



IVANA LEMOS SOUZA

**ATTRACTIVENESS OF *TARGETES ERECTA* L. AND
CAPSICUM ANNUUM L. TO *APHIDIUS PLATENSIS*
BRETHES (HYMENOPTERA: BRACONIDAE: APHIDIINAE):
BEHAVIOR, SURVIVAL, NUTRIENT RESERVE AND
CHEMICAL PROFILE OF THE PLANTS**

**LAVRAS-MG
2018**

IVANA LEMOS SOUZA

**ATTRACTIVENESS OF *TAGETES ERECTA* L. AND *CAPSICUM ANNUUM* L. TO
APHIDIUS PLATENSIS BRETHES (HYMENOPTERA: BRACONIDAE:
APHIDIINAE): BEHAVIOR, SURVIVAL, NUTRIENT RESERVE AND CHEMICAL
PROFILE OF THE PLANTS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Luís Cláudio Paterno Silveira
Orientador

Prof(a). Dr(a). Rosangela Cristina Marucci
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados
pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Souza, Ivana Lemos.

Attractiveness of *Tagetes erecta* L. and *Capsicum annuum* L. to
Aphidius platensis Brethes (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae):
behavior, survival, nutrient reserve and chemical profile of the
plants / Ivana Lemos Souza. - 2018.

82 p. : il.

Orientador(a): Luís Cláudio Paterno Silveira.

Coorientador(a): Rosangela Cristina Marucci.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Controle biológico conservativo. 2. Recursos florais. 3.
Nutrientes. I. Silveira, Luís Cláudio Paterno. II. Marucci, Rosangela
Cristina. III. Título.

IVANA LEMOS SOUZA

**ATTRACTIVENESS OF *TAGETES ERECTA* L. AND *CAPSICUM ANNUUM* L. TO
APHIDIUS PLATENSIS BRETHES (HYMENOPTERA: BRACONIDAE:
APHIDIINAE): BEHAVIOR, SURVIVAL, NUTRIENT RESERVE AND CHEMICAL
PROFILE OF THE PLANTS**

**ATRATIVIDADE DE *TAGETES ERECTA* L. E *CAPSICUM ANNUUM* L. AO
APHIDIUS PLATENSIS BRETHES (HYMENOPTERA: BRACONIDAE:
APHIDIINAE): COMPORTAMENTO, SOBREVIVÊNCIA, RESERVA DE NUTRIENTES
E PERFIL QUÍMICO DAS PLANTAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 23 de abril de 2018
Dr. Alexander Machado Auad - EMBRAPA
Dra. Livia Mendes De Carvalho Silva - EPAMIG
Prof. Dr. Marcus Vinicius Sampaio - EAFUDI
Profa. Dra. Maria Fernanda Gomes Villalba Penaflor - UFLA

Dr. Luís Cláudio Paterno Silveira
Orientador

Prof(a). Dr(a). Rosangela Cristina Marucci
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2018**

AGRADECIMENTOS

Sempre e primeiramente dar graças a Deus por tudo, agradecer-Lo por todas as oportunidades, bênçãos e por sempre me amparar com cuidado muito especial.

Aos meus amados pais Ivanice e Deraldo, que tanto fizeram para que eu chegasse até aqui e para que eu voe cada vez mais alto, pelo mais belo exemplo de amor e doses diárias de cuidado e carinho.

À toda minha família Lemos e Souza que mesmo de longe sei que posso contar com eles para tudo.

Ao meu amado Silas pelo amor, apoio, dedicação e todas as experiências compartilhadas e vividas com muita fé e alegria, para que o futuro seja ainda melhor.

Ao Departamento de Entomologia DEN e a Universidade Federal de Lavras UFLA por esses 4 anos de intenso aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado no Brasil e nos Estados Unidos.

A todos os funcionários da Entomologia, professores, técnicos, pessoal da limpeza e secretárias os quais foram muito importantes para minha formação como Entomologista e essenciais no meu dia-a-dia.

Ao meu orientador Luís Cláudio pelos ensinamentos, dedicação e por ter confiado em mim desde o começo dessa caminhada.

À minha coorientadora Rosangela por ter me “abraçado” de tal forma que pude dar grandes saltos na minha vida acadêmica, pela amizade, exemplo de profissionalismo e dedicação.

Aos colegas e estagiários dos Laboratório de Controle Biológico Conservativo e Controle Biológico, a minha querida turma de Doutorado 2014 e ao pessoal do Laboratório de Ecologia Química e Interações Insetos Plantas, por compartilhar os aprendizados, dúvidas, alegrias e farras.

À professora Maria Fernanda por sempre estar disponível, pelos ensinamentos e dicas que puderam engrandecer o meu trabalho.

À pesquisadora da USDA-ARS Jana C. Lee, por me receber muito bem em seus laboratórios em Corvallis-Oregon, me deixar a vontade para realizar as pesquisas, por ser bastante prestativa e sempre acessível.

A Diego B. Silva por estar sempre disposto a ajudar, pela coleta e identificação voláteis, pela sua grande contribuição no trabalho e pela amizade.

Aos membros da banca Alexander Auad, Livia Carvalho, Marcus Vinicius Sampaio, Maria Fernanda Peñaflor, Brígida de Souza e Rogério Silva.

E a todos que compartilharam destes 4 anos bem vividos, que eu jamais esquecerei.

RESUMO GERAL

O controle biológico conservativo visa manter e aumentar as populações de inimigos naturais em cultivos agrícolas, fornecendo plantas com flores como fonte alimentar. Os recursos florais disponibilizam néctar e pólen, importantes para alimentação de adultos dos parasitoides. Melhoram a performance dos parasitoides, por meio do fornecimento de nutrientes necessários a sobrevivência, prolonga a longevidade e aumenta a fecundidade, além de que, os recursos florais são altamente atraentes e, constantemente visitados pelos parasitoides. Este estudo teve como objetivos investigar se flores do cravo amarelo *Tagetes erecta* L., influenciam no comportamento, biologia e nutrição do parasitoide de pulgões *Aphidius platensis* Brethes, coletar e identificar os compostos voláteis das plantas de cravo amarelo (floração e vegetativo) e de pimentão envolvidos na atratividade olfativa de *A. platensis*. Fêmeas do parasitoide expostas ao cravo, gastaram mais tempo andando e parasitando os pulgões *Myzus persicae* Sulzer ou *Schizaphis graminum* Rodani e, posteriormente, tiveram maiores taxas de parasitismo. O parasitoide sem acesso ao cravo gastou mais tempo parado e se limpando, porém, o tempo gasto provando os hospedeiros, a taxa de emergência e a razão sexual não foram afetados. A sobrevivência foi aumentada na presença do cravo em relação a água e o cravo amarelo é fonte de nutrientes (lipídios, glicogênio e açúcar) para *A. platensis*. Com relação a olfatometria, o cravo em floração, cravo floração + pimentão e pimentão infestado atraíram *A. platensis*. A análise de voláteis mostrou que *T. erecta* em floração, emite compostos orgânicos voláteis (COVs) que influenciam na preferência olfativa e na atração do parasitoide *A. platensis*. Os derivativos de ácidos graxos (DAGs) foram encontrados em maior quantidade nos cravos em floração. O pimentão infestado foi mais atraente para *A. platensis*, do que o pimentão intacto. Estes resultados sugerem que as flores do cravo amarelo podem otimizar o controle biológico de pulgões pelo parasitoide *A. platensis*.

Palavras-chaves: Controle biológico conservativo. Recursos florais. Nutrientes. Parasitismo. Compostos orgânicos voláteis.

GENERAL ABSTRACT

Conservative biological control aims to maintain and increase populations of natural enemies in agricultural crops, providing flowering plants as a food source. Floral resources become nectar and pollen, important for feeding adults of parasitoids. Improve the performance of parasitoids, prolong longevity and increase fecundity, as well as the resources they are capable of, and usually the parasitoids. The aim of this study was to investigate whether marigold flowers *Tagetes erecta* L., influence the behavior, biology and nutrition of the aphid parasitoid *Aphidius platensis* Brethes, to collect and identify the VOCs of marigold (blooming and non-blooming) and sweet pepper plants involved in olfactory attractiveness of *A. platensis*. Females parasitoids exposed to marigolds, spent more time walking and parasitizing the aphids *Myzus persicae* Sulzer or *Schizaphis graminum* Rodani aphids and subsequently had higher parasitism rates. The parasitoid without access to marigolds spent more time stationary and marginally more time grooming, however, the time spent probing, emergence rate, and the sex ratio were not affected. Survival was increased in the presence of marigold in relation to water and the marigold is a source of nutrients (lipids, glycogen and sugar) for *A. platensis*. With respect to olfactometry, marigold blooming, marigold blooming + sweet pepper and infested sweet pepper attracted *A. platensis*. The volatile analysis showed blooms *T. erecta*, emits VOCs that influence the olfactory preference, in the attraction of *A. platensis*. Fatty acid derivatives (DAGs) were found in higher numbers in flowering marigolds. Infested sweet peppers were more attractive to *A. platensis* than intact sweet peppers. These results suggest that marigold blooming can optimize the biological control of aphids by *A. platensis*.

