



**PRISCILLA TAVARES NASCIMENTO**

**AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DE *Bacillus thuringiensis* e  
*Trichogramma pretiosum* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Helicoverpa  
zea***

**SETE LAGOAS  
2016**

**PRISCILLA TAVARES NASCIMENTO**

**AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DE *Bacillus thuringiensis* e  
*Trichogramma pretiosum* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Helicoverpa  
zea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Antonio Matiello Fadini

Coorientador:

Profa. Dra. Cidália Gabriela Santos Marinho

**SETE LAGOAS**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)  
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ, com  
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N244a Nascimento, Priscilla Tavares.  
Avaliação da compatibilidade de *Bacillus thuringiensis* e *Trichogramma pretiosum* no controle biológico de *Helicoverpa zea* / Priscilla Tavares Nascimento ; orientador Marcos Antonio Matiello Fadini; coorientadora Cidália Gabriela Santos Marinho. -- Sete Lagoas, 2016.  
59 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) -- Universidade Federal de São João del-Rei, 2016.

Vespas parasitoides de ovos. 2. Bioinseticidas. 3. MIP. 4. Olfatômetro. 5. Controle biológico. I. Fadini, Marcos Antonio Matiello , orient. II. Marinho, Cidália Gabriela Santos , co orient. III. Título.

**PRISCILLA TAVARES NASCIMENTO**

**AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DE *Bacillus thuringiensis* e  
*Trichogramma pretiosum* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Helicoverpa  
zea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei, *Campus Sete Lagoas*, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Antonio Matiello Fadini

Coorientador:

Profa. Dra. Cidália Gabriela Santos Marinho

Sete Lagoas, 05 de agosto de 2016.

Banca Examinadora:

Dr. Fernando Hercos Valicente – Embrapa Milho e Sorgo

Dr. Marcus Alvarenga Soares – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

## AGRADECIMENTOS

Á Deus, pelas bênçãos e maravilhas que realiza em minha vida. E por me fortalecer diante dos obstáculos.

Ao meu marido, Charles Maia, por sempre me apoiar e incentivar no que me proponho.

Á minha filha, Sophia, que mesmo tão pequena me faz lutar para proporcionar um futuro melhor para Ela.

À minha mãe, Marina Tavares, que sempre faz o impossível para que eu vá além dos meus próprios objetivos.

Ás minhas irmãs, Tamires e Karine, pelo amor e apoio em todos os momentos.

Á todos os meus familiares e amigos que me sempre me encativaram nos meus estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Antonio Matiello Fadini, e a coorientadora, Profa. Dra. Cidália Gabriela Santos Marinho, pela orientação impecável, confiança para a realização deste trabalho, pelos ensinamentos e auxílio.

Ao Dr. Fernando Valicente juntamente com a Embrapa Milho e Sorgo, por me proporcionar estrutura para a condução do trabalho, além dos ensinamentos.

Agradecimentos à Koppert Biological Systems, na pessoa da Sra. Sandra Magro pelo fornecimento dos parasitoides.

Á Fapemig e á Capes, pelo apoio financeiro.

As minhas amigas Carine e Gabriele pelo apoio e momentos de estudo e risos.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico na Embrapa e do Laboratório de Entomologia Agrícola na universidade pela ajuda, apoio e momentos de descontração.

À Universidade Federal de São João Del-Rei junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias pela oportunidade e ao corpo docente pelos valiosos ensinamentos.

À banca examinadora, pela disponibilidade em participar deste momento e pelas contribuições para melhoria do trabalho.

Aos meus colegas de Mestrado, por tornarem a caminhada mais agradável.

## SUMÁRIO

RESUMO - .....	i
ABSTRACT - .....	ii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS .....	4
ARTIGO 1 .....	8
PRODUTOS COMERCIAIS E CEPAS DE Bt INTERFEREM NA RESPOSTA OLFATIVA DE <i>Trichogramma pretiosum</i> ? .....	8
RESUMO .....	8
ABSTRACT - .....	9
1. Introdução.....	10
2. Material e Métodos.....	13
2.1. Criação do hospedeiro .....	13
2.2. Cultivo dos isolados bacterianos e estimativa da CL 50 .....	13
2.3. Patogenicidade à <i>H. zea</i> .....	14
2.4. Parasitoides.....	14
2.5. Preparo das cartelas com ovos de <i>H. zea</i> a serem oferecidos aos parasitoides .....	15
2.6. Resposta olfativa de <i>T. pretiosum</i> a ovos tratados com cepas e formulados de Bt....	15
2.7. Análise dos dados .....	16
3. Resultados .....	18
3.1. Efeito das cepas e formulados sobre <i>H. zea</i> .....	18
3.2. Comportamento das vespas no olfatômetro .....	19
4. Discussão.....	20
Referências Bibliográficas .....	24
ARTIGO 2 .....	31
O PARASITISMO DE <i>Trichogramma pretiosum</i> É ALTERADO PELA PRESENÇA DE <i>Bacillus thuringiensis</i> EM OVOS DE <i>Helicoverpa zea</i> ? .....	31
RESUMO .....	31
ABSTRACT .....	32
Introdução .....	33
Material e Métodos .....	36

Resultados.....	39
Discussão .....	41
Referências.....	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	51

## AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DE *Bacillus thuringiensis* e *Trichogramma pretiosum* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Helicoverpa zea*

**RESUMO** - O uso conjunto de táticas de controle é um preceito fundamental do Manejo Integrado de Pragas. Este estudo investigou se o uso de dois agentes de controle biológico de pragas, a vespa parasitoide *Trichogramma pretiosum* e o entomopatógeno *Bacillus thuringiensis*, podem ser usados em conjunto, sem interferência negativa de um sobre o outro. O primeiro objetivo do estudo foi avaliar se a presença de *B. thuringiensis* interfere na preferência de *T. pretiosum*. Ovos de *Helicoverpa zea* foram banhados com a CL 50 (estimada em teste preliminar) de produtos comerciais Agree<sup>®</sup>, Dipel<sup>®</sup> e as cepas HD1, *Bt kurstaki* e HD11, *Bt aizawai*. Em teste de olfatométrie, os ovos da lagarta tratados foram oferecidos aos parasitoides para a avaliação da escolha das vespas. Cada tratamento foi contrastado com o controle (ovos banhados com água). O segundo objetivo foi o de avaliar o parasitismo, emergência e sobrevivência de *T. pretiosum* em ovos de *H. zea* tratados com as mesmas cepas e produtos comerciais de Bt citados acima. Em teste de escolha realizado em placa de Petri, ovos banhados com cepas e produtos comerciais foram oferecidos às fêmeas de *T. pretiosum*. Os resultados mostraram que os tratamentos de ovos de *H. zea* com produtos comerciais e cepas de Bt não interferem na escolha do parasitoide na comparação com o controle. Não afetando também o parasitismo e emergência do parasitoide. A sobrevivência também não foi alterada pelos tratamentos. Portanto, através deste estudo, foi possível observar que os dois agentes de controle podem ser utilizados em conjunto sem efeito negativo de um sobre o outro.

Palavras-chave: Preferência de oviposição. Bioinseticidas. Sobrevivência. Lagarta da espiga. Controle biológico. Olfatômetro. Vespas parasitoides de ovos. MIP.

## COMPATIBILITY ASSESSMENT of *Bacillus thuringiensis* and *Trichogramma pretiosum* IN BIOLOGICAL CONTROL of *Helicoverpa zea*

**ABSTRACT** - The simultaneous use control tactics is a fundamental precept of Integrated Pest Management. This study investigated whether the use of two agents of biological control of pests, the parasitoid *Trichogramma pretiosum* wasp and entomopathogen *Bacillus thuringiensis* may be used together without a negative interference of one over another. The first objective of the study was to evaluate whether the presence of *B. thuringiensis* interferes with preference of *T. pretiosum*. Corn earworm eggs were bathed with the CL 50 (estimated at preliminar test) of Agree® commercial products, Dipel® and HD1 strains, Bt *kurstaki* and HD11, Bt *aizawai*. In olfactometry test, the eggs were offered to the caterpillar treated parasitoids for evaluating the choice of wasps. Each treatment was contrasted with control (i.e. eggs bathed with water). The second objective was to evaluate parasitism, emergency and survival parasitoids *H. zea* eggs treated with the same strains and Bt commercial products listed above. In choice test on a petri dish, eggs plated with strains and commercial products were offered to *T. pretiosum* females. The results showed that treatment of *H. zea* eggs commercial products and Bt strains do not interfere in the choice of parasitoid in comparisoprwith the control. There also affecting parasitism and emergence of the parasitoid. Survival was also not affected by treatments. Therefore, by this study, it was observed that the two control agents can be used together without a negative effect on the other.

Key-words: Oviposition preference. Insecticides. Survival. Corn earworm. Biological control. Olfactometer. Wasp parasitoid eggs. IPM.

## INTRODUÇÃO GERAL

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) preconiza a integração de táticas de controle (Kogan et al., 1997; Jin et al., 2014; Wang et al., 2014). Ou seja, as táticas utilizadas nos programas de MIP devem ser complementares e não antagônicas, necessitando estudos que avaliem e certifiquem, previamente, a complementariedade dos métodos de controle para a implantação de um programa de MIP efetivo. Tal integração, apesar de almejada, é muitas vezes de difícil realização.

O uso de inseticidas organo-sintéticos não seletivos, por exemplo, pode reduzir o número de inimigos naturais em agroecossistemas, reduzindo a eficiência do controle biológico (Collier & Steenwyk, 2004; Desneux et al., 2007; Garcia et al., 2009; Shen et al., 2013; Singh et al., 2015). Como alternativa ao uso intensivo dos produtos sintéticos, inseticidas microbianos se mostram eficientes no controle de pragas (Moscardi, 1983; Valicente, 2008; Daniel & Wyss, 2010; Akmal et al., 2013; Kim et al., 2015; Zafar et al., 2016). O *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) (Bt), por exemplo, é um entomopatógeno utilizado com sucesso no controle de pragas agrícolas (Alves, 1998; Polanczyk et al., 2008; Carrière et al., 2015).

Essa bactéria é capaz de produzir inclusões cristais durante a esporulação que são responsáveis pela atividade tóxica a diversas espécies de insetos (De Maagd et al., 2003; Xu et al., 2014). Em espécies da ordem lepdoptera, após a ingestão do Bt, os cristais são solubilizados em protoxinas que em seguida sofrem ação das enzimas proteases onde são convertidos em quatro ou mais polipeptídeos tóxicos ( $\delta$ -endotoxinas). Em seguida as proteínas se ligam aos receptores específicos do intestino médio formando poros na membrana, interferindo no balanço iônico e osmótico aumentando a permeabilidade da membrana. O aumento na absorção de água causa lise das células do intestino médio, ocasionando em morte do inseto (Copping & Menn, 2000; De Maagd et al., 2003; Bravo et al., 2007).

O *B. thuringiensis* e parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma*, são exemplos de agentes de controle biológico utilizados de maneira promissora. No entanto, estudos são necessários para avaliar a compatibilidade de uso simultâneo desses agentes de controle (Pratissoli et al., 2006).

Espécies do gênero *Trichogramma* são eficientes no controle de pragas de várias culturas (Wajnberg & Hassan, 1994; Smith, 1996; Fatouros et al., 2007). Uma vantagem de

uso desta vespa é a menor especificidade a ovos do hospedeiro a comparar com outros gêneros de parasitoides (Li, 1994). Ou seja, por ser um parasitoide generalista (Brotodjojo & Walter, 2006), este controla maior número de espécies de insetos praga. Outra vantagem desse parasitoide é a capacidade de controlar a praga antes mesmo da ocorrência do dano, além de a relativa facilidade de criação e manipulação (Parra, 2010; Costa et al., 2014).

Vespas parasitoides usam pistas físicas e, principalmente químicas emitidas pela planta (Paschalidou et al., 2010), ou deixados pela mariposa no momento da oviposição (Bayram *et al.*, 2010; Cusumano *et al.*, 2015).

Espécies de lepidópteros ao realizarem a oviposição depositam sobre os ovos escamas ou substâncias utilizadas para fixar os ovos ao substrato (Hilker et al., 2002; Bayram et al., 2010). Estas substâncias servem como proteção ao ovo, já que eles ficam expostos a parasitoides, predadores e a condições climáticas adversas. (Hilker & Fatouros, 2014).

Parasitoides de ovos como o *Trichogramma*, utilizam desses odores deixados pelas mariposas para a seleção, identificação e aceitação do hospedeiro (Vinson, 1976; Nordlund, 1983; Lewis & Nordlund, 1984; Nordlund et al., 1988; Schmidt, 1994). Dentre os odores liberados pelos insetos (semioquímicos), os chamados aleloquímicos funcionam como meio de comunicação entre espécies diferentes, e podem atuar como cairômonios, sinomônios ou alomônios.

Estas pistas são de extrema importância para a localização do hospedeiro, devido aos ovos serem muito pequenos e imóveis (Fatouros et al., 2008; Colazza et al., 2010). Além de podem ser utilizadas como pistas de curto alcance (de Santis et al., 2008; Xu *et al.*, 2014), por servirem como cairômonios pelos parasitoides, (Fatouros et al., 2008; Milonas, et al., 2009) além de auxiliar no reconhecimento do hospedeiro e aumentarem as taxas de parasitismo (Boo and Yang, 2000).

Devido à importância destes voláteis provenientes dos ovos para os parasitoides, é necessário investigar se há interferência dos produtos utilizados na agricultura simultaneamente á liberação das vespas, no comportamento de forrageamento, além de parâmetros biológicos.

A investigação de possíveis efeitos destes produtos no comportamento de parasitoides de ovos ainda é pouco explorada. Os trabalhos realizados em sua maioria, expõem vespas adultas aos produtos testados e em seguida são avaliados os parâmetros como parasitismo,

longevidade, emergência, mortalidade, e efeitos subletais (Stark et al., 2013; Khan et al., 2015; Potrich et al., 2015; Song et al., 2015).

Produtos comerciais á base de Bt, por exemplo, além da bactéria em sua forma ativa são compostos por ingredientes inertes como adjuvantes e espalhantes. Portanto, são necessários estudos que avaliem se ovos presentes com algo em sua superfície, no caso a bactéria, afetaria a resposta olfativa, escolha de parasitismo, além de emergência e sobrevivência das vespas.

Este trabalho foi realizado procurando responder as seguintes questões: Os ovos de *H.zea* cobertos com solução de Bt interferem na resposta olfativa do *Trichogramma pretiosum*? Cepas e produtos comerciais seriam atraentes ou repelentes ao parasitoide? Ou não exerceria nenhuma influencia na resposta olfativa das vespas? Ao realizar sua avaliação, a escolha de ovipositar o hospedeiro seria a mesma se os ovos estiverem cobertos com o Bt?

Decidimos conduzir os trabalhos neste sentido pelo fato de espécies de parasitoides de ovos, em especial o *Trichogramma* realizarem uma avaliação criteriosa em seu hospedeiro antes de efetuar a oviposição.

Esta dissertação foi realizada com o objetivo de, no Capítulo I, avaliar a capacidade de forrageamento de *T. pretiosum* por ovos de *H. zea* tratados com Bt. Neste capítulo, testamos a hipótese nula de que a presença de *B. thuringiensis* nos ovos de *H. zea* não altera na escolha de *T. pretiosum*.

