Lucas, E., 2018. Parasitism of single or combined pyralid
394 populations by *Venturia canescens* and *Habrobracon hebetor* in laboratory and storeroom
395 conditions. *J. Pest Sci.* 91, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1010-0>.
- 396 Cline, L.D., Press, J.W., Flaherty, B.R., 1984. Preventing the spread of the almond moth
397 (Lepidoptera: Pyralidae) from infested food debris to adjacent uninfested packages, using

- 398 the parasitoid *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). J. Econ. Entom. 77, 331-333.
399 <https://doi.org/10.1093/JEE/77.2.331>.
- 400 Collins, W.K., Hawks, S.N., 2011. Fundamentos da produção do tabaco de estufa.
401 Edunisc, Santa Cruz do Sul.
- 402 Cox, P.D., Wilkin, D.R., 1996. The potential use of biological control of pests in stored
403 grain, Research Review 36. Home-Grown Cereals Authority, London.
- 404 Daghli, G.J., Nayak, M.K., Arthur, F.H., Athanassiou, C.G., 2018. Insect pest
405 management in stored grain. In: Athanassiou, C.G., Arthur, F.H. (Eds.), Recent advances
406 in stores product protection, Springer, Berlin, pp. 45-63.
- 407 Deng, H., Ou, H.D., Jin, X., Wang, X., Li, Y., Tian, T., Yang, H., Yang, M., 2018.
408 Population dynamics and resource of *Ephesia elutella* (Hübner) in the tobacco
409 warehouses in Guiyang of Guizhou Province. Plant Protection. 44, 172-176.
410 <https://doi.org/10.16688/j.zwbh.2018010>.
- 411 Edde, P.A., 2018. Principal insects affecting tobacco plants in the field. Beiträge zur
412 Tabakforschung International / Contributions to Tobacco Research 28, 117-165.
413 <https://doi.org/10.2478/cttr-2018-0013>.
- 414 Farag, N.A., Ismail, I.A., Elbehery, H.H.A., Abdel-Rahman, R.S., Abdel-Raheem, M.A.,
415 2015. Life table of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) reared on different
416 hosts. Int. J. Chemtech Res. 8, 123-130.
- 417 Flinn, P.W., Hagstrum, D.W., 2001. Augmentative releases of parasitoid wasps in stored
418 wheat reduces insect fragments in flour. J. Stored Prod. Res. 37, 179-186.
419 [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00018-7).
- 420 Ghimire, M.N., Phillips, T.W., 2014. Oviposition and reproductive performance of
421 *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) on six different pyralid host species.
422 Ann. Entomol. Soc. Am. 107, 809-817. <https://doi.org/10.1603/AN14046>.

- 423 Graudejus, W., Briem, E. 1994. Apparatus for detection and removal of foreign matter
424 from cut tobacco. In: Proceedings of the CORESTA Congress, Bull. Spec, Harare, p. 171.
- 425 Grieshop, M.J., Flinn, P.W., Nechols, J.R., 2006. Biological control of Indianmeal moth
426 (Lepidoptera: Pyralidae) on finished stored products using egg and larval parasitoids. J.
427 Econ. Entomol. 99, 1080-1084. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-99.4.1080>.
- 428 Jacomini, D., Temponi, L.G., Alves, L.F.A., Silva, E.A.A.da, Jorge, T.C.M., 2016.
429 Extrato de tabaco no controle do besouro cascudinho de aviário. Pesqui. Agropecu. Bras.
430 51, 680-683. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500032>.
- 431 Jian, F., Jayas, D.S., 2012. The ecosystem approach to grain storage. Agric. Res. 1, 148-
432 156. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0017-7>.
- 433 Kessler, A., Baldwin, I.T., 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging
434 molecular analysis. Annu. Rev. Plant. Biol. 53, 299-328.
435 <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135207>.
- 436 Kist, B.B., Santos, C.E.dos, Carvalho, C.de, Reetz, E.R., Müller, I., Drum, M., Beling,
437 R.R., 2014. Pró-tabaco 2014: Esse negócio não pode parar. Editora Gazeta Santa Cruz,
438 Santa Cruz do Sul.
- 439 Kist, B.B., Carvalho, C.de, Beling, R.R., Treichel, M., Garcia, P., 2019. Anuário
440 brasileiro do tabaco 2019. Editora Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul.
- 441 Kist, B.B., Carvalho, C.de, Fardin, I., Garcia, P., Beling, R.R., 2020. Anuário brasileiro
442 do tabaco 2020. Editora Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul.
- 443 Krsteska, V., Stojanoski, P., 2013. *Lasioderma serricorne* F. - pest of tobacco and tobacco
444 products. Тyтyн / Tobacco. 63, 27-36.
- 445 Krsteska, V., 2014. *Ephestia elutella* Hüb. on tobacco. Тyтyн / Tobacco. 64, 70-77.
- 446 Li, Y., Yu, X., 1993. Occurrence and damage of main tobacco pests and their control.
447 Tobacco science & technology. 4, 29-31.