Keywords: Conservative biological control. Floral resources. Nutrients. Parasitism. Volatile organic compounds.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS	20
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	26
ARTIGO 1 EFFECTS OF MARIGOLD ON THE BEHAVIOR, SURVIVAL AND NUTRIENT RESERVES OF <i>APHIDIUS PLATENSIS</i>	26
Abstract.....	26
Introduction	27
Material and methods	29
Insects	29
Marigold and sweet pepper plants	29
Parasitoid behavior	29
Parasitoid survival	31
Nutrient analyses	31
Results	33
Parasitoid behavior	33
Parasitoid survival	33
Nutrient analyses	34
Discussion.....	34
Acknowledgements	37
References	37
Supplementary appendix a: Nutrient assay of <i>Aphidius colemani</i> with various foods	49
Objective.....	49
Rationale.....	49
Methods	49
Results.	50
ARTIGO 2 ATRATIVIDADE E IDENTIFICAÇÃO DOS VOLÁTEIS MEDIANDO INTERAÇÃO ENTRE PLANTAS DE CRAVO AMARELO E PIMENTÃO E O PARASITOIDE <i>APHIDIUS PLATENSIS</i> (HYMENOPTERA: BRACONIDAE).....	51
RESUMO	52
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAL E MÉTODOS	54
<i>Plantas e insetos</i>	55

<i>Tratamentos</i>	55
<i>Respostas olfativas</i>	56
<i>Coleta de voláteis e composição química</i>	57
<i>Análise estatística</i>	58
RESULTADOS	59
DISCUSSÃO	68
AGRADECIMENTOS	73
REFERÊNCIAS	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	80

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO GERAL

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) (Solanaceae), originário do continente Americano, é uma olerácea de frutos de cultivo perene, porém, cultivada como anual (FILGUEIRA, 2008). É altamente consumido sob diferentes maneiras no mundo (ALASERHAT; CANBAY, 2017), considerado um dos primeiros temperos utilizados para dar cor, aroma e sabor aos alimentos, além de deixar carne e cereais mais atraentes (HEIDEN et al., 2007).

No Brasil o cultivo do pimentão é distribuído em todas as regiões, sendo realizado tanto em campo aberto, compreendendo as maiores áreas, quanto em estufas (MALDONADO, 2001), porém é melhor beneficiado pelo cultivo protegido (FILGUEIRA, 2003), pois permite a produção durante todo o ano (FONTES et al. 2005). Foram comercializados no ano de 2017 aproximadamente 26,54 milhões de toneladas de pimentão no Estado de São Paulo (AGRIANUAL, 2018).

Como em todas as espécies de plantas cultivadas de importância econômica, existem problemas relacionados ao ataque de insetos-praga associados ao pimentão, que acarretam perdas significativas de produção. O controle dessas pragas, ocorre geralmente por métodos químicos. Dentre as pragas, as de maior importância econômica são os pulgões, principalmente porque causam injúrias por meio da sucção de seiva e por serem vetores de uma ampla gama de vírus causadores de doenças nas plantas (PAVELA et al., 2018).

O pulgão verde, *Myzus persicae* Sulzer, 1776 (Hemiptera: Aphididae), considerado praga de grande importância no mundo (MOHAMMED; HATCHER, 2017), é polífago com mais de 400 espécies de plantas hospedeiras (BLACKMAN; EASTOP, 2000) cultivadas em campo ou estufas. É considerado a praga-chave do pimentão (ALASERHAT; CANBAY, 2017). Suas ninfas são esverdeadas, bem parecidas com os adultos vivíparos, (reprodução partenogênica). Medem cerca de 1,7-2,0 mm de comprimento, podem apresentar uma faixa verde mediana e lateral, os sífúnculos moderadamente longos e inchados ao longo do comprimento e da mesma cor do corpo e os apêndices (antenas, pernas e cauda) são pálidos

(PEÑA-MARTINEZ, 1992). Os adultos alados, responsáveis pela dispersão da população, normalmente apresentam cor verde-clara, tendo a cabeça, antenas e tórax preto e o abdome verde amarelado, medindo aproximadamente 2 mm de comprimento. (PEÑA-MARTINEZ, 1992).

O hábito dispersivo do *M. persicae* contribui significativamente para sua eficácia como vetor de fitovírus, transmite mais de 100 vírus às plantas (BLACKMAN; EASTOP, 2000; BLANC et al., 2011), possui alta capacidade reprodutiva, curto período entre gerações (MARTINS et al., 2014), além de ocasionar problemas devido a depreciação de frutos, por meio do crescimento de fungos oportunistas (*Capnodium* sp.) sobre o seu excremento (*honeydew*) (VAN LENTEREN, 2000). Todas essas características tornam difícil o controle de *M. persicae* que no caso da cultura do pimentão apresenta apenas três inseticidas registrados (AGROFIT, 2018).

O pulgão verde dos cereais, *Schizaphis graminum* Rondani, 1852 (Hemiptera: Aphididae), é praga de mais de 70 espécies de gramíneas (MICHAELS, 1986). São pequenos (1,3 a 2,1 mm), de forma oval alongada com cabeça e tórax e abdome de cor verde claro a médio. Uma faixa verde mais escura no meio do abdômen é mais visível nas ninfas e adultos do último ínstar. As antenas são uniformemente escuras. Os sifúnculos e cauda são pálidos com pontas ligeiramente escuras (PEÑA-MARTINEZ, 1992).

A saliva de *S. graminum* tem atividade enzimática que decompõe as paredes celulares e cloroplastos em plantas suscetíveis (AL-MOUSAWI et al., 1983). Ao se alimentar causa inicialmente manchas amarelas ou vermelhas nas folhas. A alimentação continuada leva ao amarelecimento geral e vermelhidão, morte das folhas e raízes, e pode levar à morte da planta. O tamanho, a produtividade e a sobrevivência das plantas são grandemente afetados pelos insetos que se alimentam de cultivares de grãos pequenos suscetíveis (NUESSLY; NAGATA, 2014).

Análises realizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desde 2008, demonstram que o pimentão é uma das hortaliças com maior número de irregularidades referentes à presença de resíduos de inseticidas sintéticos no Brasil. O mais preocupante é que das amostras irregulares identificadas com resíduos, 71% são representadas apenas pela presença de agrotóxicos não autorizados para a cultura ou com ingrediente ativo acima do limite máximo autorizado (ANVISA, 2016). O uso intensivo e indiscriminado de pesticidas, favorece a seleção de populações de insetos resistentes, contamina o meio ambiente e reduz populações de inimigos naturais (HERRON; COOK, 2002), ocasionando aumento dos custos de produção.

A grande dependência de inseticidas para controlar pulgões impõe uma pressão de seleção, para populações resistentes aos inseticidas. *M. persicae* é relatado como uma espécie resistente a diversos inseticidas, mais do que outras espécies de insetos (WHALON et al., 2008; UMINA et al., 2014). Dessa forma, tornam-se necessárias a adoção de medidas alternativas ao controle químico, que tornem viáveis o manejo de pulgões com menores impactos ambientais e na saúde dos trabalhadores e consumidores das espécies vegetais atacadas pelos pulgões.

O controle biológico conservativo visa manter ou aumentar as populações locais de inimigos naturais nas áreas agrícolas por meio da diversificação vegetal (BARBOSA 1998; LANDIS et al., 2000). A diversificação vegetal compreende a adição de plantas companheiras em floração ou faixas de flores de plantas silvestres em cultivos manejados com baixa biodiversidade (GURR et al., 2004). É considerada uma proposta interessante, já que reduz surtos populacionais de pragas, não deixando que alcancem níveis de dano econômico e aumenta a atratividade, riqueza de espécies, abundância e performance de inimigos naturais (LANDIS et al., 2000; HARO et al., 2018).