O Capítulo II foi realizado com o objetivo de avaliar o parasitismo, emergência e sobrevivência de *T. pretiosum* em ovos de *H. zea* tratados com diferentes cepas e produtos comerciais de *B. thuringiensis*. Neste capítulo testamos duas hipóteses nulas. A primeira foi que a presença de *B. thuringiensis* não altera a preferência de *T. pretiosum* em parasitar ovos de *H. zea*. A segunda hipótese foi a de que os parâmetros biológicos dos descendentes de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *H. zea* tratados com diferentes cepas de Bt não serão alterados.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B.; LOPES, R.B. Controle Microbiano de Pragas na América Latina. 1. ed. **Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz-FEALQ**, 1998. v.1. 414p.
- AKMAL, M.; FREED, S.; MALIK, M.N.; GUL, H.T. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) against different aphid species under laboratory conditions. **Pakistan J. Zool.**, v.45, p.71-78, 2013.
- BAYRAM, A.; GIANANDREA, S.; ONOFRI, A.; CONTI, E. Sub-lethal effects of two pyrethroids on biological parameters and behavioral responses to host cues in the egg parasitoid *Telenomus busseolae*. **Biological Control**, v.53, p.153–160, 2010.
- BOO, K.S.; YANG, J.P. Kairomones used by *Trichogramma chilonis* to find *Helicoverpa assulta* eggs. **J Chem Ecol.**, v.26, p.359–375, 2000.
- BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v.49, p.423–435, 2007.
- BROTODJOJO, R.R.R.; WALTER, G.H. Oviposition and reproductive performance of a generalist parasitoid (*Trichogramma pretiosum*) exposed to host species that differ in their physical characteristics. **Biological Control**, v.39, p.300–312, 2006.
- COLAZZA, S.; PERI, E.; SALERNO, G.; CONTI, E. Host Searching by Egg Parasitoids: Exploitation of Host Chemical Cues. In: CONSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R. (Ed.). *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*. **Dordrecht: Springer**, 2010. p. 97–147.
- CARRIÈRE, Y.; CRICKMORE, N.; TABASHNIK, B.E. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology**, v.33, p.161–168, 2015.
- COLLIE, T.; STEENWYK, R.V. A critical evaluation of augmentative biological control. **Biol Control.**, v.31 p.245–256, 2004.
- COSTA, M.A.; MOSCARDINI, V.F.; DA COSTA, G.P.; CARVALHO, G.A.; DE OLIVEIRA, R.L, DE OLIVEIRA, H.N. Sublethal and transgenerational effects of insecticides in developing *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ecotoxicology**, v. 23, n. 8, p. 1399–1408, 2014.
- COPPING, L.G.; MENN, J.J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v.56, n.5, p.651-676, 2000.
- CUSUMANO, A.; WELDEGERGIS, B.T.; COLAZZA, S.; DICKE, M.; FATOUROS, N.E. Attraction of egg-killing parasitoids toward induced plant volatiles in a multi-herbivore context. **Oecologia**, v.179, p.163–174, 2015.
- DANIEL, C.; WYSS, E. Field applications of *Beauveria bassiana* to control the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi*. **J. appl. Ent.**, v.134 p.675–681, 2010.

- DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H.E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet.** 2003, 37, 409–433.
- DE SANTIS, F.; CONTI, E.; ROMANI, R.; SALERNO, G.; PARILLO, F.; BIN, F. Colleterial glands of *Sesamia nonagrioides* as a source of the host-recognition kairomone for the egg parasitoid *Telenomus busseolae*. **Physiological Entomology**, v.33 p.7–16, 2008.
- DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annu Rev Entomol.**, v.52 p.81–106, 2007.
- FATOUROS, N. E.; BUKOVINSZKINE'KISS, G.; DICKE, M.; HILKE, M. The response specificity of *Trichogramma* egg parasitoids towards infochemicals during host location. **Journal of Insect Behavior**, v. 20, n. 1, p. 53–65, 2007.
- FATOUROS, N.E.; DICKE, M.; MUMM, R.; MEINERS, T.; HILKER, M. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. **Behavioral Ecology**, v.19, p.677–689, 2008.
- GARCIA, P.V.; PEREIRA, N.; OLIVEIRA, L.M. Side-effects of organic and synthetic pesticides on cold-stored diapausing prepupae of *Trichogramma cordubensis*. **BioControl**, v.54, p.451–458, 2009.
- HILKER, M.; KOBBS, C.; VARAMA, M.; SCHRANK, K. Insect egg deposition induces *Pinus sylvestris* to attract egg parasitoids. **J Exp Biol.**, v. 205, p.455–461, 2002.
- HILKER, M.; FATOUROS, N.E. Plant Responses to Insect Egg Deposition. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 60, p.493–515, 2014.
- JIN, T.; LIN, YU-YING; JIN, QI-AN; WEN, HAI-BO; PENG, ZHENG-QIANG. Sublethal effect of avermectin and acetamiprid on the mortality of different life stages of *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera: Hispididae) and its larvae parasitoid *Asecodes hispinarum* Bou??ek (Hymenoptera: Eulophidae). **Crop Protection**, v. 58, p. 55–60, 2014.
- KIM, E.; JEOUNG, S.; PARK, Y.; KIM, K.; KIM, Y. A Novel Formulation of *Bacillus thuringiensis* for the Control of Brassica Leaf Beetle, *Phaedon brassicae* (Coleoptera: Chrysomelidae). **J. Econ. Entomol.**, v.6, p.2556–2565, 2015.
- KHAN, M.A., KHAN, H., RUBERSON, J.R. Lethal and behavioral effects of selected novel pesticides on adults of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Pest. Manag. Sci.**, v.71, p.1640–1648, 2015.
- KOGAN, M.; TURNIPSEED, S.G.; SHEPARD, M.; OLIVEIRA, E.B.; BORGIO, A. Pilot insect pest management program for soybean in Southern Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v.5, p. 659-663, 1977.
- LEWIS, W.J.; NORLUND, D.A. Semiochemicals influencing fall armyworm parasitoid behavior: implications for behavioral manipulation. **The Florida Entomologist**, v. 67, p.343-349, 1984.

- LI, L.Y. Worldwide Use of *Trichogramma* for Biological Control on Different Crops: A Survey. Reference to a chapter in an edited book: Biological Control with Egg Parasitoids, In: WAJNBERG, E., HASSAN, S.A. (Eds.). **CAB International, Wallingford, U.K**, 1994. p. 37-53.
- MILONAS, P.G.; MAZOMENOS, B.E.; KONSTANTOPOULOU, M.A. Kairomonal effect of sex pheromone components of two lepidopteran olive pests on *Trichogramma* wasps. **Insect Science**, v.16, p.131-136, 2009.
- MOSCARDI, F. Utilização do Baculovirus anticarsia no controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1983. 21 p. (EMBRAPA-CNPSO. Comunicado Técnico, 23).
- NORLUND, D.A.; LEWIS, W.J.; GUELDERER, R.C. Kairomones and their use for management of entomophagous insects: Response of *Telenomus remus* to abdominal tips of *Spodoptera frugiperda*, (Z)-9-tetradecene-1-ol acetate and (Z)-9-dodecene-1-olacetate. **J Chem Ecol.**, v. 9, p.695-701, 1983.
- NORLUND, D.A.; STRAND, M.R.; LEWIS, W.J.; VINSON, S.B. Role of kairomones from host accessory gland secretions in host recognition by *Telenomus remus* Nixon and *Trichogramma pretiosum* Riley with partial characterization. **Entomol. Exp. Appl.**, v.44, p.37-44, 1988.
- PARRA, J.R.P. Mass rearing of egg parasitoids for biological control programs. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A (Eds.). Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma*. **Dordrecht: Springer**, 2010. p. 267–292.
- PASHALIDOU, F.G.; HUIGENS, M.E.; DICKE, M.; FATOUROS, N.E. The use of oviposition-induced plant cues by *Trichogramma* egg parasitoids. **Ecological Entomology**, v.35, p.748–753, 2010.
- PRATISSOLI, D.; POLANCZYK, R.A.; VIANNA, U.R.; ANDRADE, G.S; OLIVEIRA, R.G.S. Desempenho de *Trichogramma pratissolii* Querino & Zucchi (Hymenoptera, Trichogrammatidae) em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera, Pyralidae) sob efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Ciência Rural**, v.36 p.369-377, 2006.
- POLANCZYK, R.A.; VALICENTE, F.H.; BARRETO, M.R. Utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas agrícolas na América Latina, p.111-136. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. **Piracicaba, FEALQ**, 2008. p.414.
- POTRICH, M.; ALVES, L. F.; LOZANO, E.; ROMAN, J. C.; PIETROWSKI, V.; NEVES, P.M.O.J. Interactions between *Beauveria bassiana* and *Trichogramma pretiosum* under laboratory conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.154, p.213–221, 2015.
- STARK, J.D.; DESNEUX, N.; BIONDI, A.; ZAPPALA, L. Do Biopesticides Affect the Demographic Traits of a Parasitoid Wasp and Its Biocontrol Services through Sublethal Effects? **PLoS ONE**, v.8, p.76548, 2013.

SCHMIDT, J. M. Host recognition and acceptance by *Trichogramma*. Biological Control with Egg Parasitoids. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. (Ed.). **CAB International, Wallingford, Oxon, UK**, 1994. p.165–200.

SHEN, L-Z.; CHEN, P-Z.; XU, Z-H.; DENG, J-Y.; HARRIS, M-K.; et al. Effect of Larvae Treated with Mixed Biopesticide *Bacillus thuringiensis* - Abamectin on Sex Pheromone Communication System in Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera*. **PLoS ONE**, v.8, e68756, 2013.

SINGH, N.K.; NEERAJ, A.; MISHRA, P.K.; SAURABH, S. Toxicity of botanical microbial and chemical pesticide to *Trichogramma chilonis* Ishii (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Experimental Zoology**, v.18, p.479-482, 2015.

SMITH, S. M. Biological control with *Trichogramma*: Advances, successes, and potential of their use. **Ann. Rev. Entomol.**, v.41, p.375–406, 1996.

SONG, L.W.; WEN, X.Y.; ZANG, L.S.; RUAN, C.C.; SHI, S.S.; SHAO, X.W.; ZHANG, F. Parasitism and Suitability of Different Egg Ages of the *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Tortricidae) for Three Indigenous *Trichogramma* Species. **Journal of Economic Entomology**, v.108, p.933–939, 2015.

VINSON, S. B. Host selection by insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, v.21, p.109–133, 1976.

VALICENTE, F. H. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, v. 105, p. 1-9, dez 2008.

XU, J.; HUIGENS, M.E.; ORR, D.; GROOT, A.T. Differential response of *Trichogramma* wasps to extreme sex pheromone types of the noctuid moth *Heliothis virescens*. **Ecological Entomology**, v.39, p.627–636, 2014.

WANG, Y.; WU, C.; CANG, T.; YANG, L.; YU, W.; ZHAO, X.; WANG, Q.; CAI, L. Toxicity risk of insecticides to the insect egg parasitoid *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Pest Management Science**, v.70, n.3, p.398–404, 2014.

WAJNBERG, E.; HASSAN, S. A. Biological Control with Egg Parasitoids, **CAB International, Wallingford, Oxon, UK**, 1994.

ZAFAR, J.; FREED, S.; KHAN, B.A.; FAROOQ, M. Effectiveness of *Beauveria bassiana* Against Cotton Whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Aleyrodidae: Homoptera) on Different Host Plants. **Pakistan J. Zool.**, v.48, p.91-99, 2016.

## ARTIGO 1

### PRODUTOS COMERCIAIS E CEPAS DE Bt INTERFEREM NA RESPOSTA OLFATIVA DE *Trichogramma pretiosum*?

Artigo escrito conforme as normas do periódico Biological Control

**RESUMO** - Este estudo investigou se o uso de dois agentes de controle biológico de pragas, a vespa parasitoide *Trichogramma pretiosum* e o entomopatógeno *Bacillus thuringiensis*, podem ser usados simultaneamente. Ambos têm sido usados em conjunto, no entanto, ainda não foram realizados estudos que avaliem se esses agentes, quando utilizados conjuntamente, interferem de alguma maneira um sobre o outro. O objetivo do estudo foi avaliar se a presença de *B. thuringiensis* interfere na preferência de *T. pretiosum*. Como teste preliminar, lagartas de *H. zea* foram submetidas aos produtos comerciais Agree<sup>®</sup>, Dipel<sup>®</sup> e às cepas HD1 e HD11, avaliando-se a mortalidade e, em seguida, estimadas as CL50 para os produtos comerciais e para as cepas a base de Bt. Foi realizado teste em branco em olfatômetro tipo “Y” para avaliar se as vespas são capazes de localizar os ovos de *H. zea* na ausência da planta ou de outra fonte de odor. Para o teste de olfatometria, os ovos foram banhados com os produtos comerciais, com suspensões contendo as cepas de Bt ou com água destilada (controle) e, em seguida, oferecidos aos parasitoides para a avaliação da escolha das vespas. Cada tratamento foi contrastado com o controle. No teste em branco foi possível observar que o *Trichogramma* é capaz de localizar ovos de *H. zea*, a curta distância. Os resultados também mostraram que os tratamentos de ovos de *H. zea* com os produtos comerciais e cepas de Bt não interferem na escolha do parasitoide. Portanto, verificou-se que o parasitoide realizou sua escolha tanto pelos ovos sem a presença de Bt, quanto pelos ovos banhados com as cepas e produtos comerciais, indicando que ambos agentes controle biológico podem ser utilizados em conjunto sem efeito antagônico.

Palavras – chave: Controle biológico; olfatômetro; vespas parasitoides; MIP; localização do hospedeiro.

## DO COMMERCIAL PRODUCTS AND Bt STRAINS INTERFERE WITH *Trichogramma pretiosum* OLFACTORY RESPONSE?

**ABSTRACT** - This study investigated if the use of two pest biological control agents, the parasitoid wasp *Trichogramma pretiosum* and entomopathogen *Bacillus thuringiensis*, can be used together. Both have been used together, however, studies have not been conducted to assess whether these tactics, when used simultaneously interfere with each other in any way. The aim of the study was to evaluate if the presence of *B. thuringiensis* interferes with the preference of *T. pretiosum*. As a preliminary test, *Helicoverpa zea* caterpillars were submitted to the commercially formulated products Agree®, Dipel® and HD1 and HD11 strains, evaluating mortality and then the LC50s were estimated for the commercial products and Bt based strains. A check treatment was also conducted in a "Y" type olfactometer to determine whether the wasps are able to locate *H. zea* eggs in the absence of the plant or from another source of scent. For the olfactometry test, the eggs were bathed with the commercial formulations or with suspensions containing the Bt strains or distilled water (control) and then offered to the parasitoids to evaluate the choice made by the wasps. Each treatment was contrasted with the control. In the check treatment it was possible to observe that the *Trichogramma* was able to locate *H. zea* eggs in the absence of the plant, within a short distance. The results also show that *H. zea* egg treatments with formulations and Bt strains do not interfere in the choice made by the parasitoid. Therefore, it was found that the parasitoid chose eggs without the presence of Bt, as well as the eggs bathed with strains and formulations, indicating that the two control agents may be used together without a negative effect on each another.

Key-words: Biological control; olfactometer; parasitoids wasps; IPM; host location

## 1. Introdução

Uma das premissas do Manejo Integrado de Pragas (MIP) é a integração de táticas de controle (Norris et al., 2003; Sattar et al., 2011; Amaro et al., 2015). Dentre as táticas de controle disponíveis, o controle biológico de pragas agrícolas, com uso de vespas parasitoides do gênero *Trichogramma* e de inseticidas microbianos à base de *Bacillus thuringiensis* são alternativas ao controle químico, apresentando eficiência comprovada (Joung and Cote, 2000; Azizoglu et al., 2015).

*Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é um parasitoide generalista de ovos que mede de 0,5 a 1 mm (Li, 1994). Este microhimenóptero é eficiente e amplamente utilizado, pelo fato de controlar a praga antes mesmo da ocorrência do dano, além da relativa facilidade de criação e manipulação (Parra, 2010; Costa et al., 2014).

Liberações em massa de espécies de *Trichogramma* são realizadas com muita frequência para o controle de pragas da ordem lepidoptera (Smith, 1996; Gardner et al., 2011). No entanto, o uso somente desse agente de controle pode ser insuficiente para a redução da praga-alvo e deve ser complementado com outro agente de controle (Khan et al., 2015).