- 448 Mbata, G.N., Warsi, S., 2019. *Habrobracon hebetor* and *Pteromalus cerealellae* as tools
449 in post-harvest integrated pest management. *Insects* 10, 1-12.
450 <https://doi.org/10.3390/insects10040085>.
- 451 Mendes, L., Kist, B.B., Santos, C.E.dos, Carvalho, C.de, Müller, I., Garcia, P., 2015.
452 Anuário brasileiro do tabaco 2015. Editora Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul.
- 453 Moratore, C., Devicari, M., Cunha, S.S., Barcelos, D., 2009. Utilização de *Drosophila*
454 *melanogaster* como bioindicador na avaliação da letalidade de extrato de *Nicotiana*
455 *tabacum*. *Arquivos do Instituto de Biologia* 76, 471-474.
- 456 Nascimento, J.B., 2011. Fatores que afetam a liberação e a eficiência de parasitoides no
457 controle biológico de insetos-praga. *Enciclopédia Biosfera*, 7, 550-570.
- 458 Ou, H.D., Atlihan, R., Wang, X.Q., Li, H.X., Yu, X.F., Jin, X., Yang, M.F., 2020. Host
459 deprivation effects on population performance and paralysis rates of *Habrobracon*
460 *hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Pest Manag. Sci.* 1, 1-13.
461 <https://doi.org/10.1002/ps.6210>.
- 462 Ou, H.D., Jin, X., Wang, X., Liu, J., Yang, H., Yu, X., Diao, C., Yang, M., 2019.
463 Control efficiency of *Bracon hebetor* say against *Ephestia elutella* (Hübner). *Chinese*
464 *Tobacco Science*. 40, 44-51. <https://doi.org/10.13496/j.issn.1007-5119.2019.05.007>.
- 465 Parra, J.R.P., 2014. Biological control in Brazil: An overview. *Sci. Agric.* 71, 345-355.
466 <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0167>.
- 467 Pezzini, C., Jahnke, S.M., Köhler, A., 2020a. Influence of a diet containing tobacco on
468 the biology of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) and its parasitoid
469 *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Eur. J. Entomol.* 117, 190-198.
470 <https://doi.org/10.14411/eje.2020.020>.
- 471 Pezzini, C., Rosa, K.P., Jahnke, S.M., Köhler, A., 2020b. Chemotaxis of *Habrobracon*
472 *hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) in response to larvae of *Ephestia kuehniella*