Dentro deste conceito, os inimigos naturais, predadores e parasitoides desempenham papel importante como reguladores de insetos-praga por se beneficiarem de uma variedade de recursos das plantas (WILKINSON; LANDIS, 2005). Os adultos dos parasitoides se alimentam de derivados de plantas como o néctar e pólen floral (JERVIS et al., 2004), sem os quais seu desempenho é limitado (BEGUM et al., 2006). O néctar e pólen floral contém aminoácidos, vitaminas, minerais, açúcar, glicogênio e lipídeo (STANLEY; LINSKENS 1974; BAKER; BAKER 1983; ROULSTON; BUCHMANN 2000; NICOLSON; THORNBURG 2007). Que ao estarem disponíveis na fase adulta influenciam diversos atributos biológicos dos parasitoides, como, aumento da taxa de parasitismo (BALMER et al., 2014), sobrevivência e fecundidade (LANDIS et al., 2000).

Muitas plantas podem ser utilizadas na diversificação vegetal, no entanto, segundo Venzon et al. (2005) para introduzir uma planta atrativa que seja eficiente no incremento das populações de inimigos naturais, deve-se observar, além da qualidade nutricional, a disponibilidade, a acessibilidade e a atratividade do alimento oferecido pela planta aos inimigos naturais, bem como a utilização dos recursos fornecidos pelas plantas por outros membros da teia alimentar presentes no ecossistema em questão.

O cravo amarelo (*Tagetes erecta* L.) (Asteraceae) é uma planta ornamental utilizada para fins de usos medicinais, nutricionais e industriais, e ultimamente como componente de arranjos espaciais em hortas orgânicas (LORENZI, 2015) e em pesquisas de diversificação

vegetal (SILVEIRA 2009; HARO et al., 2018), de modo a promover, principalmente, o aumento das populações de inimigos naturais, mas também como supressora de insetos, ácaros, nematoides, bactérias, fungos e vírus (MARQUES et al., 2011; SALINAS-SANCHEZ, 2012).

Tagetes erecta é uma planta herbácea anual, originária do México, apresenta flores de cheiro forte e característico. Atinge cerca de 20-80 cm de altura, é ereta, ramificada de hastes glabras e ocas. Suas folhas são compostas, pinadas e cartáceas, as flores surgem a partir de pedúnculos, de formato em capítulos grandes dobrados e solitários, de coloração amarelo, laranja ou marrom-avermelhado (LORENZI, 2015). São classificadas de duas formas: flores “externas”, cujas pétalas têm formato de lingueta, e “internas”, cuja aparência é a de pequenos pontos marrons no centro da inflorescência. As primeiras, ocupam a região exterior da cabeça da flor, e são geralmente inférteis, cumprindo função atrativa e as flores “internas”, têm as pétalas pouco desenvolvidas, sua função é reprodutiva e, por isso, são muito mais numerosas, cerca de 250 flores (GORSKI, 2014).

É utilizado como planta atrativa a inimigos naturais, promovendo aumento de biodiversidade. Flores do cravo amarelo plantadas em bordaduras de cultivo de cebola, promoveram maior riqueza e abundância de parasitoides, comparadas monocultivos de apenas cebola (SILVEIRA, 2009). Em cultivo de alface, presença das flores no campo, aumentou o tamanho do corpo e a biomassa de inimigos naturais, aumentou o número de ligações ecológicas (compreendido pelo número de ligações tróficas entre todas as espécies na cadeia alimentar), o número médio de presas para espécies de inimigos naturais e o número médio de inimigos naturais por presa, a taxa de onivoria e o comprimento da cadeia alimentar na complexidade de artrópodes (HARO et al., 2018).

Por outro lado, o cravo amarelo também é relatado como planta hospedeira para oviposição de *Helicoverpa armigera* Hübner, 1805 (Lepidoptera: Noctuidae) e usado com sucesso como planta armadilha para este inseto (PATEL; YADAV, 1992; SRINIVASAN et al., 1994). Além disso, três extratos de folhas de *T. erecta*, hexano (48%), acetona (60%) e etanol (72%), causaram mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. (Lepidoptera: Noctuidae) (SALINAS-SÁNCHEZ et al., 2012), e o óleo essencial revelou atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (*stegomyia*) (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) (MARQUES et al., 2011).

Vale destacar que o cravo amarelo é uma planta aromática, que possui metabólitos secundários, que não estão diretamente envolvidos no metabolismo de crescimento ou reprodução da planta, mas na defesa contra insetos (SINGH et al., 2003). Em espécies de

cravo foram encontrados compostos flavonoides, carotenoides, álcoois triterpênicos, esteróis, taninos e saponinas, mucilagem e resina (YASHESHWAR et al., 2017). Na espécie *T. erecta* Haro et al. (2014) encontraram 29 compostos nas folhas e 25 nas flores, o monoterpene piperitone e o Cymen-8-ol-(p), foram os compostos de maior abundância nas folhas e flores.

A seleção de plantas hospedeiras para alimentação, oviposição ou abrigo para insetos fitófagos ou herbívoros e outros organismos envolve a detecção de compostos voláteis orgânicos (COVs) emitidos pelas plantas. Esses compostos são originados dos vegetais, cuja produção pode ser natural ou induzida pela herbívora (KARBAN; BALDWIN, 1997). As plantas liberam COVs no ambiente a partir dos órgãos como folhas, flores e raízes. Os COVs são sistemas defensivos das plantas contra insetos, que podem proteger as plantas nas interações tritróficas pela atração de inimigos naturais, que exploram estes voláteis para localizar suas plantas hospedeiras em uma determinada distância, para a alimentação, acasalamento e oviposição (BENGTSSON et al., 2006; PINERO; DORN, 2009; CHA et al., 2008; SOLE et al., 2010).

Plantas atacadas por herbívoros produzem um grupo de COVs chamados de voláteis de plantas induzidas por herbívoro (VPIHs), que podem incluir semioquímicos ou sinais químicos naturais que mediam mudanças no comportamento e desenvolvimento dos insetos. Estes sinais podem atuar como repelentes para herbívoros e atrativos para organismos antagônicos a essas pragas, como predadores e parasitoides (PICKETT et al., 2006; KHAN et al., 2008).

Conhecer e identificar esses voláteis é um pré-requisito para compreender a comunicação química entre plantas e insetos (RANDLKOFER et al. 2010; BECK 2012). A habilidade dos insetos em reconhecer e responder aos sinais químicos, seja pela busca de uma planta por recursos alimentares ou pela localização do hospedeiro, e assim distinguí-los de outros odores, indica que os voláteis emitidos pela planta na tentativa de evitar danos por herbivoria são claramente distintos daqueles liberados em resposta a outros estímulos (PARÉ; TUMLINSON, 1999).

Os parasitoides exploram estes voláteis para localizar recursos florais e hospedeiros, dentre outros atributos. Fêmeas do *Microplitis mediator* (Haliday, 1834) (Hymenoptera: Braconidae) buscam por pistas olfativas de *Centaurea cyanus* L. (Asteraceae) para localizar as flores abertas (GÉNEAU et al., 2013), bem como buscam por pistas olfativas para detectar voláteis induzidos nas plantas após ataque de fitófagos (SHIOJIRI et al., 2000; SMID et al., 2002). Para selecionar hospedeiros, fêmeas de *Aphidius colemani* Viereck, 1912