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner), tornou-se um dos mais importantes organismos de controle de pragas na agricultura (Raymond et al., 2013; Carrière et al., 2015). Esse entomopatógeno produz um cristal protéico ( $\delta$ -endotoxina ou proteínas *Cry*) que possui efeito inseticida em mais de 1000 espécies de insetos de várias ordens (Glare and O'Callaghan, 2000; Valicente and Mourão, 2008; Xu et al., 2014). Essas toxinas têm sido utilizadas para a produção de inseticidas biológicos há mais de cinquenta anos (Sanahuja et al., 2011; Sansinenea and Ortiz, 2014).

Em espécies da ordem lepidoptera, após a ingestão do Bt pelo inseto, os cristais são solubilizados em pH alcalino, liberando as protoxinas que em presença de enzimas digestivas, proteases, são convertidas em quatro ou mais polipetídeos tóxicos ( $\delta$ -endotoxinas). Em seguida as proteínas se ligam aos receptores específicos do intestino médio formando poros na membrana, interferindo no balanço iônico e osmótico aumentando a permeabilidade da membrana. O aumento na absorção de água causa lise das células do intestino médio, ocasionando em morte do inseto (Copping & Menn, 2000; De Maagd et al., 2001; Bravo et al., 2007).

Esses dois agentes de controle biológico (i.e. vespas parasitoides e Bt) vêm sendo usados em conjunto no controle de diversas pragas agrícolas em todo mundo (Wang et al., 2012; Sayed et al., 2015). No entanto, pouca atenção é dada ao possível antagonismo destes dois agentes de controle.

Trabalhos avaliaram a ação de produtos organosintéticos sobre inimigos naturais (Delpuech et al., 1998; Alix et al., 2001; Vianna et al., 2009; Khan et al., 2015). Esses estudos relatam o efeito letal e subletal desses produtos em parasitoides adultos (Stapel et al., 2000; Saber et al., 2005; Stark et al., 2013), além de outros parâmetros como fecundidade (Haseeb and Amano, 2002), razão sexual e longevidade (Souza et al., 2014; Bari et al., 2015; Krechemer and Foerster, 2015; Song et al., 2015). Encontram-se também estudos com uso inseticidas biológicos avaliando o efeito desses produtos sobre os parâmetros citados acima (Potrich et al., 2009; Ksentini et al., 2010; Potrich et al., 2015).

No entanto, é necessário investigar se há interferência de produtos organosintéticos e biológicos utilizados em agricultura, no comportamento de forrageamento de espécies de *Trichogramma*.

Sabe-se que os estímulos utilizados pelos parasitoides para localização de seu hospedeiro são úteis para incrementar a eficiência do controle biológico (Vet and van Alphen, 1985; Rutledge and Wiedenmann, 1999). Então será possível que estes produtos comerciais e cepas de Bt depositados sobre os ovos possam atuar de alguma forma na atratividade dos parasitoides?

Parasitoides como os do gênero *Trichogramma*, utilizam os semioquímicos como pistas químicas para a localização de seu hospedeiro. As vespas detectam pistas deixadas sobre ou em volta dos ovos no momento da oviposição, oriundas de escamas ou de substâncias utilizadas para fixar os ovos ao substrato (Vinson, 1998; Hilker et al., 2002; Bayram et al., 2010), conhecidas como aleloquímicos, que são voláteis utilizados na comunicação interespecífica.

Estas substâncias servem como proteção ao ovo, já que ele fica exposto a parasitoides, predadores e a condições climáticas adversas (Blum and Hilker, 2002; Hilker and Fatouros, 2014). E podem servir como cairomônios pelos parasitoides (Noldus, 1989; Milonas et al., 2009) sendo utilizados na atração à curta distância, além de serem importantes na localização, reconhecimento do ovo e consequente aumento das taxas de parasitismo (Nordlund et al., 1987; Lewis et al., 1982; Vet and Dicke, 1992; Boo and Yang, 2000; de Santis et al., 2008; Xu

et al., 2014; Mutyambai et al., 2015). Embora os cairomônios não sejam detectáveis a longa distância, são pistas químicas mais confiáveis e essenciais na localização e identificação do hospedeiro pelo parasitoide (Conti et al., 2003).

Para nossa pesquisa, selecionamos a espécie *T.pretiosum* e o hospedeiro *Helicoverpa zea*, pela eficiência desta vespa em parasitar ovos de diversas espécies de lepidopteros e em especial os da lagarta-da-espiga, praga que causa danos sérios a várias culturas (Farias et al., 2013; Manandhar and Wright, 2015). Verificamos que não existem trabalhos conclusivos considerando o sistema vespa-produto biológico-hospedeiro, levando em consideração nossa abordagem para *H. zea*.

Nesse estudo, investigamos se ovos cobertos com produtos comerciais ou suspensões de Bt interferem na preferência do *T.pretiosum*. Produtos comerciais, em sua composição, além da bactéria possuem componentes inertes como espalhantes, adjuvantes dentre outros ativos. Então a presença destes produtos nos ovos alteraria a preferência do parasitoide?

Testamos a hipótese de que a presença de *B. thuringiensis* nos ovos de *H.zea* não altera na escolha de *T. pretiosum*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Criação do hospedeiro

Adultos do hospedeiro *H. zea* foram colocados em gaiolas especiais confeccionadas com tubos de PVC (30 cm de diâmetro e 20 cm de altura) para a multiplicação. Dentro de cada gaiola, foram inseridos guardanapos para a oviposição. Uma solução açucarada foi fornecida para a alimentação dos adultos. Após quatro dias, os guardanapos com os ovos foram retirados e colocados em sacos plásticos e armazenados em sala com temperatura controlada ( $25 \pm 2$  °C). Após 48 horas, as larvas eclodidas foram transferidas individualmente para copos plásticos de 50 mL contendo dieta artificial. A lagarta se desenvolveu nos copos até a fase adulta. Em seguida, os adultos foram transferidos para a gaiola, dando continuidade ao ciclo de criação (Vilela et al., 2014).

### 2.2. Cultivo dos isolados bacterianos e estimativa da CL 50

Foram utilizados os isolados de *Bacillus thuringiensis*, (HD 1), var. *kurstaki* e (HD 11), var. *aizawai*, pertencentes a coleção biológica de *Bacillus* spp. da Embrapa Milho e Sorgo, além dos produtos comerciais formulados, Agree<sup>®</sup> (25.000 µL/mg de potência, var. *aizawai* GC 91), fabricado por CERTIS USA, LLC e DiPel<sup>®</sup> WP (25.000 IU/mg), var. *kurstaki* (linhagem HD-1), fabricado por Abbott Laboratories.

A multiplicação dos isolados foi realizada em meio LB - Luria-Bertani (extrato de levedura, peptona, cloreto de sódio, ágar e água destilada) acrescidos dos sais MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> e MnSO<sub>4</sub> (Valicente and Barreto, 2003), durante 72 horas a 28 °C. Após esta etapa, as colônias foram removidas das placas com auxílio de espátula e transferidas para tubos plásticos, contendo 10 mL de água destilada estéril. Em seguida, foi feita a contagem de esporos.

Para a contagem de esporos, diluições seriadas foram realizadas na proporção de 1ml da bactéria para 9 ml de água destilada. Este procedimento foi realizado para os formulados comerciais e para as cepas.

### 2.3. Patogenicidade à *H. zea*

Como teste preliminar, foram preparadas cinco suspensões com concentrações variadas de cada isolado HD1 ( $1,42 \times 10^5$ ;  $1,42 \times 10^6$ ;  $1,42 \times 10^7$ ;  $1,42 \times 10^8$ ;  $1,42 \times 10^9$  esporos/ml), HD11 ( $1,34 \times 10^5$ ;  $1,34 \times 10^6$ ;  $1,34 \times 10^7$ ;  $1,34 \times 10^8$ ;  $1,34 \times 10^9$  esporos/ml) e dos produtos comerciais Dipel ( $2,64 \times 10^5$ ;  $2,64 \times 10^6$ ;  $2,64 \times 10^7$ ;  $2,64 \times 10^8$ ;  $2,64 \times 10^9$  esporos/ml) e Agree ( $1,18 \times 10^5$ ;  $1,18 \times 10^6$ ;  $1,18 \times 10^7$ ;  $1,18 \times 10^8$ ;  $1,18 \times 10^9$  esporos/ml). Para a montagem dos bioensaios foram utilizados cubos de dieta artificial à base de feijão branco, gérmen de trigo e farelo de soja (modificada de Greene et al., 1976) com aproximadamente  $1 \text{ cm}^3$ , os quais foram colocados individualmente em copos plásticos de 50 ml.

Em seguida, foram pipetados 165  $\mu\text{L}$  (microlitros) das suspensões de cada concentração sobre os cubos de dieta, que foram deixados à temperatura ambiente até que todo o excesso de líquido secasse. Posteriormente, lagartas de três dias de idade foram colocadas nos copos, que foram tampados e levados para sala mantida a ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), com umidade relativa do ar a ( $70 \pm 2\%$ ) e fotofase de 14 h. Foram realizadas 24 repetições para cada concentração de cada isolado. Para o tratamento controle, a dieta foi banhada com água destilada acrescida do espalhante adesivo Tween<sup>®</sup>, usado também nos isolados e formulados.

As avaliações foram realizadas depois de três dias, sendo que foram consideradas mortas as lagartas que se tornaram imóveis, de cor preta e de aparência ressecada (sintoma típico de lagartas mortas por *B. thuringiensis*).

Os dados foram plotados em gráficos e as curvas obtidas foram utilizadas para estimar a concentração letal de 50% dos indivíduos testados (CL50). O uso de modelos lineares generalizados com erros do tipo binomial é justificado por permitir utilizar o teste considerando variância binomial não constante (Craley, 2013).

Apesar de os produtos comerciais apresentarem a recomendação do fabricante, foram feitos os mesmos testes de mortalidade e estimativa da CL 50 que os realizados com as cepas.

### 2.4. Parasitoides

Os indivíduos de *T. pretiosum* foram provenientes de ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), adquiridos da empresa Koppert Biological Systems e mantidos em condições de temperatura e umidade controladas até o início do experimento.

A sexagem dos parasitoides foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópio e um pincel fino. Separando machos e fêmeas pela morfologia das antenas (Voegelé et al., 1975).

#### 2.5. *Preparo das cartelas com ovos de H. zea a serem oferecidos aos parasitoides*

Cartelas de 4x4 cm com 60 sessenta ovos de *H. zea* (< 24h de idade) foram preparadas para os ensaios com o auxílio de microscópio estereoscópio (50x) e de um pincel fino. As cartelas foram preparadas da seguinte forma: As mariposas realizavam a oviposição em guardanapos macios, onde os mesmos foram retirados, recortados no tamanho padronizado (4x4 cm) e contado o número de ovos, eliminando os ovos em excesso cuidadosamente a fim de conter um total de 60 ovos por cartela. Este procedimento foi realizado, com o objetivo de diminuir possível interferência nos ovos, como eliminação das escamas ou substâncias depositadas pela mariposa no momento da oviposição. Dessa forma os ovos foram oferecidos ao parasitoide o mais próximo da realidade, ou seja, com o mínimo de manipulação.

Em seguida as cartelas com os ovos foram imersas por cinco segundos na solução de Bt, onde posteriormente foram deixados a ser secos ao ar até que o líquido secasse completamente. Para o tratamento controle, as cartelas foram mergulhadas em água destilada seguindo a mesma metodologia dos isolados e produtos comercial. As soluções foram preparadas no dia da exposição. Foram utilizadas para banhar os ovos oferecidos ao parasitoide a CL 50 encontrada para os isolados e formulados realizados com as lagartas no teste preliminar descrito no item 2.2.

#### 2.6. *Resposta olfativa de T. pretiosum a ovos tratados com cepas e formulados de Bt*

Um teste em branco foi realizado com o objetivo de avaliar se os compostos responsáveis pelo arrestamento dos parasitoides aos ovos de *H. zea* são provenientes das substâncias depositadas sobre eles pelas mariposas no momento da oviposição ou pelos odores dos tratamentos submetidos a eles (cepas e formulados). Ou seja, neste teste avaliou se o *T. pretiosum* localiza ovos mesmo na ausência da planta hospedeira. Para tanto, foi utilizado um olfatômetro em “Y” confeccionado em vidro (braços de 20 cm de comprimento e diâmetro interno de 3,5 cm), com fluxômetro para ar comprimido em cada um dos braços ajustado para vazão de ar de 2,5 L/min. Antes de entrar no olfatômetro, o ar introduzido por uma bomba de vácuo passava por um filtro de carvão ativado e era borbulhado em água para umidificação.

Em cada um dos braços do olfatômetro foi colocada uma cartela com os ovos sustentada por uma placa de Petri esterilizada abaixo, no outro braço havia apenas ar.

Anteriormente ao teste, as fêmeas foram alimentadas com uma gotícula de mel durante 30 minutos. As fêmeas do parasitoide foram individualmente colocadas no interior do olfatômetro com auxílio de um pincel fino. Cada observação teve duração de 600 segundos, sendo avaliada a escolha do odor que a fêmea optou. Foi considerada escolha, a vespa que passou pelo limiar de um dos braços do olfatômetro e permaneceu no mesmo durante 20 s. Cada vespa foi utilizada uma vez. As fêmeas que não se movimentaram ou não atingiram um dos braços em 300 segundos, foram classificadas como “sem resposta” e descartadas.

Para cada par de fonte de odor, foram testadas 20 fêmeas adultas com menos de 24 horas de vida. A cada repetição, a posição da fonte de odor foi modificada e o olfatômetro rotacionado aleatoriamente para eliminar efeitos da posição da fonte sobre a escolha da fêmea. Os testes foram realizados em mais de um dia. A cada repetição, todo o sistema foi desmontado para a lavagem cuidadosa com água.

A atração de *T. pretiosum* aos ovos de *H. zea* com os diferentes tratamentos foi realizada contrastando todos os tratamentos (cepas e produtos comerciais) com a testemunha (ovos sem Bt, banhados com água destilada). O procedimento foi o mesmo adotado no teste em branco.

Os tratamentos foram organizados da seguinte maneira, no teste de preferência: T1 - ovos vs. Ar (Teste em branco); T2 – ovos + Agree® vs. água destilada; T3 – ovos + Dipel® vs. Ovos + água; T4 – ovos + Cepa HD1 vs. Ovos + água; T5 – ovos + Cepa HD11 vs. Ovos + água.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 20 vespas e 3 repetições (vinte liberações foram realizadas a cada repetição) para cada tratamento, totalizando 300 observações com resposta.

### 2.7. Análise dos dados

Foi realizado o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ( $p < 0,05$ ) para avaliar o arrestamento das vespas para o braço com ovos ou com ar. Em seguida os tratamentos (ovos + Dipel; ovos + Agree; ovos + cepa HD1; ovos + cepa HD11) foram comparados com ovos limpos.

Usando modelo linear generalizado (GLM) com distribuição binomial foram elaborados contrastes para avaliar os tratamentos buscando responder as perguntas: o tratamento em

branco foi igual a cada um dos demais tratamentos? As cepas (HD1 e HD11 foram iguais aos formulados (Agree<sup>®</sup> e Dipel<sup>®</sup>) ? A cepa HD1 foi igual a HD11? O formulado Agree<sup>®</sup> foi igual ao Dipel<sup>®</sup>? As análises dos dados foram realizadas utilizando o ambiente estatístico R para análises (R Development Core Team. R: 2011).

### 3. Resultados

#### 3.1. Efeito das cepas e formulados sobre *H. zea*

A concentração requerida para ocasionar a mortalidade de 50% da população de *H. zea*, para os produtos comerciais Agree<sup>®</sup>, Dipel<sup>®</sup> e as cepas HD 1 e HD 11 foram,  $1,18 \times 10^7$ ,  $2,64 \times 10^8$ ,  $1,42 \times 10^6$  e  $1,34 \times 10^8$  esporos/mL, respectivamente (Figura 1).