- 473 (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) and host food substrate with tobacco. J. Stored Prod.
474 Res. 89, 101680. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101680>.
- 475 Press, J.W., Cline, L.D., Flaherty, B.R., 1982. A comparison of two parasitoids, *Bracon*
476 *hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) and *Venturia canescens* (Hymenoptera:
477 Ichneumonidae), and a predator *Xylocoris flavipes* (Hemiptera: Anthocoridae) in
478 suppressing residual population of the almond moth, *Ephestia cautella* (Lepidoptera:
479 Pyralidae). J. Kans. Entomol. Soc. 55, 125-128.
- 480 Prozel, S., Schöller, M., 2003. Five years of biological control of stored-product moths in
481 Germany. In: Credland, P.F., Armitage, D.M., Bell, C.H., Cogan, P.M., Highley, E.
482 (Eds.), Advances in stored product protection, CABI Publishing, Wallingford, pp. 322-
483 324.
- 484 Reigart J.R., Roberts, J.R., 2013. Biologicals and insecticides of biological origin. In:
485 Reigart, J.R., Roberts, J.R. (Eds.), Recognition and management of pesticide poisonings,
486 6th edition, United States Environmental Protection Agency (EPA), Washington, pp. 70-
487 79.
- 488 Sabbour, M., 2020. Integrated pest control of stored product insect pests. Lambert
489 Academic Publishin, Sarbruque.
- 490 Schöller, M., Prozell, S., Suma, P., Russo, A. 2018. Biological control of stored-product
491 insects. In: Athanassiou, C.G., Arthur, F.H. (Eds.), Recent advances in stores product
492 protection, Springer, Berlin, pp. 183-210.
- 493 Slone, J.D., Burrack, H.J., 2016. Integrated pest management practices reduce insecticide
494 applications, preserve beneficial insects, and decrease pesticide residues in flue-cured
495 tobacco production. J. Econ. Entom. 109, 2397-2404. <https://doi.org/10.1093/jee/tow191>.

- 496 Soares, M.A., Zanuncio, J.C., Leite, G.L.D., Reis, T.C., Silva, M.A., 2009. Controle
497 biológico de pragas em armazenamento: uma alternativa para reduzir o uso de agrotóxicos
498 no Brasil?. *Unimontes Científica* 11, 52-59.
- 499 Trematerra, P., Oliviero, A., Savoldelli, S., Schöller, M., 2016. Controlling infestation of
500 a chocolate factory by *Plodia interpunctella* by combining mating disruption and the
501 parasitoid *Habrobracon hebetor*. *Insect Sci.* 24, 503-510. [https://doi.org/10.1111/1744-](https://doi.org/10.1111/1744-7917.12319)
502 7917.12319.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos, nas condições estudadas, constatou-se que mesmo insetos que são considerados praga na cultura do tabaco, como as traças, podem ser afetados pela nicotina, em diferentes proporções. Pensando na multiplicação de parasitoides em larga escala sobre *E. kuehniella*, a dieta sem tabaco é a mais indicada para a criação do hospedeiro, tanto, para *H. hebetor* quanto para *T. pretiosum*. Isso porque, em maiores dosagens, o tabaco influencia negativamente o desenvolvimento e viabilidade da traça e, mesmo em doses menores, pode alterar alguns comportamento e percentual de sucesso do parasitismo.

Neste sentido, *H. hebetor* parece ser mais adaptado ao tabaco seco, pois não foi afetado pela nicotina na proporção avaliada. Diferente do parasitoide de ovos, *T. pretiosum*, que teve um parasitismo eficiente somente em mudas vivas e não em tabaco seco. De forma complementar, a experiência prévia com o odor do hospedeiro, pode proporcionar, de forma mais rápida e eficaz, o encontro entre o parasitoide larval *H. hebetor* e o hospedeiro alvo.

Os resultados parecem apontar para o uso de *H. hebetor* em armazenamento e limitar o uso de *T. pretiosum* ao controle biológico somente em campo, antes da colheita. Portanto, sugere-se que programas de controle biológico envolvam estudos determinando a liberação de parasitoides que não sejam suscetíveis a compostos tóxicos como a nicotina, para se obter um melhor controle.

O sucesso de *H. hebetor* no controle de *Ephestia* spp. em liberações inundativas no armazenamento do tabaco seco no Brasil, é registrado, pela primeira vez neste estudo e demonstra o potencial da espécie para o controle das traças, abrindo novas ideias e oportunidades na aplicabilidade de parasitoides nestes ambientes de produção.