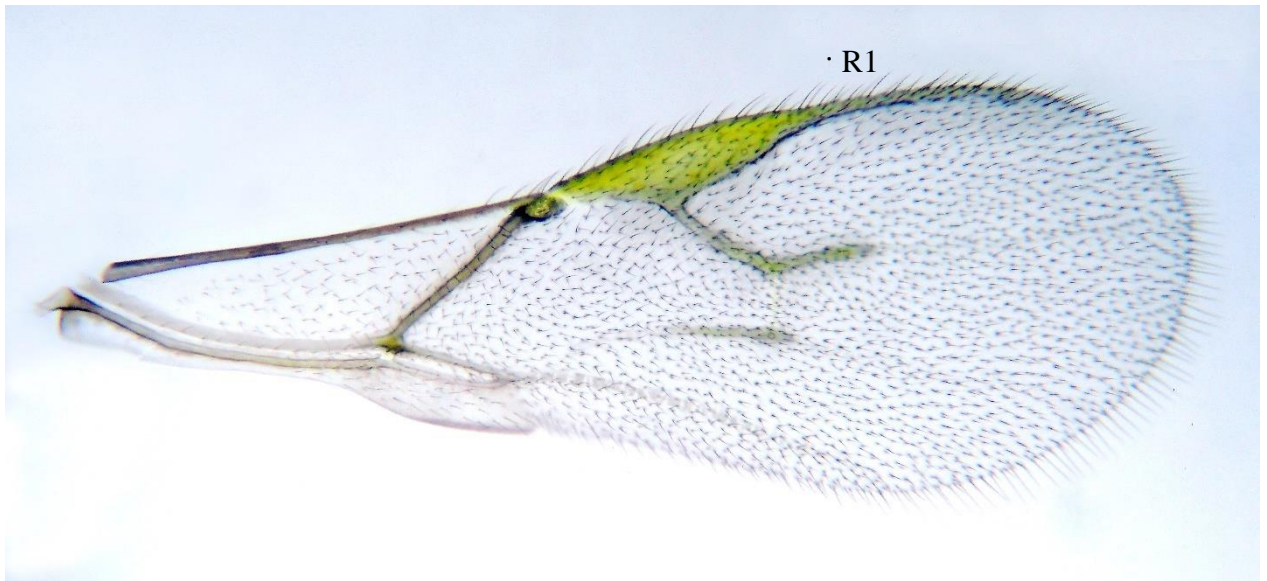
(Hymenoptera: Braconidae) prefere plantas danificadas por afídeos hospedeiros do que por lagartas (SILVA et al., 2016).

Aphidius platensis Brethes, 1913 (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) é uma pequena vespa que mede 2,0 mm de comprimento, classificado como um membro do complexo faunístico Neotropical (STARÝ, 1969; TOMANOVIĆ et al., 2014). Descrito como uma espécie nativa da América do Sul (STARÝ, 1969), mas de acordo com Tomanović et al. (2014), provavelmente, é originário do Mediterrâneo e, posteriormente, foi expandido para áreas de climas subtropicais/tropicais.

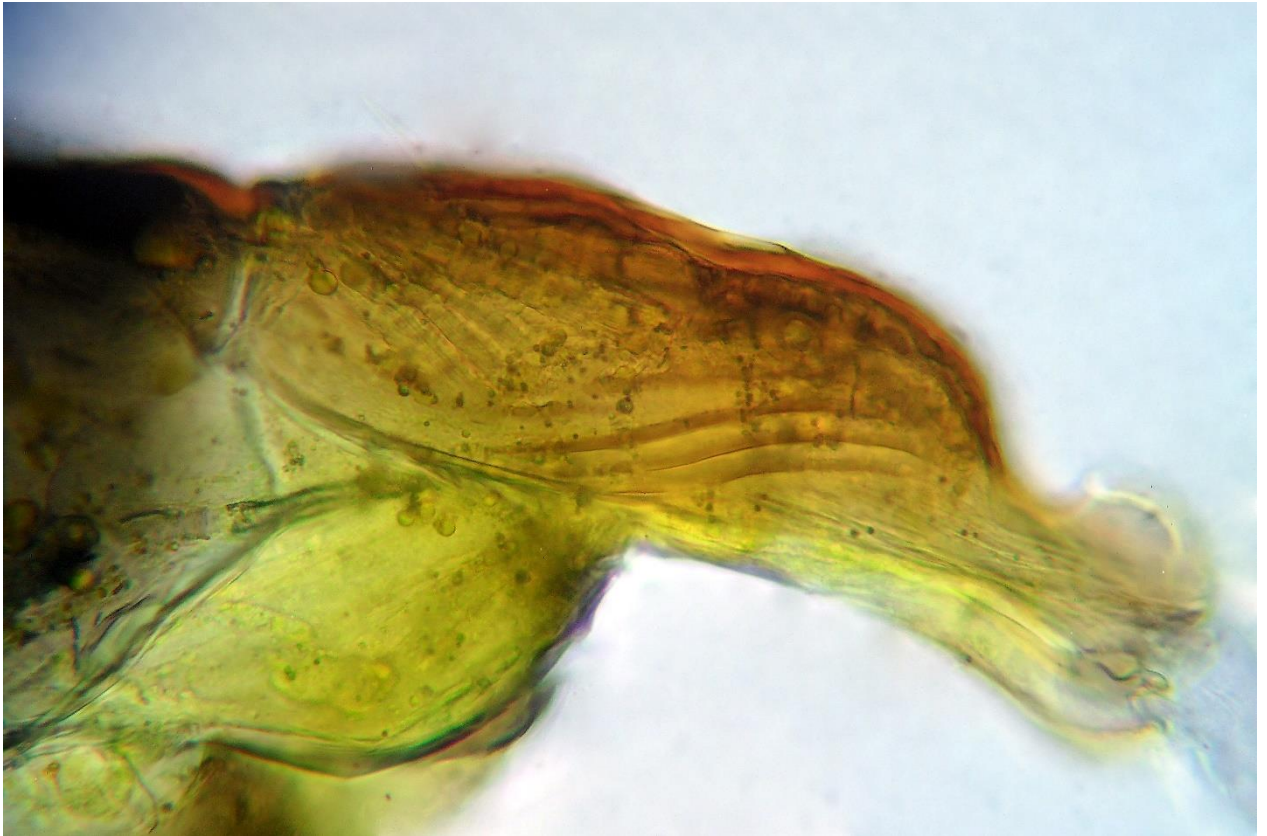
É um endoparasitoide solitário de diversos pulgões (Hemiptera: Aphididae) de importância agrícola, (TOMANOVIĆ et al., 2014). Explora seus hospedeiros de forma coinobionte, pois permite que o hospedeiro cresça e continue a se alimentar após o parasitismo, até a formação de múmias. Os adultos são de vida livre, semelhantes a outros parasitoides, se alimentando de substâncias açucaradas como néctar e pólen (JERVIS et al., 2004).

Por compartilhar algumas características morfológicas e ter em comum vários hospedeiros, *A. platensis* foi muitas vezes identificado como a espécie *A. colemani*. As principais diferenças entre eles são: em *A. platensis* a veia R1 da asa anterior mede, aproximadamente, menos de um terço do comprimento do estigma (FIGURA 1), sendo este mais estreito; o pecíolo é mais largo, com ranhuras nitidamente costadas, em forma de costelas (FIGURA 2) (TOMANOVIĆ et al., 2014). Além disso, toda a área do estigma é fortemente amarela em *A. platensis* (FIGURA 1) do que em *A. colemani*, que apresenta coloração marrom claro (Observação pessoal).

Figura 1 – Asa de *Aphidius platensis*.



Fonte: Luís Cláudio Paterno Silveira, 2015.

Figura 2 – Pecíolo de *Aphidius platensis*.

Fonte: Luís Cláudio Paterno Silveira, 2015.

Os parasitoides normalmente respondem aos habitats florais, sua exigência nutricional é a base de aminoácidos, vitaminas, sais minerais, carboidratos, lipídios e esteróis (GARCIA, 1991), que podem estar disponíveis no pólen e néctar das flores.

Insetos gastam energia constantemente, o glicogênio é uma das reservas de energias em células animais. O glicogênio, pode ser prontamente degradado sob demanda para ser usado como um combustível de energia (STEELE, 1983). O lipídio é sempre o principal componente do corpo de gordura, representa mais de 50% do peso do inseto (ZIEGLER, 1991). O glicogênio pode ser quase esgotado após a metamorfose, e o adulto recupera o armazenamento de glicogênio, quando inicia a alimentação (LORENZ; ANAND, 2004; ZIEGLER, 1991). As reservas lipídicas permanecem estáveis durante os últimos estádios larvais e são transportadas para as pupas e após os adultos.

O néctar floral e extrafloral pode maximizar a longevidade, a fecundidade, a capacidade de busca por presas e as taxas de parasitismo da maioria dos inimigos naturais, além de aumentar a razão sexual para fêmeas (BERNDT; WRATTEN, 2005; IRVIN et al., 2006; HOGG et al., 2011)

O cravo amarelo tem vários atributos para atrair parasitoides, seja por suas flores de coloração vistosa, pela presença de néctar, pólen, presas alternativas, compostos voláteis ou a combinação de um ou mais destes fatores. No entanto, apesar de ser uma planta estudada em sistemas diversificados, ainda não foi esclarecido quais são os fatores determinantes para atração e manutenção de parasitoides. Estas informações possibilitarão aprimorar a utilização da planta na atração e/ou manutenção dos parasitoides, com foco em *A. platensis*.