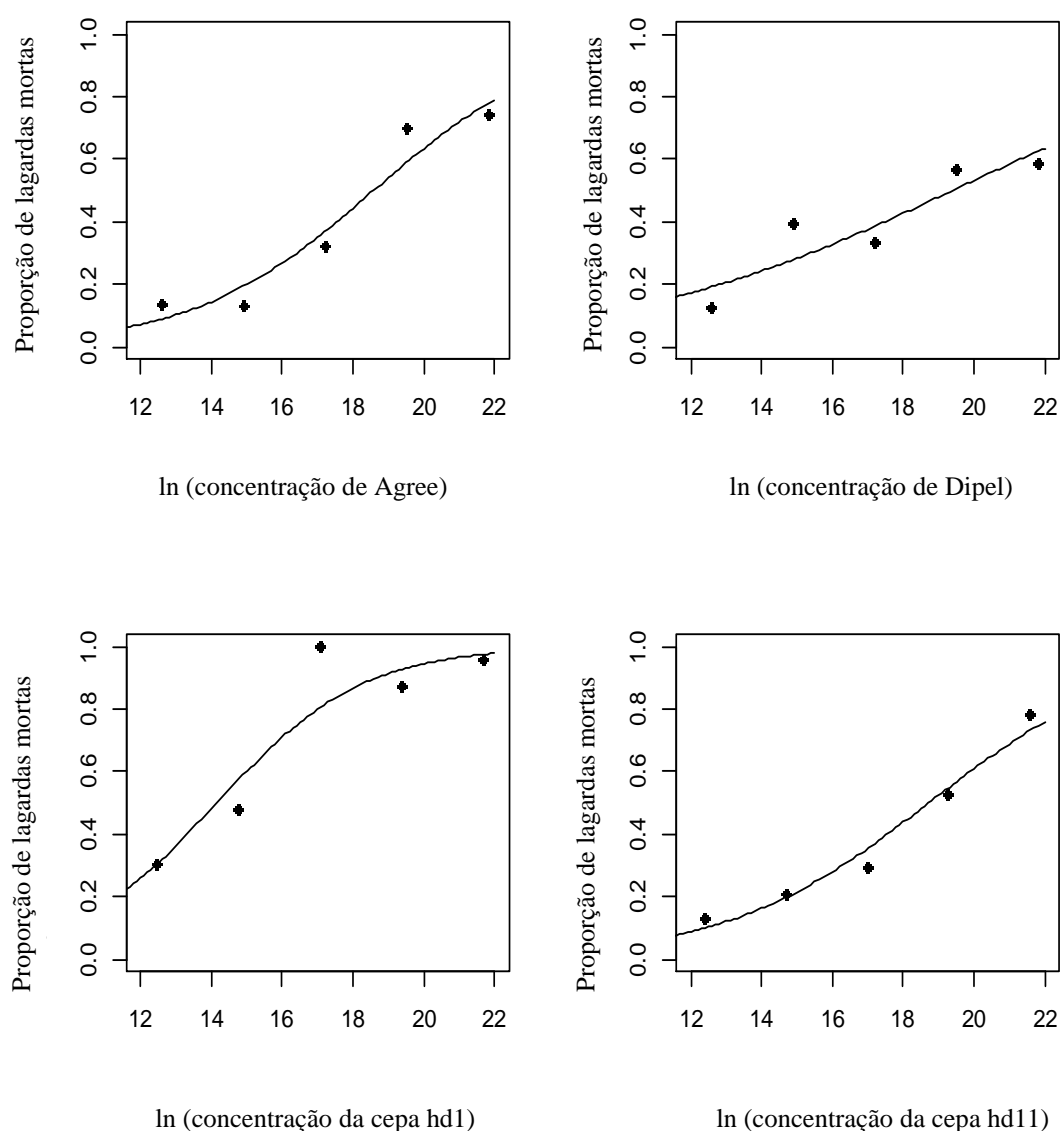


Figura 1. Proporção de larvas mortas de *Helicoverpa zea* expostas a concentrações de *Bacillus thuringiensis* em forma de Agree<sup>®</sup>, Dipel<sup>®</sup>, HD1, ou HD11. A concentração letal foi estimada a partir do modelo ajustado para pontos experimentais observados. Sete Lagoas, MG, Brasil (Sep/2015).

### 3.2. Comportamento das vespas no olfatômetro

As fêmeas de *T. pretiosum* localizaram ovos de *H. zea* usando os odores liberados pelo mesmo ( $\chi^2 = 7,2$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,01$ ;  $\chi^2 = 9,8$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,01$  e  $\chi^2 = 9,8$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,01$ ). Considerando as três repetições, 16, 17 e 17 vespas, foram em direção ao braço do olfatômetro onde continham os ovos, indicando que o parasitoide consegue localizar os ovos mesmo na ausência da planta, a curtas distâncias (Figura 2).

A proporção de *T. pretiosum* que preferiram ovos limpos em relação aos demais tratamentos foi significativamente diferente ( $\chi^2 = 0,88$ ;  $df = 10$ ;  $p < 0,001$ ). Entretanto, o mesmo não ocorreu na comparação entre os demais tratamentos. As cepas foram estatisticamente iguais aos produtos comerciais ( $\chi^2 = 5,65$ ;  $df = 10$ ;  $p = 0,156$ ), na comparação entre cepas ( $\chi^2 = 8,95$ ;  $df = 10$ ;  $p = 0,463$ ) e produtos comerciais ( $\chi^2 = 9,96$ ;  $df = 10$ ;  $p = 0,556$ ).

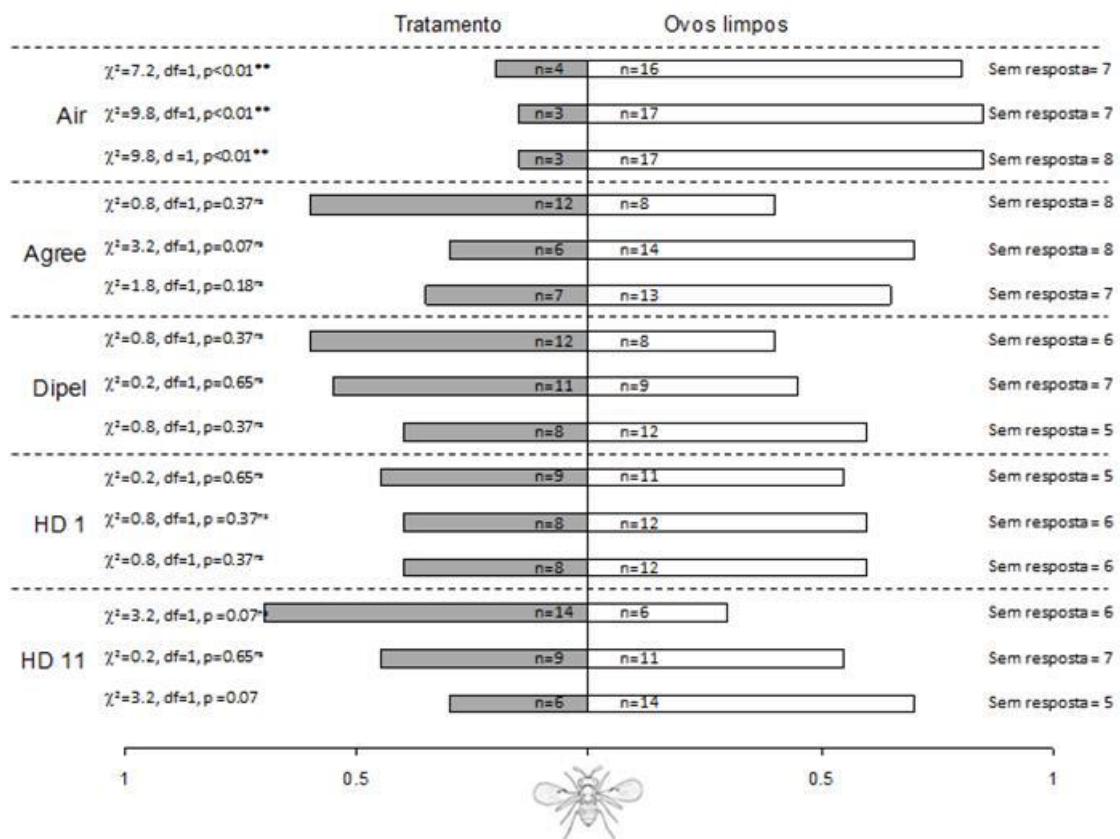


Figura 2. Resposta de fêmeas de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) no olfatômetro em Y. Ar (controle), Agree®, Dipel®, HD 1, ou HD 11 contra ovos limpos de *Helicoverpa zea*. Cada barra representa um único experimento replicado envolvendo 20 libertações de vespas com resposta (teste do qui-quadrado, \*\*  $p < 0,01$ , veja o texto para mais explicações). Sete Lagoas, MG, Brasil (Dec/2015).

#### 4. Discussão

O produto comercial Dipel® apresentou maior valor de CL50, indicando que este formulado foi o menos danoso para a *H. zea* na fase de larva. Já a cepa HD 1 apresentou menor valor de CL 50 dos tratamentos testados, mostrando-se mais tóxico a lagarta, dentre os tratamentos avaliados.

Embora o Dipel® e a cepa HD1 sejam constituídos da mesma subespécie de Bt (*kurstaki*), estes apresentaram toxicidade e conseqüente mortalidade diferentes. Acreditamos que seja pelo fato de a cepa fornecida à lagarta nos bioensaios é a forma mais pura da bactéria, enquanto o produto comercial é composto por adjuvantes e espalhantes, o que pode interferir, em alguma extensão, na toxicidade.

No entanto, na comparação entre o Agree® e a cepa HD11 o mesmo não foi observado. O produto comercial apresentou menor valor de CL 50, mostrando-se mais tóxico para a larva de *H. zea* do que a cepa pura, apesar de ambos serem compostos pela mesma subespécie (*aizawai*). Isso pode ter ocorrido devido ao Agree® apresentar, em sua formulação, coloração e odor muito evidentes, duas características notáveis durante a manipulação do produto, levando-nos a acreditar que, além da toxicidade causada pela bactéria, os produtos acrescentados na formulação do produto podem ter causado toxicidade nas larvas, aumentando a mortalidade neste tratamento.

Na comparação entre cepas, a HD1(*kurstaki*) se mostrou mais tóxica para as larvas da lagarta. Isso corrobora com o fato de que var. *aizawai* (HD11) é mais tóxica para outras espécies de lepidópteros.

O teste em branco no olfatômetro sugere fortemente que as vespas fêmeas de *T. pretiosum* são capazes de localizar os ovos de *H. zea*, mesmo na ausência da planta hospedeira. Isso nos mostra que os parasitoides, além de utilizarem os compostos provenientes da planta e de feromônio sexual, também percebem os aleloquímicos depositados nos ovos pelas mariposas (Noldus and van Lenteren 1985, Nordlund et al. 1987, Gazit et al. 1996).

Os resultados apresentados mostram que fêmeas de *T. pretiosum* perceberam e localizam seu hospedeiro sem a presença da planta, levando-nos a sugerir que este parasitoide consegue encontrar os ovos a curtas distâncias, detectando a localização do seu hospedeiro no interior da planta, por exemplo. Com isso, evidenciamos a importância, para os parasitoides, das substâncias químicas específicas depositadas nos ovos pela mariposa, que atuam como

caiomônios. Pois estas substâncias permitem ao parasitoide restringir sua área de busca, aumentando a chance de encontrá-los e do sucesso reprodutivo (Morrison et al., 1980).

Hospedeiros sésseis, tais como ovos, liberam poucos compostos voláteis (Vinson, 1984). Portanto, as escamas das asas de mariposas são as principais fontes de compostos que funcionam como aleloquímicos provenientes de substâncias depositadas sobre ou próximo aos ovos no momento da oviposição, ou utilizadas para fixá-los ao substrato. Estas substâncias podem atuar na atração à curta distância e/ou durante o contato (Shu and Jones 1989). Estudos relatam que as escamas possuem compostos que atuam aumentando a intensificação do comportamento de busca pelo hospedeiro e aumentando o parasitismo (Bin et al. 1993; Boo and Yang, 2000).

Resposta positiva também foi observada por Carneiro et al. (2006), ao verificarem que o parasitoide de ovos, *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae) foi capaz de localizar ovos *S. frugiperda*, na ausência da planta hospedeira, concluindo que este himenóptero também responde a substâncias voláteis presentes nos ovos da praga.

Nos bioensaios realizados com as duas cepas de Bt e com os produtos comerciais, observou-se que o *T. pretiosum* conseguiu localizar os ovos mesmo cobertos com as soluções de Bt. E além de conseguirem perceber seu hospedeiro, sua preferência a estes ovos não foi alterada na comparação com o controle. Portanto, nossa hipótese de que a presença de *B. thuringiensis* em ovos de *H. zea* não altera na preferência de *T. pretiosum* foi aceita.

Os compostos depositados nos ovos pelas mariposas são os principais responsáveis pela atração dos parasitoides em direção ao seu hospedeiro (Jones et al., 1973). Nossos resultados mostram que a presença dos produtos comerciais e das cepas de Bt sobre os ovos não prejudicou a atratividade dos ovos.

Carneiro et al. (2006), entretanto, observaram ausência de atratividade de dois parasitoides aos ovos de *S. frugiperda* quando lavados com hexano (um hidrocarboneto alcano). Indicando que os compostos depositados pela mariposa no momento da oviposição são solubilizados por esta substância, dificultando a localização dos mesmos pelas vespas. Assim, percebe-se que os produtos testados em nosso estudo não desempenham mesma função que o hexano, não camuflando ou solubilizando as substâncias presentes na superfície dos ovos responsáveis pela atratividade dos parasitoides.

Com este estudo, observamos que o uso de Bt pode ser combinado com o uso de *T. pretiosum* para o manejo integrado de *H. zea* sem prejuízo para o parasitoide. Amaro et al.

(2015) também encontraram resultados positivos de compatibilidade entre esses dois agentes de controle biológico. O parasitismo de ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) pulverizados com dois bioinseticidas a base de Bt, Dipel e Agree, foram semelhantes ao controle sem Bt, concluindo que a bactéria não afetou o desempenho dos parasitoides.

Azizoglu et al. (2015) concluíram que a cepa de *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD1) misturada a mel puro e oferecidas ao parasitoide não reduziram a performance do parasitismo nem a longevidade de adultos de *Trichogramma evanescens*.

Acreditamos que seja pelo fato de o Bt possui modo de ação específico, agindo diretamente no intestino médio alcalino de insetos alvo (Tabashnik et al., 2015). Portanto, se espera que o mesmo não interfira no comportamento de organismos não alvo, como vespas parasitoides.

Potrich et al. (2009) ao pulverizar dois fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, nos ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) observaram não repelência do *T. pretiosum*.

No entanto, exemplos de incompatibilidade são mostrados em trabalhos com produtos organosintéticos por causarem um elevado grau de dano nos processos fisiológicos e comportamentais da vespa, podem afetar a longevidade, fertilidade e razão sexual da progênie (Wang et al., 2012; Costa et al., 2014; Wang et al., 2014; Delpuech et al., 2015; Khan et al., 2015; Li et al., 2015). Além disso, a detecção dos ovos a curto alcance pode ser alterada pelos agroquímicos, resultando no decréscimo do parasitismo. Os parasitoides, muitas vezes, dependem de pistas químicas ou de cores, onde se acredita que os produtos químicos podem alterar estas pistas (Vet and Dicke, 1992; Wackers and Lewis, 1999).

Assim, conclui-se que o *T.pretiosum* é capaz de encontrar os ovos de *H. zea* a curtas distâncias. O fato de os ovos estarem banhados com as cepas de Bt HD1 e HD11 ou com os produtos comerciais Dipel® e Agree®, não altera a capacidade de a vespa os localizar. Portanto, ambos agentes de controle biológico são compatíveis e podem ser usados em conjunto sem interferência negativa de um sobre o outro.