Com foco na conservação do parasitoide *A. platensis* não existem informações a respeito do efeito das flores do cravo amarelo na taxa de parasitismo, no comportamento de forrageamento, na sobrevivência e como fonte de nutrientes e de compostos orgânicos voláteis. Assim, é importante elucidar o papel do cravo amarelo na diversificação vegetal, como estratégia economicamente viável e sustentável, com função de atrair e manter o parasitoide e melhorar sua eficácia na regulação de populações de pulgões.

Em função do exposto, os principais questionamentos a serem esclarecidos no presente trabalho são: a) A exposição de *A. platensis* ao cravo amarelo influencia no comportamento de parasitismo sobre duas espécies de pulgões hospedeiros?; b) A exposição de *A. platensis* ao cravo amarelo aumenta a sobrevivência do parasitoide?; c) O cravo amarelo é fonte de nutrientes para o parasitoide *A. platensis*?; d) O cravo amarelo em floração atrai o parasitoide *A. platensis*?; e) O cravo amarelo em floração junto com o pimentão atrai o parasitoide *Aphidius platensis*?; f) A injúria do pulgão *Myzus persicae* em plantas de pimentão atrai o parasitoide *Aphidius platensis*?; g) A atração do parasitoide pelo cravo amarelo em floração não é afetado pelo dano do pulgão?

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL, F. N. P. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2018.

AGROFIT, Sistema de agrotóxicos fitossanitários. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em:
<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 07 abr. 2018.

ALASERHAT, Í.; CANBAY, A. Aphididae species, their parasitoids, predators, and parasitism rates on pepper (*Capsicum annuum* L.). **Entomological News**, v. 127, n. 1, p. 36–50, 2017.

AL-MOUSAWI, A. H.; RICHARDSON, P. E.; BURTON, R. L. Ultrastructural studies on greenbug (Hemiptera: Aphididae) feeding damage to susceptible and resistant wheat cultivars. **Annals of the Entomological Society America**, v. 71, p. 964–971, 1983.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. Brasília, 2016. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8>. Acesso em: 08 abr. 2018.

BALMER, O.; GÉNEAU, C. E.; BELZ, E.; WEISHAUPT, B.; FÖRDERER, G.; MOOS, S.; DITNER, N.; JURIC, I.; LUKA, H. Wildflower companion plants increase pest parasitism and yield in cabbage fields: experimental demonstration and call for caution. **Biological Control**, v. 76, p. 19-27, 2014.

BAKER, H. G.; BAKER, I. A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: BENTLEY, B.; ELIAS, T. **The biology of nectaries**, 1st edn. New York: Columbia University, 1983, p. 126-152.

BARBOSA, P. **Conservation biological control**. San Diego: Academic, 1998. 396 p.

BECK, J. J. Addressing the complexity and diversity of agricultural plant volatiles: a call for the integration of laboratory-and field-based analyses. **Journal of agricultural and food chemistry**, vol. 60, n. 5, p. 1153–1157, 2012.

BEGUM, M.; GURR, G. M.; WRATTEN, S. D.; HEDBERG, P.; NICOL, H. I. Using selective food plants to maximize biological control of vineyard pests. **Journal of Applied Ecology**, v. 43, n. 3, p. 547-554, 2006.

BENGTSSON, M.; JAASTAD, G.; KNUDSEN, G.; KOBRO, S.; BÄCKMAN, A. C.; PETTERSSON, E.; WITZGALL, P. Plant volatiles mediate attraction to host and non-host plant in apple fruit moth, *Argyresthia conjugella*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 118, n. 1, p. 77-85, 2006.

BERNDT, L. A.; ANDWRATTEN, S. D. Effects of alyssum flowers on the longevity, fecundity, and sex ratio of the leafroller parasitoid *Dolichogenidea tasmanica*. **Biological Control**, v. 32, n. 1, p. 65-69, 2005.

BLACKMAN, R. L.; EASTOP, V. E. **Aphids on the world's crops**. Chichester: J. Wiley, 2000. 466 p.

BLANC, S.; UZEST M.; DRUCKER M. New research horizons in vector-transmission of plant viruses. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 4, p. 483-491, 2011.

CHA, D. H.; NOJIMA, S.; HESLER, S. P.; ZHANG, A.; LINN, C. E.; ROELOFS, W. L.; LOEB, G. M. Identification and field evaluation of grape shoot volatiles attractive to female grape berry moth (*Paralobesia viteana*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 9, p. 1180-1189, 2008.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. 421 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló**. Lavras: UFLA, 2003. 304 p.

FONTES, P. C. R.; DIAS, E. N.; SILVA, D. J. H da. Dinâmica do crescimento, distribuição de matéria seca e produção de pimentão em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 94-99, 2005.

GÉNEAU, C. E.; WÄCKERS, F. L.; LUKA, H.; BALMER, O. Effects of extrafloral and floral nectar of *Centaurea cyanus* on the parasitoid wasp *Microplitis mediator*: olfactory attractiveness and parasitization rates. **Biological Control**, vol. 66, p.16-20, 2013.

GORSKI, F. T. *Tagetes erecta*, cravo-de-defunto. In: GORSKI, F. T. Jardim de Calateia: arte, paisagem, natureza e cidade. 2014. Disponível em:
<<http://jardimdecateia.com.br/acervo-botanico/tagetes-erecta-cravo-de-defunto/>>. Acesso em: 08 abr. 2018.

GURR, G. M.; WRATTEN, S. D.; ALTIERI, M. A. Ecological engineering, habitat manipulation and pest management. In: GURR, G. M.; WRATTEN, S. D.; ALTIERI, M. A. **Ecological Engineering for Pest Management: Advances in habitat manipulation for arthropods**. Collingwood, Victoria, Australia: CSIRO, 2004, p. 1-12.

HARO, M. M. Chemical, spatial and temporal characteristics of *T. erecta* floral resources mediating agricultural food webs. 2014. 154 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavra, 2014.

HARO, M. M.; SILVEIRA, L. C. P.; WILBY, A. Stability lies in flowers: plant diversification mediating shifts in arthropod food webs. **PloS one**, v. 13, n. 2, e0193045, 2018.

HEIDEN, G.; BARBIERI, R.L.; COUTO, M.E.O.; MEDEIROS, A.R.M.; SINIGAGLIA, C. Pimentas e pimentões do sul do Brasil: variedades crioulas mantidas pela Embrapa Clima Temperado. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.1, p. 841-844, 2007.

HERRON, G. A.; COOK, D. F. Initial verification of the resistance management strategy for *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) in Australia. **Australian Journal of Entomology**, Wellington, v. 41, n. 2, p. 180–182, 2002.

HOGG, B. N.; NELSON, E. H.; MILLS, N. J.; DAANE, K. M.. Floral resources enhance aphid suppression by a hoverfly. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 141, n. 2, p. 138-144, 2011.

IRVIN, N. A.; SCARRATT, S. L.; WRATTEN, S. D.; FRAMPTON, C. M.; CHAPMAN, R. B.; TYLIANAKIS, J. M. The effects of floral understoreys on parasitism of leafrollers (Tortricidae: Lepidoptera) on apples in New Zealand. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 8, n. 1, p. 25-34, 2006.

JERVIS, M. A.; LEE, J. C.; HEIMPEL, G. E. Use of behavioural and life-history studies to understand the effects of habitat manipulation. In: GURR, G. M.; WRATTEN, S.; ALTIERI, M. **Ecological engineering for pest management: advances in habitat manipulation for arthropods**. Collingwood, Australia: CSIRO, 2004, p. 65-100.

KARBAN, R.; BALDWIN, I. T. **Induced responses to herbivory**. Chicago & London: The University of Chicago, 1997. 330p.

KHAN, Z. R.; JAMES, D. G.; MIDEGA, C. A. O.; PICKETT, J. A. Chemical ecology and conservation biological control. **Biological Control**, vol. 45, n. 2, p. 210-224, 2008.

LANDIS, D. A.; WRATTEN, S. D.; GURR, G. M. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 175–201, 2000.

LORENZ, M. W.; ANAND, A. N. Changes in the biochemical composition of fat body stores during adult development of female crickets, *Gryllus bimaculatus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 56, n. 3, p. 110-119, 2004.