Através deste estudo, foi esclarecida a questão acerca do uso conjunto de dois agentes de controle biológico no manejo de *H. zea*. No entanto, são necessários estudos que avaliem se a vespa apresenta o mesmo comportamento ao entrar em contato direto com os ovos, bem como avaliar parâmetros como percentual de emergência e sobrevivência dos parasitoides

descendentes oriundos dos ovos submetidos aos tratamentos com as cepas e produtos comerciais propostos para estudo nesta pesquisa.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ/PPGCA), pelo suporte científico á estudante. À Embrapa Milho e Sorgo pela estrutura fornecida para a condução do experimento. À Fapemig e à Capes, pelo apoio financeiro. À Koppert Biological Systems, na pessoa da Sra. Sandra Magro, pela concessão dos parasitoides.

## Referências Bibliográficas

- Alix, A., Cortesero, A.M., Nénon, J.P., Anger, J.P., 2001. Selectivity assessment of chlorfenvinphos reevaluated by including physiological and behavioral effects on an important beneficial insect. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2530–2536.
- Amaro, J.T., Bueno, A.F., Poari-Fernandes, A.F., Neves, P.M.O.J., 2015. Selectivity of Organic Products to *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Neotropical Entomology* 44, 489–497.
- Azizoglu, U., Yılmaz, S., Ayvaz, A., Karabörklü, S., 2015. Effects of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 spore-crystal mixture on the adults of egg parasitoid *Trichogramma evanescens* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 29, 653–658.
- Bari, M.N., Jahan, M., Islam, K.S., 2015. Effects of Temperature on the Life Table Parameters of *Trichogramma zahiri* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), an Egg Parasitoid of *Dicladispa armigera* (Chrysomelidae: Coleoptera). *Environmental Entomology* 44, 368–378.
- Costa, M.A., Moscardini, V.F., Gontijo, P.C., Carvalho, G.A., Oliveira, R.L., Oliveira, H.N., 2014. Sublethal and transgenerational effects of insecticides in developing *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ecotoxicology* 23, 1399–1408.
- Conti, E., Salerno, G., Bayram, A., Bin, F., 2003. Strategies involved in host location of *Telenomus busseolae* and *Trichogramma turkestanica*, egg parasitoids of *Sesamia nonagrioides*. *Journal of Insect Science* 3, 33.
- Copping, L.G., Menn, J.J. 2000. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, v.56, n.5, p.651-676.
- Crawley, M.J. (2013) *The R book*. Second Editon. Wiley: 975 p.
- De Maagd, R.A.; Bravo, A.; Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17, 193–199.
- De Santis, F., Conti, E., Romani, R., Salerno, G., Parillo, F., Bin, F., 2008. Colleterial glands of *Sesamia nonagrioides* as a source of the host-recognition kairomone for the egg parasitoid *Telenomus busseolae*. *Physiological Entomology* 33, 7–16.
- Delpuech, J.M., Froment, B., Fouillet, P., Pompanon, F., Janillon, S., Boulétreau, M., 1998. Inhibition of sex pheromone communications of *Trichogramma brassicae* (Hymenoptera) by the insecticide chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 1107–1113.
- Delpuech, J.M., Bussod, S., Amar, A., 2015. The sublethal effects of endosulfan on the circadian rhythms and locomotor activity of two sympatric parasitoid species. *Chemosphere* 132, 200–205.

- Farias, J.R., Costa, E.C., Guedes, J.V.C., Arbage, A.P., Neto, A.B., Bigolin, M., Pinto, F.F., 2013. Managing the sugarcane borer , *Diatraea saccharalis*, and corn earworm, *Helicoverpa zea*, using Bt corn and insecticide treatments. *Journal of Insect Science* 13, 1–10.
- Gardner, J., Hoffmann, M.P., Pitcher, S.A., Harper, J.K., 2011. Integrating insecticides and *Trichogramma ostrinae* to control European corn borer in sweet corn: economic analysis. *Biol. Control* 56, 9–16.
- Gazit, Y., Lewis, W.J., Tumlinson, J.H., 1996. Arrestment of *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae) by a kairomone associated with eggs of its host, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. Control* 6, 283-290.
- Glare, T.R., O’Callaghan, M., 2000. *Bacillus thuringiensis* biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley & Sons, 350 p.
- Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* 69, 487-488.
- Haseeb, M., Amano, H., 2002. Effects of contact, oral and persistent toxicity of selected pesticides on *Cotesia plutellae* (Hym., Braconidae), a potential parasitoid of *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae) *Journal of Applied Entomology* 126, 8–13.
- Hilker, M., Kobs, C., Varama, M., Schrank, K., 2002. Insect egg deposition induces *Pinus sylvestris* to attract egg parasitoids. *J Exp Biol.* 205, 455–461.
- Hilker, M., Fatouros, N.E., 2014. Plant Responses to Insect Egg Deposition. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 493–515.
- Jones, R.L., Lewis, W.J., Beroza, Bierl, M.B.A., Sparks, A.N., 1973. Host - seeking stimulants (kairomones) for the egg parasite *Trichogramma evanescens*. *Environ. Entomol.* 2, 593-596.
- Joung, K., Cote, J.C., 2000. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Technical Bulletin, Horticultural R & D Centre Research Branch Saint-Jean-sur-Richelieu, Quebec, Canada* 29, 116.
- Khan, M.A., Khan, H., Ruberson, J.R., 2015. Lethal and behavioral effects of selected novel pesticides on adults of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Pest. Manag. Sci.* 71, 1640–1648.
- Krechemer, F.S., Foerster, L.A., 2015. Temperature Effects on the Development and Reproduction of Three *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Species Reared on *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) Eggs. *Journal of Insect Science* 15, 90p.
- Ksentini, I., Jardak, T., Zeghal, N., 2010. *Bacillus thuringiensis*, deltamethrin and spinosad side-effects on three *Trichogramma* species. *Bulletin of Insectology* 63, 31-37.
- Lewis, W.J., Nordlund, D.A., Gueldner, R.C., Teal, P.E.A., Tumlinson, J. H., 1982. Kairomones and their use for management of entomophagous insects. XIII. Kairomonal

activity for *Trichogramma* spp. of abdominal tips, excretion, and a synthetic sex pheromone blend of *Heliothis zea* (Boddie) moths. *J. Chem. Ecol.* 8, 1323–1331.

Li, L.Y., 1994. Worldwide Use of *Trichogramma* for Biological Control on Different Crops: A Survey. Reference to a chapter in an edited book: *Biological Control with Egg Parasitoids*, in: Wajnberg, E., Hassan, S.A. (Eds.), CAB International, Wallingford, U.K. pp. 37-53.

Li, W., Zhang, P., Zhang, J., Lina, W., Lua, Y., Gaob, Y., 2015. Acute and sublethal effects of neonicotinoids and pymetrozine on an important egg parasitoid, *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biocontrol Science and Technology* 25, 121-131.

Manandhar, R., Wright, M.G., 2015. Enhancing biological control of corn earworm, *Helicoverpa zea* and thrips through habitat management and inundative release of *Trichogramma pretiosum* in corn cropping systems. *Biological Control* 89, 84–90.

Morrison, G., Lewis, W.J., Norlund, D.A., 1980. Spatial variations in *Heliothis zea* eggs density and the intensity of parasitism by *Trichogramma* spp.: an experimental analysis. *Environ Entomol* 9, 79-85.

Milonas, P.G., Mazomenos, B.E., Konstantopoulou, M.A., 2009. Kairomonal effect of sex pheromone components of two lepidopteran olive pests on *Trichogramma* wasps. *Insect Science* 16, 131-136.

Mutyambai, D.M., Bruce, T.J., Midega, C.A., Woodcock, C.M., Caulfield, J.C., Van Den, B.J., Pickett, J.A., Khan, Z.R., 2015. Responses of Parasitoids to Volatiles Induced by *Chilo partellus* Oviposition on Teosinte, a Wild Ancestor of Maize. *Journal of Chemical Ecology* 41, 323–329.

Noldus, L.P.J.J., van Lenteren, J.C., 1985. Kairomones for the egg parasite *Trichogramma evanescens* Westwood. Effect of volatile substances produced by two of its hosts, *Pieris brassicae* L. and *Mamestra brassicae* L. *J. Chem Ecol.* 11, 781-192.

Noldus, L.P.J.J., 1989. Semiochemicals, foraging behavior and quality of entomophagous insects for biological control. *J. Appl. Entomol.* 108, 425–451.

Nordlund, D.A., Strand, M.R., Lewis, W.J., Vinson, S.B., 1987. Role of kairomones from host accessory gland secretions in host recognition by *Telenomus remus* Nixon and *Trichogramma pretiosum* Riley with partial characterization. *Entomol. Exp. Appl.* 44, 37-44.

Norris, R.F., Caswell-Chen, E.P., Kogan, M., 2003. Pest, people and integrated pest management. In: Norris, R.F., Caswell-Chen, E.P., Kogan, M. (Ed.) *Concepts in integrated pest management*. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 2003. Chap 1, p.1-14.

Parra J.R.P., 2010. Mass rearing of egg parasitoids for biological control programs. In: Cõnsoli, F.L., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A (eds) *Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on Trichogramma*, 1st edn. Springer, Dordrecht, pp 267–292.

Potrich, M., Alves, L.F.A., Haas, J., Silva, E.R.L., Daros., A., Pietrowski, V., Neves, P.M.O.J., 2009. Seletividade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a

*Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Neotrop. entomol. 38, 822-826.

Potrich, M., Alves, L. F., Lozano, E., Roman, J. C., Pietrowski, V., Neves, P.M.O.J., 2015. Interactions between *Beauveria bassiana* and *Trichogramma pretiosum* under laboratory conditions. Entomologia Experimentalis et Applicata 154, 213–221.

Raymond, B., Wright, D.J., Crickmore, N., Bonsall, M.B., 2013. The impact of strain diversity and mixed infections on the evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Proc R Soc B 280, 20131497.

Rutledge, C.E., Widenmann, R.N., 1999. Habitat preferences of three congeneric braconid parasitoids: Implications for host-range testing in biological control. Biol. Control 16, 144-154.

Saber, M., Hejazi, M.J., Kamali, K., Moharramipour, S., 2005. Lethal and sublethal effects of fenitrothion and deltamethrin residues on the egg parasitoid *Trissolcus grandis* (Hymenoptera: Scelionidae). J. Econ. Entomol. 98, 35–40.

Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T., Christou, P., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. Plant Biotech J. 9, 283300.

Sansinenea, E., Ortiz, A., 2014. Melanin: a photoprotection for *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Biotechnology Letters 37, 483–490.

Sattar, S., Farmanullah., Saljoqi, A.U.R., Arif, M., Sattar, H., Qazi, J.I., 2011. Toxicity of some new insecticides against *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) under laboratory and extended laboratory conditions. Pakistan Journal of Zoology 43, 1117–1125.

Sayed, S.M., Elsayed, G., Mahmoud, S.F., Elzahrany, O.M., 2015. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* and Indigenous *Trichogramma turkistanica* for Controlling Lepidopterous Pests on Taify Pomegranate Fruits. African Entomology 23, 443-450.

Shu, S., Jones, R.L., 1989. Kinetic effect of a kairomone in moth scales of the European corn borer on *Trichogramma nubilale* Ertle & Davis (Hymenoptera: Trichogrammatidae). J Insect Behav. 2, 123-131.

Smith, S.M., 1996. Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and potential of their use. Annual Review of Entomology 41, 375–406.

Song, L.W., Wen, X.Y., Zang, L.S., Ruan, C.C., Shi, S.S., Shao, X.W., Zhang, F., 2015. Parasitism and Suitability of Different Egg Ages of the *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Tortricidae) for Three Indigenous *Trichogramma* Species. Journal of Economic Entomology 108, 933–939.

- Souza, J.R., Carvalho, G.A., Moura, A.P., Couto, M.H.G., Maia, J.B., 2014. Toxicity of some insecticides used in maize crop on *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) immature stages. *Chilean journal of agricultural research* 74, 234–239.
- Stapel, J.O., Cortesero, A.M., Lewis, W.J., 2000. Disruptive sublethal effects of insecticides on biological control: altered foraging ability and life span of a parasitoid after feeding on extra floral nectar of cotton treated with systemic insecticides. *Biol. Control* 17, 243–49.
- Stark, J.D., Desneux, N., Biondi, A., Zappala, L., 2013. Do Biopesticides Affect the Demographic Traits of a Parasitoid Wasp and Its Biocontrol Services through Sublethal Effects? *PLoS ONE* 8, 76548.
- Tabashnik, B.E., Zhang, M., Fabrick, J.A., Wu, Y., Gao, M., Huang, F., Wei, J., Zhang, J., Yelich, A., Unnithan, G.C., Bravo, A., Soberón, M., Carrière, Y., Li, X., 2015. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Nature* 5, 15107.
- Vilela, M., Mendes, S.M., Valicente, F.H., Carvalho, S.S.S., Santos, A.E., Santos, C.A., Araújo, O.G., Barbosa, T.A.N., Carvalho, E.A.R., Costa, V.H.D., 2014. Metodologia para Criação e Manutenção de *Helicoverpa armigera* em Laboratório. Circular técnica, ISSN 1679-1150.
- Valicente, F.H., Barreto, M.R., 2003. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 32, 639-644.
- Valicente, F.H., Mourão, A.H.C., 2008. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner) based biopesticide. *Neotropical entomology* 37, 702–708.
- Vinson, S.B., 1984. Parasitoid-host relationships. In Bell W.J. & Cardé R.T. (eds): *Chemical Ecology of Insects*. Chapman and Hall, London, pp. 205–233.
- Vinson, S.B., 1998. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. *Biological Control* 11, 79–96.
- Vet, L.E.M., Alphen, J.J.M.van, 1985. A comparative functional approach to the host detection behavior of parasitic wasps. 1. A qualitative study on Eucilidae and Alysiinae. *Oikos* 44, 476-486.
- Vet, L.E.M, Dicke, M., 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 141–72.
- Vianna, U.R., Pratisoli, D., Zanuncio, J.C., Lima, E.R., Brunner, J., Pereira, F.F., Serrão, J.E., 2009. Insecticide toxicity to *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) females and effect on descendant generation. *Ecotoxicology* 18, 180–186.

VoegelÈ, J., Cals-Usciati, L., Pihan, J.P, Daumal, J. 1975. Structure de líantenne femelle des Trichogrammes. Entomophaga 20, 61-169.

Xu, J., Huigens, M.E., Orr, D., Groot, A.T., 2014. Differential response of *Trichogramma* wasps to extreme sex pheromone types of the noctuid moth *Heliothis virescens*. Ecological Entomology 39, 627–636.

Wang, De-Sen., He, Y.R., Guo, X.L., Luo, Y.L., 2012. Acute toxicities and sublethal effects of some conventional insecticides on *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Journal of economic entomology 105, 1157–63.

Wang, Y., Wu, C., Cang, T., Yang, L., Yu, W., Zhao, X., Wang, Q. and Cai, L., 2014. Toxicity risk of insecticides to the insect egg parasitoid *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Pest. Manag. Sci. 70, 398–404.

Wackers, F.L., Lewis, W.J., 1999. A comparison of color, shape and pattern learning by the hymenopteran parasitoid *Microplitis croceipes*. J. Comp. Physiol. A 184, 387–93.

## ARTIGO 2

### O PARASITISMO DE *Trichogramma pretiosum* É ALTERADO PELA PRESENÇA DE *Bacillus thuringiensis* EM OVOS DE *Helicoverpa zea*?

Artigo escrito conforme as normas do periódico *Florida Entomologist Society*.