LORENZI, H. **Plantas para jardim no Brasil: herbáceas, arbustivas e trepadeiras**, 2 ed. Nova Odessa, SP: Intituto plantarum, 2015.

MALDONADO, V. Cultivar hortaliças e frutas. 5. ed. Pelotas: Cultivar, 2001. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=100>>. Acesso em: 7 abr. 2018.

MARQUES, M. M.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, Í. G.; VIEIRA, M. G.; SILVA, A. R. A.; DE ALMEIDA, R. R.; GUEDES, M. I. F. Larvicidal activity of *Tagetes erecta* against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 27, n. 2, p. 156–158, 2011.

MARTINS, I.; SILVA, R.; ALENCAR, J.; SILVA, K.; CIVIDANES, F.; DUARTE, R. Interactions between the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) and the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae) on *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 3, p. 933-938, 2014.

MICHELSONS Jr, G. J. Gramineous North American host plants of the greenbug with notes on biotypes. **Southwestern Entomologist**, v. 11, p. 55-66, 1986.

MOHAMMED, A. A.; HATCHER, P. E. Combining entomopathogenic fungi and parasitoids to control the green peach aphid *Myzus persicae*. **Biological Control**, v. 110, p. 44– 55, 2017.

NICOLSON, S. W.; THORNBURG, R. W. Nectar chemistry. In: NICOLSON, S. W.; NEPI, M.; PACINI, E. **Nectaries and nectar**. The Netherlands: Springer, 2007, p. 215-264.

NUESSLY, G. S.; NAGATA, R. T. Greenbug, *Schizaphis graminum* (Rondani) (Insecta: Hemiptera: Aphididae). In: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 2005. Available via website. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN63400.pdf>. Cited 11 Oct 2017

PARÉ, P.; TUMLINSON, J. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology**, vol. 121, n. 2, p. 325-331, 1999.

GARCIA, M. A. Ecologia nutricional de parasitóides e predadores terrestres. In: PANIZZI, R.; PARRA, J. R. P (Ed.). *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. Brasília: Manole, 1991. 360 p.

PATEL, R. K.; YADAV, D. N. Impact of intercropping marigold on *Heliothis armigera* Hubner and its natural enemies in seed crop of tobacco. **Tobacco Research**, v. 18, n. 1/2, p. 65-72, 1992.

PAVELA, R. Essential oils from *Foeniculum vulgare* Miller as a safe environmental insecticide against the aphid *Myzus persicae* Sulzer. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 11, p. 10904-10910, 2018.

PEÑA-MARTINEZ, R. Identificación de afidos de importância agrícola. In: URIAS-M, C.; RODRÍGUEZ-M, R.; ALEJANDRE-A, T. **Afidos como vectores de virus en México**. México 392-393: Centro de Fitopatología, Montecillo, 1992. v. 2, cap. 1. p. 1-135.

PICKETT, J. A.; BRUCE, T. J. A.; CHAMBERLAIN, K.; HASSANALI, A.; KHAN, Z. R.; MATTHES, M. C.; NAPIER, J. A.; SMART, L. E.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. Plant volatiles yielding new ways to exploit plant defence. In: DICKE, M. TAKKEN, W. **Chemical ecology: from gene to ecosystem**. The Netherlands: Springer, 2006, p. 161-173.

PINERO, J. C.; DORN, S. Response of female oriental fruit moth to volatiles from apple and peach trees at three phenological stages. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 131, n. 1, p. 67-74, 2009.

RANDLKOFER, B.; OBERMAIER, E.; HILKER, M.; MEINERS, T. Vegetation complexity – the influence of plant species diversity and plant structures on plant chemical complexity and arthropods. **Basic and Applied Ecology**, vol. 11, n. 5, p. 383-395, 2010.

ROULSTON, T'AI. H.; BUCHMANN, STEPHEN, L. A phylogenetic reconsideration of the pollen starch-pollination correlation. **Evolutionary Ecology Research**, v. 2, n. 5, p. 627-643, 2000.

SALINAS-SÁNCHEZ, D. O.; ALDANA-LLANOS, L.; VALDÉS-ESTRADA, M. E.; GUTIÉRREZ-OCHOA, M.; VALLADARES-CISNEROS, G.; RODRÍGUEZ-FLORES, E. Insecticidal activity of *Tagetes erecta* extracts on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 95, n. 2, p. 428-432, 2012.

SHIOJIRI, K.; TAKABAYASHI, J.; YANO, S.; TAKAFUJI, A. Herbivore-species-specific interactions between crucifer plants and parasitic wasps (Hymenoptera: Braconidae) that are mediated by infochemicals present in areas damaged by herbivores. **Applied Entomology and Zoology**, v. 35, n. 4, p. 519-524, 2000.

SILVA, S. E. B.; FRANÇA, J. F.; PAREJA, M. Olfactory response of four aphidophagous insects to aphid-and caterpillar-induced plant volatiles. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 10, n. 4, p. 331-340, 2016.

SILVEIRA, L. C. P.; BERTI-FILHO, E.; PIERRE, L. S. R.; PERES, S. C.; LOUZADA, J. L. Marigold (*Tagetes erecta* L.) as an attractive crop to natural enemies in onion fields. **Scientia agrícola**, v. 66, n. 6, p.780-787, 2009.

SINGH, G.; SINGH, O. P.; DE LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. Studies on essential oils. Part 35: chemical and biocidal investigations on *Tagetes erecta* leaf volatile oil. **Flavour and fragrance journal**, vol. 18, n. 1, p.62-65, 2003.

SMID, H. M.; VAN LOON, J. J. A.; POSTHUMUS, M. A.; VET, L. E. M. GC-EAG-analysis of volatiles from Brussels sprouts plants damaged by two species of *Pieris* caterpillars: olfactory receptive range of a specialist and a generalist parasitoid wasp species. **Chemoecology**, vol. 12, n. 4, p.169-176, 2002.

SOLE, J.; SANS, A.; RIBA, M.; GUERRERO, A. Behavioural and electrophysiological responses of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* to host-plant volatiles and related chemicals. **Physiological Entomology**, v. 35, n. 4, p. 354-363, 2010.

SRINIVASAN, K.; KRISHNA MOORTHY, P. N.; RAVIPRASAD, T. N. African marigold as a trap crop for the management of the fruit borer *Helicoverpa armigera* on tomato. **International Journal of Pest Management**, v. 40, n. 1, p. 56-63, 1994.

STANLEY, G.; LINSKENS, H. F. Pollen: biology, biochemistry and management. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 1974. 310 p.

STARÝ, P. Biology of aphid parasites (Hymenoptera: Aphidiidae) with respect to integrated control. **Anzeiger für Schädlingskunde**, vol. 42, n. 12, p. 190, 1969.

STEELE, J. E. Endocrine control of carbohydrate metabolism in insects. **Endocrinology of Insects**, v. 1, p. 427-39, 1983.

TOMANOVIĆ, Ž; PETROVIĆ, A.; MITROVIĆ, M.; KAVALLIERATOS, N. G.; STARÝ, P.; RAKHSHANI, E.; RAKHSHANIPOUR, M.; POPOVIĆ, A.; SHUKSHUK, A. H.; IVANOVIĆ, A. Molecular and morphological variability within the *Aphidius colemani* group with redescription of *Aphidius platensis* Brethes (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). **Bulletin of Entomological Research**, vol. 104, p. 552-565, 2014.

- UMINA, P. A.; EDWARDS, O.; CARSON, P.; ROOYEN, A. V.; ANDERSON, A. High levels of resistance to carbamate and pyrethroid chemicals widespread in Australian *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations. **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 4, p. 1626-1638, 2014.
- VAN LENTEREN, J. C. A greenhouse without pesticides: fact or fantasy? **Crop Protection**. v. 19, n. 6, p. 375-384, 2000.
- VENZON, M.; ROSADO, M. D. C.; EUZÉBIO, D. E.; PALLINI, A. Controle biológico conservativo. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. **Controle alternativo de doenças e pragas**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2005. p. 1-22.
- WHALON, M. E.; MOTA-SANCHEZ, D.; HOLLINGWORTH, R. M. Analysis of global pesticide resistance in arthropods. In: WHALON, M. E.; MOTA-SANCHEZ, D.; HOLLINGWORTH, R. M. **Global pesticide resistance in arthropods**. Wallingford, United Kingdom: CABI, 2008. p. 5-31.
- WILKINSON, T. K.; LANDIS, D. A. Habitat diversification in biological control: the role of plant resources. In: WÄCKERS, F. L.; VAN RIJN, P. C. J.; BRUIN, J. **Plant Provided Food and Plant-Carnivore Mutualism**. Cambridge, UK: Cambridge University, 2005, p. 305-325.
- YASHESHWARA, S. U.; SHARMAA, M.P. KHAN, W.; AHMAD, S. Variation in ornamental traits, physiological responses of *Tagetes erecta* L. and *T. patula* L. in relation to antioxidant and metabolic profile under deficit irrigation strategies. **Scientia Horticulturae**, v. 214, p. 200-208, 2017.
- ZIEGLER, R. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 161, n. 2, p. 125-31, 1991.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**ARTIGO 1 EFFECTS OF MARIGOLD ON THE BEHAVIOR, SURVIVAL AND NUTRIENT RESERVES OF *APHIDIUS PLATENSIS***

Ivana Lemos Souza¹; Rosângela Cristina Marucci¹; Luis Cláudio Paterno Silveira¹; Nágila Cristina Paixão de Paulo¹; Jana C. Lee²

¹ Universidade Federal de Lavras Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Entomologia, Avenida Doutor Sylvio Menicucci, 1001, Kennedy, 37200-000, Lavras, MG, Brazil, ilemossouza@gmail.com

² USDA ARS Horticultural Crops Research Unit, 3420 NW Orchard Ave., Corvallis, Oregon, USA, jana.lee@ars.usda.gov

Corresponding author: Ivana Lemos Souza

Este artigo foi escrito de acordo com o padrão de BioControl para o qual foi submetido e aceito. DOI: 10.1007/s10526-018-9882-8

Abstract

Marigolds (*Tagetes erecta* L.) suppress nematodes and are attractive companion plants, but their role in biological control is unknown. We evaluated how exposure to marigold blooms impacts the aphid parasitoid, *Aphidius platensis* Brethes. Female wasps previously exposed to marigold spent more time walking and parasitizing *Myzus persicae* Sulzer or *Schizaphis graminum* Rodani aphids, and subsequently had higher parasitism rates. Meanwhile, completely starved wasps spent more time stationary and marginally more time grooming. Time spent probing, emergence rate, and sex ratio were not affected. Wasp survival was best on honey, followed by marigold, and lowest on non-blooming marigolds. Nutrient reserves of wasps given honey, aphid-infested marigold, or marigold alone were compared to newly-emerged unfed wasps. Their resulting lipid, glycogen and sugar levels were similar, suggesting that these foods helped wasps maintain reserves similar to emergence levels. These results suggest that marigold may improve biological control of aphids by *A. platensis*.

Keywords

Biological control, Flower, Nectar, Parasitoid, Parasitism

Introduction

Aphids are among the most economically-important crop pests worldwide (Giordanengo et al. 2010). They are prolific due to their high reproductive capacity and short developmental time (Bueno 2005). The green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), attacks a wide variety of agronomic crops including those in the Solanaceae family (Capinera 2001). The greenbug or wheat aphid, *Schizaphis graminum* Rondani, feeds on a range of 70 graminaceous species in the Poaceae family (Michels 1986; Nuessly and Nagata 2005).

In addition to plant feeding, these aphids cause serious crop loss by vectoring plant viruses. In neotropical regions, *Aphidius platensis* Brethes (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) is a parasitic wasp that attacks aphids of economic importance (Starý 1975; Tomanovic et al. 2014). It is thought to originate from India, and has since been introduced in Africa, South America, and Australia. *Aphidius platensis* is a solitary koinobiont endoparasitoid, pupating within the body of the host.

Floral resources have been recommended to enhance parasitism and biological control of pests (Landis et al. 2000; Heimpel and Jervis 2005). For example, floral diversification has led to higher parasitism of pests in urban shrubs (Ellis et al. 2005), and even reduced crop damage and improved yield in cabbage (Balmer et al. 2014). Floral feeding may increase parasitism via non-exclusive mechanisms: feeding improves a parasitoid's ability to locate

hosts, extends its longevity, and increases its nutrient reserves. The success of a parasitoid depends on its capacity to recognize suitable hosts and parasitize them. Yet, adult parasitoids must balance short-term nutritional needs with host searching (Lewis et al. 1998). Sugar-feeding enables wasps to forage more than starved wasps in a flight chamber (Wackers 1994), so floral resources may also increase parasitoid foraging in the field.

In a review of 104 plant species, many floral species extend the longevity of parasitic wasps (Russell 2015). The majority of adult parasitoids must consume plant-derived foods such as floral nectar and pollen for maintenance (Jervis et al. 2004). Floral nectar contains amino acids, vitamins, minerals, sugar, glycogen, and lipids (Baker and Baker 1983; Nicolson and Thornburg 2007). Not surprisingly, parasitic wasps that consume floral nectar have higher energetic reserves of lipid, glycogen, and sugar than starved wasps (Eijs et al. 1998; Lee et al. 2004). These nutrients are essential for many functions. Glycogen and sugars often fuel flight in insects (Hahn and Denlinger 2007), and wasps fed dill nectar fly further than water or sucrose-fed wasps in a flight mill (Wanner et al. 2006). Lipid is essential for insect growth and reproduction and provides energy during extended non-feeding periods (Arrese and Soulages 2010). Sugar feeding enables individual wasps to lay more eggs in hosts while foraging freely in fields (Lee et al. 2008b; Segoli et al. 2013). A food shortage may cause females to resorb eggs and redirect energy into survival, thus reducing fecundity (Rivero and Casas 1999).

In selecting a floral resource, the flower must be attractive and beneficial to the specific natural enemy. For instance, sweet alyssum, *Lobularia maritima* (L.) Desv., benefits some wasps (Berndt and Wratten 2005; Balzan and Wackers 2013; Irvin and Hoddle 2007) but not others (Nafziger and Fadamiro 2011; Rahat et al. 2005). The marigold, *Tagetes erecta* Linn. (Asteraceae), is an annual herbaceous plant that is used for its secondary metabolites that can suppress insects, mites, nematodes, bacteria, fungi, and viruses (Salinas-Sanchez 2012). ‘Nema-gone’ marigolds (Burpee©, Warminster, Pennsylvania, USA) are marketed for killing nematodes in the soil. Marigolds are also grown as an agronomic crop because the petals are a source of natural dye (Singh et al. 2003) and oil extracts can be lethal to mosquito larvae (Namrata et al. 2000). A few studies suggest that marigolds can also benefit pest control. Marigolds planted adjacent to onions promote greater richness and abundance of parasitoids compared to onion monocrops (Silveira 2009). A large diversity of parasitoid families are found in marigold lines (Sampaio et al. 2008), and Asteraceae flower heads in

Brazil (Nascimento et al. 2014). A related marigold, *Tagetes patula*, extends the longevity of a *Trissolcus* wasp in a laboratory study (Rahat et al. 2005).

To our knowledge, no studies have examined how marigolds directly affect parasitism behavior, nor focused on conservation of *A. platensis*. Therefore, our objectives were to determine whether exposure to blooming marigold: 1a) influences the behavior of *A. platensis* among an aphid-host patch, and 1b) increases the parasitism rate; 2) increases survival of *A. platensis*; and 3) elevates the lipid, glycogen and sugar reserves of *A. platensis*.

MATERIAL AND METHODS

Insects

The colony of *A. platensis* wasps was maintained at the Biological Control laboratory at the Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brazil. Parasitoids were reared on *Myzus persicae* aphids on sweet pepper *Capsicum annuum* L. Resulting mummies were placed individually in Petri dishes of 10 cm diameter, sealed with plastic wrap, and held at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ RH and L:D 12:12 h. Mummies were checked daily for wasp emergence for experimental use. A colony of *Schizaphis graminum* aphids were reared on sorghum *Sorghum bicolor* (L.) Moench for the behavior study.

Marigold and sweet pepper plants

Marigold, sweet pepper and sorghum plants were grown from seed on sterilized soil (Tropstrato HA Hortaliças, Vida Verde, Mogi Mirim-SP, Brazil) and watered daily in a greenhouse. When plants reached 10 to 15 cm in height they were transplanted to 2 l plastic vessels containing a mixture of field-collected soil (red Latosol, 3 parts soil and 1 part manure). Plants were fertilized every 15 days according to recommendations from the state of Minas Gerais (Ribeiro et al. 1999). At the time of experimentation, marigold plants were 65 days old and 1 m tall, and sweet pepper and sorghum plants were 35 days old and ~0.6 m tall.