**RESUMO** - O uso conjunto de táticas de controle é um preceito fundamental do Manejo Integrado de Pragas. O parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum* e a bactéria *Bacillus thuringiensis* são exemplos de agentes de controle biológico usados, muitas vezes, simultaneamente no campo. No entanto, são escassas informações sobre a complementariedade ou antagonismo desses agentes de controle. Este trabalho teve como objetivo avaliar o parasitismo, emergência e sobrevivência de *T. pretiosum* em ovos de *Helicoverpa zea* tratados com cepas de Bt (HD1, Bt *kurstaki* e HD11, Bt *aizawai*) e com produtos comerciais de Bt (Agree<sup>®</sup> e Dipel<sup>®</sup>). Em teste de escolha realizado em placa de Petri, ovos de *H. zea* banhados com cepas e produtos comerciais foram oferecidos as fêmeas de *T. pretiosum*. Os ovos foram tratados com a CL50 dos produtos comerciais e cepas estimada para larvas de *H. zea*. Todos os tratamentos foram contrastados com a testemunha (ovos banhados com água destilada). A presença de Bt nos ovos não interferiu na escolha do *T. pretiosum*, não afetando o parasitismo e emergência do parasitoide. A sobrevivência também não foi alterada pelos tratamentos. Através deste estudo foi possível constatar a compatibilidade de uso conjunto do *T. pretiosum* e de Bt para o controle de *H. zea*. Este trabalho pode ser um ponto de partida para a realização de ensaios que avaliem a interferência de outros produtos à base de Bt sobre parâmetros como razão sexual, número de indivíduos/ovos e parasitismo diário de *Trichogramma* spp.

Palavras-chave: Preferência de oviposição; parasitoides de ovos; bioinseticidas; sobrevivência; compatibilidade; lagarta da espiga.

**IS *Trichogramma pretiosum* PARASITISM ALTERED BY THE PRESENCE OF *Bacillus thuringiensis* ON *Helicoverpa zea* EGGS?**

**ABSTRACT** - The joint use of control agents is a fundamental precept of Integrated Pest Management. The egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* and bacteria *Bacillus thuringiensis* are examples of biological control agents often used simultaneously in the field. However, there is little information on the complementarity or antagonism of these control tactics. This study aimed to evaluate the parasitism, emergence and survival of *T. pretiosum* in eggs of *Helicoverpa zea* treated with Bt strains (HD1, Bt *kurstaki* and HD11, Bt *aizawai*) and commercial Bt formulations (Agree® and Dipel®). In the choice test conducted in a petri dish, *H. zea* eggs bathed with strains and formulas were offered to *T. pretiosum* females. The eggs were treated with the LC50 of formulas and strains estimated for three-day-old *H. zea* larvae. All treatments were contrasted with the control (i.e. eggs bathed with deionized water). The presence of Bt on the eggs did not influence the choice of *T. pretiosum*, affect parasitism nor emergence of the parasitoid. Survival was also not affected by the treatments. These results suggest compatibility of joint use of parasitoids and Bt to control *H. zea*. This work was a starting point for conducting trials evaluating interference from other Bt based products on parameters such as sex ratio, number of individuals/eggs and daily parasitism of *Trichogramma* spp.

Key-words: Oviposition preference; egg parasitoids; biopesticides; survival; compatibility; corn earworm.

## Introdução

Parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* são os himenópteros mais estudados e utilizados em todo o mundo, devido ao tempo curto de seu ciclo, facilidade de criação massal e pela eficiência no controle de insetos praga (PARRA & ZUCHI, 2004), principalmente os da ordem lepidoptera (Mills & Kuhlmann, 2004).

Na América do Sul são conhecidas cerca de 38 espécies de *Trichogramma* (Querino & Zucchi, 2003). No Brasil, *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é a espécie com maior distribuição geográfica e é um exemplo do sucesso no controle de *Heliothis* spp. e de outras espécies (Smith, 1996). Esta vespa, além de apresentar ocorrência natural em diversos cultivos perturbados por pragas, encontra-se também disponível comercialmente para aquisição por produtores rurais, para a realização de liberações inundativas (Boo & Yang, 2000). No entanto, mesmo com toda sua eficiência, o uso isolado não tem sido suficiente para o controle de pragas, necessitando, portanto de tática de controle complementar (Lundgren *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2015).

Além dos parasitoides, microrganismos também são importantes agentes de controle biológico. O *Bacillus thuringiensis* (Bt), é considerado o principal entomopatógeno utilizado no controle de pragas (Melo *et al.*, 2014). O Bt é uma bactéria Gram-positiva naturalmente encontrada no solo, na superfície das folhas (Valicente & Barreto, 2003; Raymond *et al.*, 2010), ou mesmo dentro da planta (Monnerat *et al.*, 2009). Em condições de estresse, produz inclusões protéicas cristalinas ( $\delta$ -endotoxinas) conhecidas como proteínas Cry, que têm efeito inseticida sobre insetos pragas das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Orthoptera dentre outras (CRICKMORE, 1998; Xu *et al.*, 2004; Pazos & Salamanca, 2007; Van Frankenhuyzen, 2009). Atualmente, são mais de 700 toxinas Cry identificadas e nomeadas com relação às suas sequências (Crickmore *et al.*, 2016), além de disponíveis diversas formulações comerciais à base da bactéria para o uso no controle de pragas (Sanahuja *et al.*, 2011).

O modo de ação do Bt em espécies da ordem lepidoptera, ocorre da seguinte maneira, após a ingestão do Bt pelo inseto, os cristais são solubilizados em pH alcalino, liberando as protoxinas que em presença de enzimas digestivas, proteases, são convertidas em quatro ou mais polipeptídeos tóxicos ( $\delta$  -endotoxinas). Em seguida as proteínas se ligam aos receptores específicos do intestino médio formando poros na membrana, interferindo no balanço iônico e

osmótico aumentando a permeabilidade da membrana. O aumento na absorção de água causa lise das células do intestino médio, ocasionando em morte do inseto (Copping & Menn, 2000).

Estes dois agentes de controle biológico, *Trichogramma* e Bt, são utilizados conjuntamente com frequência (Hwang *et al.*, 2010; Ksentini *et al.*, 2010; AMARO, 2015; Sayed *et al.*, 2015) e se mostram métodos alternativos ao uso de produtos organo-sintéticos, além de serem usados como componentes de sistemas ambientais sustentáveis no Manejo Integrado de Pragas (MIP). No entanto, ainda são necessários estudos que consolidem a compatibilidade desses dois agentes de controle quando usadas simultaneamente.

Trabalhos com testes de seletividade de produtos organo-sintéticos sobre parasitoides são muito comuns (Momanyi *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Ko *et al.*, 2015). No entanto, existem poucos estudos sobre os efeitos de entomopatógenos sobre as vespas. Além de escassos, esses trabalhos, em sua grande maioria, avaliam apenas os efeitos letais e subletais de entomopatogenos e de extratos de plantas sobre os parasitoides (Garcia *et al.*, 2009; Poorjavand *et al.*, 2014; Azizoglu *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015; Potrich *et al.*, 2015).

No entanto, não se tem avaliado os possíveis efeitos sobre o comportamento das vespas frente a ovos banhados com Bt. Sendo assim, trabalhos como este são justificáveis, já que, na prática, ambos agentes de controle de pragas agrícolas são utilizados simultaneamente pelo produtor e que o uso de inseticidas associados às liberações desse parasitoide pode interferir no processo de localização, aceitação do hospedeiro e, conseqüentemente, em sua eficiência (Pinto & Parra, 2002).

Vespas parasitoides usam pistas de curto alcance emitidas pelos próprio hospedeiro. Estas pistas químicas (aleloquímicos) são deixadas sobre ou em volta dos ovos no momento da oviposição, e são oriundas de escamas, ou de substâncias utilizadas para fixar os ovos ao substrato (Bayram *et al.*, 2010). Estas podem servir como caimônios pelos parasitoides (Milonas *et al.*, 2009). Além de serem importantes na localização e reconhecimento do ovo, o que conseqüentemente proporciona aumento no parasitismo (de Santis *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2014; Mutyambai *et al.*, 2015).

O objetivo deste estudo foi o de avaliar o parasitismo, emergência e longevidade de *T. pretiosum* em ovos de *H. zea* tratados com cepas e produtos comerciais de *B. thuringiensis*. Testamos duas hipóteses nulas: A primeira foi que a presença de *B. thuringiensis* não altera a preferência de *T. pretiosum* em parasitar ovos de *H. zea*. A segunda hipótese foi a de que os

parâmetros biológicos dos descendentes de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *H. zea* tratados com diferentes cepas de Bt não serão alterados.

## Material e Métodos

Adultos de *H. zea* foram colocados em gaiolas confeccionadas com tubos de PVC (30 cm de diâmetro e 20 cm de altura) para a multiplicação. Dentro de cada gaiola foram inseridos guardanapos (33 x 33 cm) para a oviposição e dieta líquida (composta por 25 g de açúcar, 1 g ácido ascórbico, 1 g de glicose de milho e 1 L de água). Após quatro dias, os guardanapos com os ovos foram retirados, colocados em sacos plásticos e armazenados em sala com temperatura controlada ( $25 \pm 2$  °C). Após 48 horas, as larvas eclodidas foram transferidas individualmente para copos plásticos de 50 mL contendo dieta artificial a base de feijão branco, farelo de soja, leite em pó, ágar puro, germe de trigo, levedura de cerveja, ácido ascórbico (99%) e ácido sórbico (99%) (Grenne *et al.*, (1976) modificada). As lagartas se desenvolveram nos copos até a fase adulta. Em seguida os adultos foram transferidos para a gaiola onde ocorreu a continuidade do ciclo de criação (Vilela *et al.*, 2014).

Foram utilizados os isolados de *Bacillus thuringiensis*, (HD 1), var. *kurstaki* e (HD-11), var. *aizawai*, além dos produtos comerciais formulados, Agree<sup>®</sup> (25.000µl/mg de potência, var. *aizawai* GC 91), fabricado por CERTIS USA, LLC e DiPel<sup>®</sup> WP (25.000 IU/mg), var. *kurstaki* (linhagem HD-1), fabricado por Abbott Laboratories. A estimativa da CL 50 para as cepas e formulados foi realizada em trabalhos prévios ainda não publicados. A concentração requerida para ocasionar a mortalidade de 50% da população de *H. zea* para os formulados Agree<sup>®</sup>, Dipel<sup>®</sup> e as cepas HD 1 e HD 11 foram,  $1,18 \times 10^7$ ,  $2,64 \times 10^8$ ,  $1,42 \times 10^6$  e  $1,34 \times 10^8$  esporos/mL, respectivamente.

Os indivíduos de *T. pretiosum* foram provenientes de ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), adquiridos da empresa Koppert Biological Systems e mantidos em condições controladas até o início do experimento.

Cartelas de (3,0 x 0,5 cm) com 30 (trinta) ovos de *H. zea* (de aproximadamente 24h de idade) foram preparadas para os ensaios com o auxílio um microscópio estereoscópio (50x) e de um pincel fino. As cartelas foram preparadas da seguinte forma: As mariposas realizavam a oviposição em guardanapos macios, onde os mesmos foram retirados, recortados no tamanho padronizado (3,0 x 0,5 cm) e contados o número de ovos, eliminando os ovos em excesso cuidadosamente a fim de conter um total de 30 ovos por cartela.

Em seguida as cartelas com os ovos foram imersas por 5 (cinco) segundos na solução de Bt, onde posteriormente foram deixados secando ao ar até que o líquido evaporasse

completamente (adaptado de Souza et al., 2014). Para o tratamento controle, as cartelas foram mergulhadas em água deionizada, seguindo a mesma metodologia dos outros tratamentos. As soluções foram preparadas no dia da exposição. Foram utilizadas para banhar os ovos oferecidos ao parasitoide a CL 50 estimada para os isolados e formulados realizados com as lagartas no teste preliminar.

Para o teste de escolha duas cartelas com 30 ovos cada (3,0 x 0,5 cm), uma contendo ovos banhados com água destilada e outra com ovos banhados com o Bt, foram colocadas em uma placa de Petri de 90 x 15 mm. Os tratamentos foram combinados para o teste da seguinte forma: T1 – ovos + Agree<sup>®</sup> vs. controle; T2 – ovos + Dipel<sup>®</sup> vs. controle; T3 – ovos + Ceba HD1 vs. controle; T4 – ovos + Ceba HD11 vs. controle.

Para cada fêmea de *T. pretiosum* foram oferecidas duas cartelas com os devidos tratamentos, espaçadas a 10 mm entre si, possibilitando a livre escolha do parasitoide aos ovos. Uma gotícula de mel foi disponibilizada como alimento. Os ovos foram expostos ao parasitismo por um período de 24 horas. Após esse tempo, as duas cartelas de cada tratamento foram retiradas e condicionadas em tubos de vidro separados e vedados com plástico filme e mantidas em condições controladas de 25±1 °C; 70% UR e 12h de fotofase. As fêmeas parasitoides foram em seguida descartadas.

As avaliações foram realizadas diariamente até a morte dos indivíduos. Os parâmetros avaliados foram o número de ovos parasitados (i.e. ovos escuros), o número de indivíduos que emergiram e a longevidade dos descendentes (em dias). O número de ovos parasitados e de indivíduos emergidos foram expressos em porcentagem. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 20 repetições para cada um dos quatro tratamentos, totalizando 80 observações.

Nas análises de porcentagem de parasitismo de *T. pretiosum*, foi utilizado o cálculo proposto por Luckmann *et al.* (2014), em que a porcentagem de parasitismo em cada tratamento de Bt foi calculada pela equação  $POP_{trat} = (OP_{trat} / (OP_{trat} + OP_{test})) * 100$ . Onde,  $POP_{trat}$  = porcentagem de ovos parasitados no tratamento,  $OP_{trat}$  = número de ovos parasitados no tratamento e  $OP_{test}$  = número de ovos parasitados no controle. O percentual de emergência foi calculado pela equação  $Pe = (Te / To) * 100$ , em que  $Pe$  = Porcentagem de emergência,  $Te$  = Total de emergidos,  $To$  = Total de ovos parasitados. Os dados de porcentagem foram transformados usando a função Arco seno  $x/100$  na tentativa, atender a homogeneidade das variâncias, como pressuposições da ANOVA. Para análise de

sobrevivência, utilizou-se o procedimento descrito por Crawley (2013) para a distribuição de Kaplan-Meier. Todas as análises foram realizadas utilizando o ambiente estatístico R (R Development Core Team. R: 2011), tendo 5% como nível de significância.

## Resultados

Os tratamentos de ovos de *H. zea* com os formulados Agree<sup>®</sup>, Dipel<sup>®</sup> e as cepas HD1 e HD11 de *B. thuringiensis* não afetaram a porcentagem de parasitismo ( $F_{(3,76)}= 1,13$ ;  $p= 0,34$ ) e emergência ( $F_{7,100}= 1,43$ ;  $p= 0,20$ ) de *T. pretiosum* quando comparado ao controle (Fig. 1).

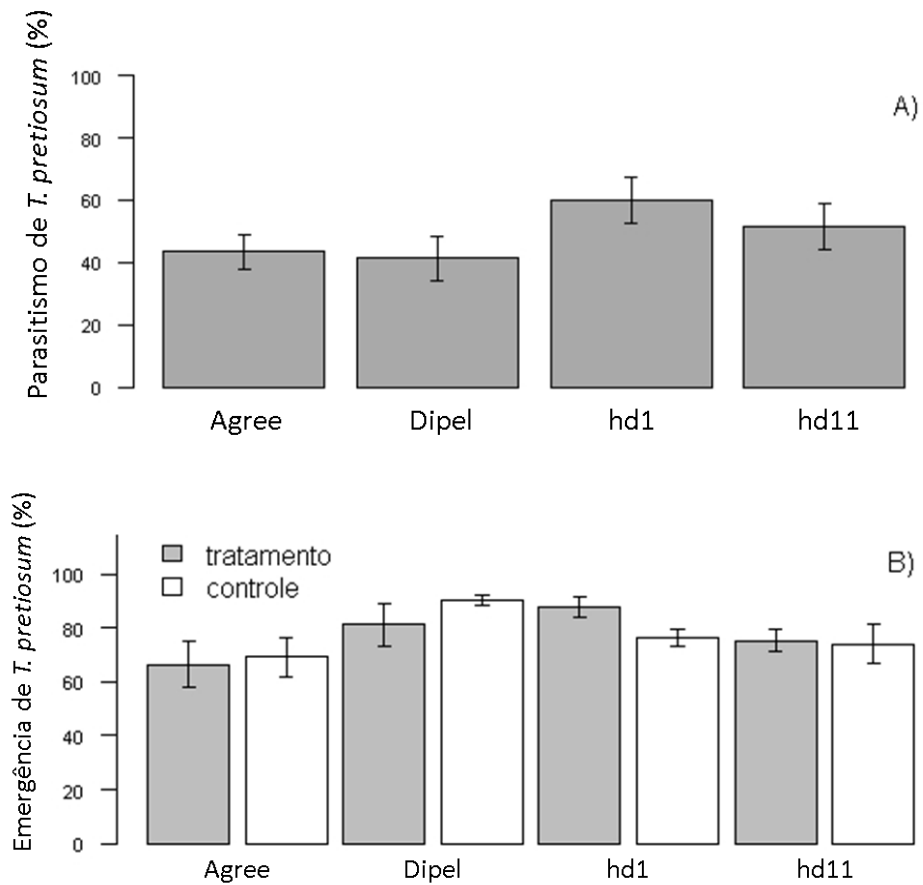


Fig. 1. Porcentagem de parasitismo (A) e emergência (B) de *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Helicoverpa zea* tratados com dois formulados (Agree<sup>®</sup> e Dipel<sup>®</sup>) e duas cepas (HD1 e HD11) de *Bacillus thuringiensis*. Sete Lagoas, MG.

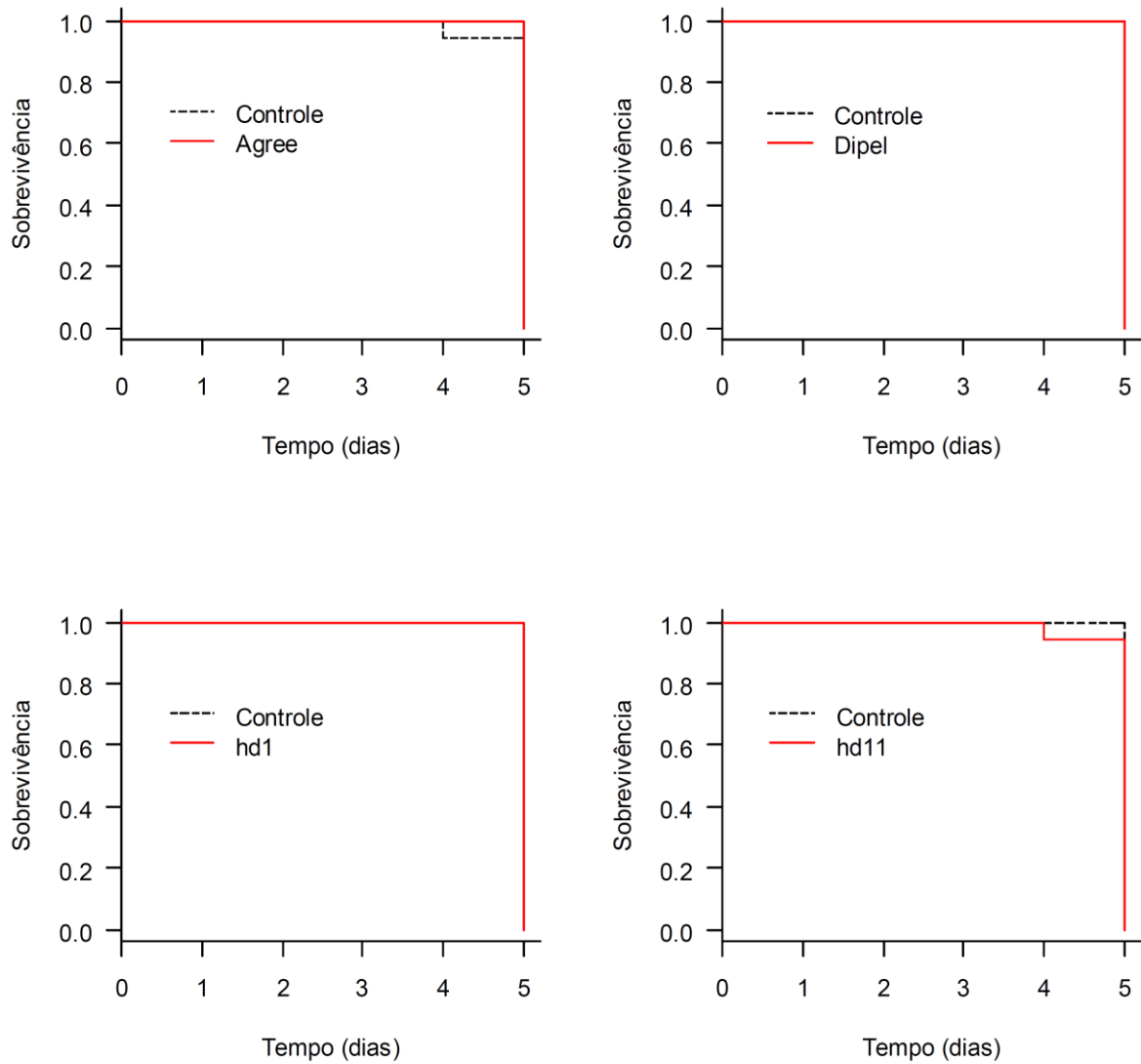


Fig. 2. Sobrevivência de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Helicoverpa zea* tratados com dois formulados (Agree<sup>®</sup> e Dipel<sup>®</sup>) e duas cepas (HD1 e HD11) de *Bacillus thuringiensis* e respectivos controles. Sete Lagoas, MG.

Os tratamentos de ovos de *H. zea* com os produtos comerciais Agree<sup>®</sup>, Dipel<sup>®</sup> e as cepas HD1 e HD11 de *B. thuringiensis* não afetaram a sobrevivência de indivíduos de *T. pretiosum* emergidos desses ovos, quando comparados ao controle (Fig. 2).

## Discussão

A presença dos produtos comerciais Agree<sup>®</sup> e Dipel<sup>®</sup> e das cepas de Bt (HD1 e HD11) sobre os ovos de *H. zea* não interferiu no parasitismo, emergência e sobrevivência das vespas parasitoides. Tais resultados sugerem fortemente que os agentes de controle biológico, o Bt e o parasitoide *T. pretiosum*, podem ser usados em conjunto. A ausência de diferença entre os tratamentos, inclusive para os produtos comerciais, demonstra que a CL50 correspondente a *H. zea* não afeta os parâmetros avaliados.

Parasitoides de ovos realizam uma avaliação criteriosa nos ovos do hospedeiro com suas antenas. As vespas examinam os ovos para certificarem que sua progênie se desenvolva em um hospedeiro capaz de proporcionar aos descendentes condições adequadas de desenvolvimento (Vinson, 1997; Consumano *et al.*, 2012). Espécies de *Trichogramma* usam pistas químicas e visuais para a localização do hospedeiro (Pak *et al.*, 1991).

Contudo, os bioinseticidas podem influenciar na escolha dos ovos, pela modificação na cor, forma, textura, ou odor do hospedeiro (Magalhães *et al.*, 1998). Fêmeas de *T. pretiosum* são capazes de detectar substâncias prejudiciais ou repelentes depositadas sobre o hospedeiro (Vinson, 1997). Para isso, além do uso das antenas, fêmeas de *T. pretiosum* inserem seu ovipositor nos ovos do hospedeiro para um teste de prova da verificação da qualidade nutricional e detecção de substâncias nocivas no ovo. Quando favoráveis as condições do hospedeiro, o parasitismo é realizado (Consoli & Vinson, 2009).

Observamos que, mesmo proporcionando livre escolha ao parasitoide, tanto aos ovos limpos, quanto aos banhados pelos tratamentos com as soluções de Bt, não houve interferência do tratamento com Bt na escolha da vespa em parasitar, uma vez que não houve diferença significativa entre a porcentagem de ovos parasitados tratados e aqueles com água. Isso indica que, possivelmente, as cepas e produtos comerciais não alteraram as pistas químicas usadas pelo *T. pretiosum*. E mesmo que tenha ocorrido alguma alteração nestas pistas, o parasitoide foi capaz de localizar seu hospedeiro, realizar a avaliação sobre os ovos e efetuar o parasitismo. Como não foi encontrado efeito negativo na porcentagem de parasitismo, presumimos que o Bt não causou repelência ou apresentou prejuízo ao parasitoide.

Polanczyk *et al.* (2006), ao alimentarem *Trichogramma pratissolii* e *T. pretiosum* com dieta contendo cepas de Bt, não observaram diferença significativa no parasitismo diário das vespas alimentadas apenas com mel.

Alguns trabalhos mostram que o uso do Bt não afeta negativamente parâmetros como parasitismo, emergência e longevidade de outras espécies de *Trichogramma* (Salama & Zakı, 1985; Takada *et al.* 2001; Vieira *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012).

Azizoglu *et al.*, (2015) ao alimentarem fêmeas adultas de *Trichogramma evanescens* com dieta contendo esporos de Bt, não observaram alterações na longevidade em comparação ao controle. Amaro *et al.*, (2015), em um estudo expondo ovos do hospedeiro *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), a pupa e os adultos do parasitoide aos formulados Agree<sup>®</sup> e Dipel<sup>®</sup> também não observaram efeitos negativos em *T. pretiosum*.

Potrich *et al.* (2015) concluíram que a emergência e longevidade dos adultos de *T. pretiosum* não diferiu do controle quando os ovos foram pulverizados com os isolados de Bt. Takada *et al.*, (2001) também não observaram efeitos negativos de *Bacillus thuringiensis* sobre a emergência de *Trichogramma dendrolimi*. Biondi *et al.* (2013) também chegaram a essa conclusão, ao estudar os efeitos do Bt var. *Kurstaki* sobre a emergência do parasitoide de ovos *Bracon nigricans*. Os resultados desses trabalhos corroboram com os nossos. No entanto, é importante resaltr que avaliamos os possíveis efeitos do Bt sobre as vespas por meio de uma metodologia diferente das acima citadas, proporcionando ao parasitoide a livre escolha pelos ovos tratados ou não.

A emergência dos adultos de *T. pretiosum* não foi afetada pela exposição dos ovos aos tratamentos. A falta de efeito dos produtos sobre a emergência das vespas pode ter sido devido o hospedeiro servir como uma proteção à progênie e/ou pelo o Bt não ser nocivo aos parasitoides. As vespas podem ingerir a bactéria pulverizada sobre o hospedeiro para a emergência ao mastigar o córion do ovo (Biondi *et al.*, 2013). No entanto, mesmo que a vespa tenha ingerido a bactéria, ela não causou danos aos parasitoides. Acreditamos que os parâmetros não foram alterados, na comparação com o controle, pelo fato de o Bt ser um entomopatógeno de ação específica a insetos alvo (Tabashnik *et al.*, 2015).

A longevidade também não foi afetada pela presença dos esporos de Bt nos ovos, o que sugere que os produtos comerciais e cepas não altera a qualidade nutricional, como discutido por (Amichot *et al.*, 2016). Segundo esse trabalho, a presença do esporo da bactéria poderia aumentar a sobrevivência das vespas. Associamos essa melhora nutricional devido ao fato de,

ao consumir o conteúdo interno e os tecidos do hospedeiro, os parasitoides adquirirão aminoácidos, lipídios e proteínas. Alguns autores discutem que certos produtos utilizados na agricultura podem proporcionar aumento nutricional que, por ventura, podem ocasionar aumento na longevidade dos indivíduos oriundo dos ovos (Jervis *et al.*, 1986; Amichot *et al.*, 2016). Contudo, os parasitoides que se desenvolvem em ovos menos nutritivos ou nos quais os produtos utilizados interferem na disponibilidade nutricional podem emergir menos vigorosos e com menor longevidade (Potrich, 2010). No entanto, como já discutido, isso não foi observado nesse trabalho.

Contudo, outros estudos mostram resultados contrários ao nosso para outras espécies de *Trichogramma*. Vaez *et al.*, (2013) observaram que esporos de Bt afetaram negativamente a eficiência do comportamento de busca de *Trichogramma brassicae*. Amichot *et al.*, (2016) verificaram aumento na longevidade de *Trichogramma chilonis* na comparação com o controle. Acreditamos que, embora os trabalhos acima tenham usado o mesmo produto formulado, Dipel<sup>®</sup>, os resultados foram opostos ao nosso devido a diferentes metodologias, espécie do parasitoide avaliada e condições experimentais.

Ksentini *et al.* (2010) analisando o efeito de Bt, deltamethrin e spinosad, em *Trichogramma cacoeciae*, *Trichogramma bourarachae* e *T. evanescens* também verificaram toxicidade de Bt sobre vários parasitoides. Pratisoli *et al.*, (2006), também encontraram efeitos negativos sobre a emergência da progênie de *T. pratissolii* alimentados com isolados de Bt.

Relatados com outros entomopatógenos, a exemplo, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Samuels *et al.*, 2002, Rampelotti *et al.*, 2007; Potrich *et al.*, 2015). Com o vírus AcMNPV em testes de livre escolha (Navarro, 1998). E também com produtos naturais a base de sementes de nim (Gonçalves-Gervásio & Vendramim, 2004; Hohmann *et al.*, 2010). Mostram que estes agentes de controle biológico afetam negativamente espécies de *Trichogramma*.

Alguns autores encontraram ação repelente de piretroides sobre fêmeas de *T. pretiosum* e outros parasitoides (Jacobs *et al.*, 1984;. Singh & Varma, 1986). Isso porque o uso de organo-sintéticos pode afetar a orientação olfativa, resultando em uma baixa capacidade de localizar seus hospedeiros (Desneux *et al.*, 2004; Bayram *et al.*, 2010; Momanyi *et al.*, 2012; Amaro *et al.*, 2015).

Acreditamos que a inserção de mais de um agente de controle deve ser feita de forma cuidadosa. Pesquisas ainda devem ser realizadas no sentido de responder qual o momento de inserir cada organismo no campo. Sabemos que as vespas eliminam a praga interrompendo seu desenvolvimento larval e o Bt as combate na fase inicial de larva. Então qual o momento de aplicar os bioinseticidas e de liberar as vespas no campo? O fato do Bt não ter apresentado efeitos prejudiciais aos parasitoides deve ser considerado na elaboração de estratégias de MIP envolvendo esses dois inimigos naturais. Pois produtos à base de Bt são empregados atualmente contra cerca de 170 espécies de lepidópteros-praga (Glare & O'Callaghan, 2000).

Resultados divergentes nos levam a pensar que novos trabalhos devem ser conduzidos com o objetivo de responder a algumas perguntas: O Bt influenciará na longevidade das vespas adultas se as mesmas forem alimentadas com o esporo diretamente ou mastigando o córion do ovo também contendo o esporo de Bt? O percentual de parasitismo será o mesmo trabalhando com a mesma espécie de bactéria, mas com uma abordagem diferente, ou seja, com diversas metodologias? O presente trabalho nos levou a perceber que há divergências de resultados, muitas vezes com o mesmo formulado de Bt devido às diversas maneiras de condução dos trabalhos. Portanto isso abre possibilidades para novas pesquisas utilizando as metodologias testadas nos estudos citados e para a necessidade de padronização dessas metodologias.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ/PPGCA), pelo suporte científico À estudante. À Embrapa Milho e Sorgo pela estrutura fornecida para a condução do experimento. À Fapemig e à Capes, pelo apoio financeiro. À Koppert Biological Systems, na pessoa da Sra. Sandra Magro, pela concessão dos parasitoides.

## Referências

- Amaro, J.T., Bueno, A.F., Poari-Fernandes, A.F. & Neves, P.M.O.J.** (2015) Selectivity of Organic Products to *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Neotropical Entomology* **44**, 489–497.
- Amichot, M., Curty, C., Benguettat-Magliano, O., Gallet, A. & Wajnberg, E.** (2016) Side effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on the hymenopterous parasitic wasp *Trichogramma chiloni*. *Environmental Science and Pollution Research* **23**, 3097-3103.
- Azizoglu, U., Yilmaz, S., Ayvaz, A. & Karabörklü, S.** (2015) Effects of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 spore-crystal mixture on the adults of egg parasitoid *Trichogramma evanescens* (Hymenoptera : Trichogrammatidae). *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **29**(4), 653-658.
- Bayram, A., Gianandrea, S., Onofri, A. & Conti, E.** (2010) Sub-lethal effects of two pyrethroids on biological parameters and behavioral responses to host cues in the egg parasitoid *Telenomus busseolae*. *Biological Control* **53**, 153–160.
- Biondi, A., Zappala` L., Stark, J.D. & Desneux, N.** (2013) Do biopesticides affect the demographic traits of a parasitoid wasp and its biocontrol services through sublethal effects? *PLoS ONE* **8**, 76548.
- Boo, K.S. & Yang, J.P.** (2000) Kairomones used by *Trichogramma chilonis* to find *Helicoverpa assulta* eggs. *Journal of Chemical Ecology* **26**, 359–375.
- Consoli, F.L & Vinson, S.B.** (2009) Parasitoides (Hymenoptera). *Bioecologia e Nutrição de Insetos. Base para o Manejo Integrado de Pragas* (ed. by AR Panizzi & JRP Parra), pp. 837–873. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, Brazil.
- Crawley, M.J.** (2013) *The R book*. Second Edition. Wiley: 975 p.
- Crickmore, N. et al.** (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 3, p. 807-813.
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. & Zeigler, D.R.** (2016) “*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature” <http://www.btnomenclature.info/>.
- Copping, L.G., Menn, J.J.** (2000). Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science* **56**, 651-676.
- Cusumano, A., Peri, E., Vinson, S.B. & Colazza, S.** (2012) Interspecific extrinsic and intrinsic competitive interactions in egg parasitoids. *BioControl* **57**, 719–734.

- De Santis, F., Conti, E., Romani, R., Salerno, G., Parillo, F. & Bin, F.** (2008) Colleterial glands of *Sesamia nonagrioides* as a source of the host-recognition kairomone for the egg parasitoid *Telenomus busseolae*. *Physiological Entomology* **33**, 7–16.
- Desneux, N., Rafalimanana, H., Kaiser, L.** (2004) Dose–response relationship in lethal and behavioural effects of different insecticides on the parasitic wasp *Aphidius ervi*. *Chemosphere* **54**, 619–627.
- Garcia, P.V., Pereira, N. & Oliveira, L.M.** (2009) Side-effects of organic and synthetic pesticides on cold-stored diapausing prepupae of *Trichogramma cordubensis*. *BioControl* **54**, 451–458.
- Glare, T. R. & O’Callaghan, M.** (2000) *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley & Sons, 350 p.
- Gonçalves-Gervásio, R.C.R. & Vendramim, J.D.** (2004) Efeito de extratos de meliáceas sobre o parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Neotropical Entomology* **33**, 607-612.
- Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A.** (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* **69**, 487-488.
- Hohmann, C.L., Silva, F.A.C. & Novaes, T.G.** (2010) Selectivity of neem to *Trichogramma pretiosum* riley and *Trichogrammatoidea annulata* de Santis (Hymenoptera: Trichogrammatidae) *Neotropical Entomology* **39**, 985-990.
- Hwang, I.C., Park, C., Kang, D.K., Jin, N.Y., Jung, S.Y., Seo, M. J., Kim, J.E., Youn, Y.N. & Yu, Y.M.** (2010) Combined application of *Trichogramma ostriniae* and *Bacillus thuringiensis* for eco-friendly control of *Plutella xylostella*. *Journal of Applied Biological Chemistry* **53**, 316–322.
- Jacobs, R.J., Kouskoleskas, C.A. & Gross, H.R.** (1984) Responses of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to residues of permethrin and endosulfan. *Environ Entomol* **13**, 355–358.
- Jervis, M.A. & Kidd, N.A.C.** (1986). Host-feeding strategies in hymenopteran parasitoids. *Biological Review* **61**, 395–434.
- Khan, M.A., Khan, H. & Ruberson, J.R.** (2015) Lethal and behavioral effects of selected novel pesticides on adults of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Pest Management Science* **71**, 1640–1648.
- Ko, K., Yudi, L., Maolin, H., Dirk, B., Feng, Z. & Kai, S.** (2015) Toxicity of insecticides targeting rice planthoppers to adult and immature stages of *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Economic Entomology* **108**, 69–76.
- Ksentini, I., Jardak, T. & Zeghal, N.** (2010) *Bacillus thuringiensis* deltamethrin and spinosad side-effects on three *trichogramma* species. *Bulletin of Insectology* **63**(1), 31–37.

- Lundgren, J.G., Heimpel, G.E. & Bomgren, S.A.** (2002) Comparison of *Trichogramma brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Augmentation with Organic and Synthetic Pesticides for Control of Cruciferous Lepidoptera. *Environ. Entomol.* **31**(6), 1231-1239.
- Luckmann, D., Gouvea, A., Potrich, M., Silva, E.R.L., Poretz, B, Dallacort, S., Gonçalves, T.E.** (2014) Seletividade de produtos naturais comerciais a *Trichogramma pretiosum* (Riley, 1879) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) *Revista Ceres* **61**(6), 924-931.
- Magalhães, B.P., Monnerat, R. & Alves, S.B.** (1998) Interações entre entomopatógenos, parasitoides e predadores. In: Alves SB (ed) *Controle Microbiano de Insetos*, 2nd edn. FEALQ, Piracicaba, 195–216.
- Melo, A.L., Soccol, V.T. & Soccol, C.R.** (2014) *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Crit Rev Biotechnol* **29**, 1–10.
- Mills, N.J. & Kuhlmann, U.** (2004) Oviposition behavior of *Trichogramma platneri* Nagarkatti and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in patches of single and clustered host eggs. *Biological Control* **30**, 42–51.
- Milonas, P.G., Mazomenos, B.E., Konstantopoulou, M.A.** (2009) Kairomonal effect of sex pheromone components of two lepidopteran olive pests on *Trichogramma* wasps. *Insect Science* **16**, 131-136.
- Momanyi, G., Maranga, R., Sithanatham, S., Agong, S., Matoka, C.M. & Hassan, S.A.** (2012) Evaluation of persistence and relative toxicity of some pest control products to adults of two native trichogrammatid species in Kenya. *BioControl* **57**, 591–601.
- Monnerat, R.G., Soares, C.M., Capdeville, G., Jones, G., Martins, E.S., Praça, L., Cordeiro, B.A., Braz, S.V., dos Santos, R.C. & Berry C.** (2009) Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* living inside of plants. *Microb Biotechnol* **2**, 512–520.
- Mutyambai, D.M., Toby, J.A.B., Midega, C.A.O., Woodcock, C.M., Caulfield, J.C., Berg, J.V.D., Pickett, J.A. & Khan, Z.R.** (2015) Responses of Parasitoids to Volatiles Induced by *Chilo partellus* Oviposition on Teosinte, a Wild Ancestor of Maize. *Journal of Chemical Ecology* **41**, 323–329.
- Navarro, M.A.** (1998) *Trichogramma* spp. Producción, uso y manejo em Colombia. Impretec Press, Guadalajara de Buga, p 176.
- Pak, G.A., Berkhout, H. & Klapwijk, J.** (1991) Do *Trichogramma* Look for Host?. In: Wajnberg, E., Vinson, S.B. (Eds.), *Trichogramma* and Other Egg Parasitoids. Paris, Les Colloques de l'INRA **56**, 77-80.
- Parra, J. R. P. & R. A. Zucchi.** (2004) *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. *Neotropical Entomology* **33**, 271–281.
- Pazos, L. & Salamanca, C.** (2007) Three-dimensional structure of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Acta Biol Colomb.* **12**, 19–32.

**Pinto, A.S. & Parra, J.R.P.** (2002) Liberação de inimigos naturais. In: PARRA, J.R.P., Botelho, P.S.M., Corrêa-Ferreira, B.S., Bento, J.M.S. (Ed.). Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, p.325-342.

**Poorjavad, N., Goldansaz, S.H., Dadpour, H. & khajehali, J.** (2014) Effect of *Ferula assafoetida* essential oil on some biological and behavioral traits of *Trichogramma embryophagum* and *T. evanescens*. *BioControl* **59**, 403–413.

**Potrich, M.** (2010) Seletividade de fungos entomopatogênicos a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e virulência a *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 142p.

**Potrich, M., Alves, L. F., Lozano, E., Roman, J. C., Pietrowski, V. & Neves, P.M.O.J.** (2015) Interactions between *Beauveria bassiana* and *Trichogramma pretiosum* under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **154**, 213–221.

**Pratissoli, D., Polanczyk, R. A., Vianna, U. R., Andrade, G. S., Oliveira, R. G. S.** (2006) Desempenho de *Trichogramma pratissolii* Querino & Zucchi (Hymenoptera, Trichogrammatidae) em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera, Pyralidae) sob efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Ciência Rural, Santa Maria* **36**(2), 369-377.

**Polanczyk, R.A., Pratissoli, D., Vianna, U.R., Oliveira, R.G.S. & Andrade, G.S.** (2006) Interações entre inimigos naturais: *Trichogramma* e *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas agrícolas. *Acta Sci. Agron.* **28**, 233-239.

**Querino, R.B. & Zucchi, R.A.** (2003) Caracterização morfológica de dez espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) registradas na América do Sul. *Neotrop Entomol* **32**, 597-613.

**Rampelotti, F.T., Ferreira, A., Prando, H.F., Grutzmacher, A.D., Martins, J.F.S, Tcacenco, F.A. & Mattos, M.L.T.** (2007) Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Timbraca limbiventris* (Stal) (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. *Arq Inst Biol* **74**, 141–148.

**Raymond, B., Wyres, K.L., Sheppard, S.K., Ellis, R.J. & Bonsall, M.B.** (2010) Environmental factors determining the epidemiology and population genetic structure of the *Bacillus cereus* group in the field. *PLoS Pathog* **6**, 1000905.

**Salama, H.S. & Zaki, F.N.** (1985) Biological effects of *Bacillus thuringiensis* on the egg parasitoid, *Trichogramma evanescens*. *Insect Sci Appl.* **6**, 145-148.

**Sanahuja, G., Ravira, J. B., Twyman, R.M., Capell, T. & Christou, P.** (2011) *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotech J.* **9**, 283-300.

**Samuels, R.I., Coracini, D.L., Santos, C.A.M., Gava, C.A.T.** (2002) Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae) eggs by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biol Control* **23**, 269–273.

- Sayed, S.M., Elsayed, G., Mahmoud, S.F. & Elzahrany, O.M.** (2015) Efficacy of *Bacillus thuringiensis* and Indigenous *Trichogramma turkistanica* for Controlling Lepidopterous Pests on Taify Pomegranate Fruits. *African Entomology* **23**, 443-450.
- Singh, P.P. & Varma, G.C.** (1986) Comparative toxicities of some insecticides to *Chrysoperla carnea* (Chrysopidae: Neuroptera) and *Trichogramma brasiliensis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), two arthropod natural enemies of cotton pests. *Agric Ecosyst Environ* **15**, 23–30.
- Singh, N.K., Neeraj, A., Mishra, P.K. & Saurabh, S.** (2015) Toxicity of botanical microbial and chemical pesticide to *Trichogramma chilonis* Ishii (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Experimental Zoology, India* **18**, 479-482.
- Smith, S.M.** (1996) Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and potential of their use. *Annual Review of Entomology* **41**, 375–406.
- Souza, J.R., Carvalho, G.A., Moura, A.P., Couto, M.H.G. & Maia, J.B.** (2014) Toxicity of some insecticides used in maize crop on *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) immature stages. *Chilean journal of agricultural research* **74**, 234–239.
- Tabashnik, B.E., Zhang, M., Fabrick, J.A., Wu, Y., Gao, M., Huang, F., Wei, J., Zhang, J., Yelich, A., Unnithan, G.C., Bravo, A., Soberón, M., Carrière, Y. & Li, X.** (2015). Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Nature* **5**, 15107.
- Takada, Y., Kawamura, S. & Tanaka, T.** (2001) Effects of various insecticides on the development of the egg parasitoid *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *J Econ Entomol* **94**, 1340–1343.
- Vaez, N., Iranipour, S. & Hejazi, M.J.** (2013) Effect of treating eggs of cotton bollworm with *Bacillus thuringiensis* Berliner on functional response of *Trichogramma brassicae* Bezdenko. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection* **46**, 2501–2511.
- Valicente, F. H. & Barreto, M. R.** (2003) *Bacillus thuringiensis* Survey in Brazil: Geographical Distribution and Insecticidal Activity Against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). 2003. *Neotropical Entomology*. **32**, 639-644.
- Van Frankenhuyzen, K.** (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* **101**, 1-16.
- Vieira, A., Oliveira, L. & Garcia, P.** (2001). Effects of conventional pesticides on the preimaginal developmental stages and on adults of *Trichogramma cordubensis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biocontrol Sci Technol*. **11**, 527–534.
- Vilela, M., Mendes, S.M., Valicente, F.H., Carvalho, S.S.S., Santos, A.E., Santos, C.A., Araújo, O.G., Barbosa, T.A.N., Carvalho, E.A.R. & Costa, V.H.D.** (2014) Metodologia para Criação e Manutenção de *Helicoverpa armigera* em Laboratório. Circular técnica, ISSN 1679-1150.

- Vinson, S.B.** (1997) Comportamento de seleção hospedeira de parasitoides de ovos, com ênfase na família Trichogrammatidae. *Trichogramma* e o Controle Biológico Aplicado (ed. by JRP Parra & RA Zucchi), pp. 67–119. FEALQ, Piracicaba, Brazil.
- Xu, Z., Yao, B., Sun, M. & Yu, Z.** (2004) Protection of mice infected with *Plasmodium berghei* by *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Parasitol Res.* **92**, 53–57.
- Xu, J., Huigens, M.E., Orr, D. & Groot, A.T.** (2014) Differential response of *Trichogramma* wasps to extreme sex pheromone types of the noctuid moth *Heliothis virescens*. *Ecological Entomology* **39**, 627–636.
- Wang, De-Sen., He, Y.R., Guo, X.L. & Luo, Y.L.** (2012) Acute toxicities and sublethal effects of some conventional insecticides on *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of economic entomology* **105**, 1157–63.
- Wang, Y., Wu, C., Cang, T., Yang, L., Yu, W., Zhao, X., Wang, Q. & Cai, L.** (2014) Toxicity risk of insecticides to the insect egg parasitoid *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Pest. Manag. Sci.* **70**, 398–404.
- Zhu, J.S., Lian, M.L., Wang, J., Qin, S.** (2009). Toxicity and safety evaluation of five insecticides on egg parasitoid, *Trichogramma evanescens* Westwood. *Chin. J. Eco-Agric.* **17**, 715-720.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ovos de *Helicoverpa zea* banhados com as cepas de Bt, HD1 e HD11 e os formulados Dipel® e Agree® não alteram a resposta olfativa de *Trichogramma pretiosum*. Constatamos que o *T. pretiosum* localiza os ovos na ausência da planta hospedeira, á curta distância. Cepas HD 1 e HD 11 e formulados Agree® e Dipel®, á base de Bt, sobre ovos de *H. zea* não interferem no parasitismo, emergência e sobrevivência de *T. pretiosum*.

Tais resultados sugerem fortemente que as táticas de controle biológico microbiano com Bt e o parasitoide *T. pretiosum* são compatíveis e podem ser usadas em conjunto sem interferência negativa de uma sobre a outra. Este é o primeiro relato avaliando a resposta olfativa, emergência e parasitismo de *T. pretiosum* a ovos de *H. zea* com a presença de cepas e formulados á base de Bt.