Parasitoid behavior

Parasitoid foraging was tested among four treatment combinations with wasps having prior marigold exposure or not and presented one of two aphid species: 1) marigold exposure

then *M. persicae*, 2) marigold then *S. graminum*, 3) *M. persicae*, and 4) *S. graminum*. Each day, newly-emerged *A. platensis* were released in acrylic cages (30 x 30 x 60 mm) to allow mating, and either exposed to a potted blooming marigold or no plant. After 24 hours, wasps were removed and sexed using a hand lens. Only females were used in this behavior experiment with 15 replicate females per treatment, and 2 replicates per treatment tested per day.

One female was released in a foraging arena, a sealed plastic Petri dish (50 x 15 mm) containing a fitted leaf disc of sweet pepper with 20 2nd - 3rd instar *M. persicae* aphids on a bed of agar, or a sorghum disc with 20 *S. graminum* aphids. Each wasp was observed through a microscope at 8-160X magnification for 15 minutes. Behaviors in real-time were recorded in EthoLog 2.25 (Ottoni 2016), a software for transcription and timing of behavioral observation sessions. Behaviors included: (1) grooming - defined as cleaning the antennae, legs or ovipositor; (2) parasitizing-raising the antennae to a characteristic vertical position, bending of the ovipositor below the body, followed by prolonged touching of the ovipositor to the aphid; (3) probing-quick touch of the ovipositor on the aphid (< 1 second, may be repeated); (4) stationary-totally immobile; and (5) walking-moving around the leaf. While these aphids can produce honeydew, none of the presented aphids were observed to have honeydew droplets nor were *A. platensis* observed to feed on the aphids. After each observation, the wasp was removed. The plates containing aphids were transferred to new leaf discs every 2 days. Aphids were checked daily for the formation of the mummies and wasp emergence. Once emerged, adults were sexed, and percent parasitism, emergence rates from mummified aphids, and sex ratio were tabulated.

An ANOVA was run for each of the eight dependent variables: proportion of time spent grooming, parasitizing, probing, stationary, and walking; proportion parasitism, proportion emergence, and sex ratio. Each dependent variable was tested with flower exposure, aphid species, and the flower x aphid interaction as fixed effects with a normal distribution, which had a lower AIC value (Akaike 1974; negative values are smaller) relative to binomial or other distributions. The AIC values with a binomial and normal distribution were: grooming 25.6, -155.7, parasitizing 15.0, -326.5, probing 49.6, -61.8, walking 79.2, 9.3, stationary 51.3, -18.6, parasitism 73.6, -11.5, emergence 79.2, 50.4, and sex ratio 69.9, 58.0. While the model only included fixed effects, PROC GLIMMIX was used in SAS 9.3 (SAS Institute 2010) to test each model with various distributions; outcomes with normal distribution were identical to models run in PROC GLM. Proportion parasitism was regressed with the time spent parasitizing using PROC REG.

Parasitoid survival

Survival of *A. platensis* was compared among three treatments: 1) honey and non-blooming marigold, 2) blooming marigold, and 3) non-blooming marigold. Honey droplets were spread on the side of cages. To prevent wasps from dehydration, cotton balls soaked in water were placed in each cage to provide additional humidity. Fifteen cages per treatment were arranged in a completely randomized design. Ten newly emerged wasps, 5 females and 5 males, were released in each cage (15 x 21 x 23 cm) with a mesh-covered top. Fresh water was provided every 2 days and marigolds were replaced mid-experiment. Cut marigolds were kept in water-filled 250 ml plastic vials sealed with plastic wrap. Cages were monitored daily to record wasp mortality until all wasps died.

Survival is presented as Kaplan-Meier curves, and analyzed by log-rank using PROC LIFETEST. Since the treatment effect was significant, subsequent means separations were done by comparing each treatment pair using a Sidak adjustment.

Nutrient analyses

The lipid, glycogen, and sugar contents of male and female wasps were compared among four treatments: 1) newly-emerged wasps, and wasps held with 2) blooming marigold, 3) blooming marigold infested with *M. persicae*, or 4) honey. Newly-emerged wasps that have not fed served as a baseline control, 140 females and 112 males were frozen live at -80 °C as soon as they emerged. Meanwhile, other newly-emerged wasps were placed in cages (30 x 30 x 60 mm) and given various foods for 24 hours until freezing. Potted marigolds and honey droplets were presented in cages as in the survival study. The marigold with *M. persicae* treatment was added in this study to check whether *A. platensis* might obtain additional nutrients from aphid honeydew with floral nectar. Each treatment was replicated in 7 cages, with 20 live females and 16 males collected live per cage, with 252 wasps per treatment. There was an insufficient number of live wasps to collect after 1 day of starvation to include this fifth treatment for nutrient analysis. While it is possible that water provisioning may have enabled some starved *A. platensis* to live longer, it is unlikely that most of the 252 wasps would have survived to replicate this treatment consistently. Other parasitic wasps with access to water during starvation did not have improved or only slightly improved longevity

under ~25°C and 50-75% RH or in field cages (Idris and Grafius 1995, Leatiemia et al. 1995, Lee et al. 2008a, Jacob et al. 2006, Krugner et al. 2005, Dyer and Landis 1996).

Wasps were transported in vials of 95% ethanol on ice to the USDA-ARS Horticultural Research Crops Unit in Oregon, USA, and then stored at -80°C. Lipid levels of *A. platensis* were determined with a biochemical assay using a vanillin reagent (van Handel 1985b), and glycogen and sugar levels were determined using an anthrone reagent (van Handel 1985a). These methods were first developed for mosquitoes, and subsequently modified for hymenopteran parasitoids (Olson et al. 2000), and dipteran parasitoids (Fadamiro et al. 2005).

Because of the small size of *A. platensis*, a decreased volume of reagents was used to obtain readings. Preliminary trials showed that detectable readings occurred when two wasps were assayed together, thus two females or two males from the same cage treatment were assayed in pairs. Two wasps were placed in a 1.5 ml microcentrifuge tube with 13 µl of 2% sodium sulfate and crushed with a pestle. After adding 113 µl of chloroform-methanol (1:2), the pestle was removed. Contents were vortexed and then centrifuged for 2 minutes at 16,000 g to collect the glycogen precipitate at the bottom of the tube. The supernatant was transferred into 12 x 75 mm glass tubes used for lipid or sugar analysis. With other insects, such as *Diadegma insulare* Cresson (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Lee et al. 2004), the supernatant volume is divided in half for a lipid assay and a sugar assay. Due to low nutrient content, half of the samples with the entire supernatant were designated for a lipid assay, and the other half for a sugar assay. Thus, all wasps were assayed for glycogen, and only half of them were assayed for lipid or sugar levels. This assay protocol could detect differences in glycogen and sugar levels between honey-fed versus starved wasps using a related wasp of similar size, *Aphidius colemani* Viereck (Supplementary appendix A).

For the lipid assay, the supernatant was evaporated at 90°C for 3 minutes until the liquid evaporated. Then, 16 µl of sulphuric acid was added and heated at 90°C for 30 seconds. Then, 190 µl of vanillin reagent was added, mixed and kept at room temperature for 30 min. The vanillin reagent contains 700 mg 99% vanillin (CAS 121-33-5, Sigma-Aldrich), 400 ml of 85% phosphoric acid, and 100 ml of distilled water, with 100 mg more vanillin than in van Handel (1985b) for increased sensitivity. The solution was pipetted into a 96-well ELISA plate, the absorbance was read on a plate reader (ELX 808, BioTek, Winooski, Vermont, USA) at 490 nm. Readings were compared to a calibration line when reacting the vanillin reagent to 1, 5, 10, 20, 35 and 50 µg of the lipid standard (50 mg canola oil, 50 ml chloroform).

For the glycogen assay, 200 μ l of anthrone reagent was added to the precipitate, vortexed, and heated at 90°C for 3 min. The anthrone reagent contains 750 mg anthrone (CAS 90-44-8, Sigma-Aldrich), 380 ml sulfuric acid, and 150 ml distilled water (van Handel 1985a). For the sugar assay, the tube containing the supernatant was evaporated for 2 minutes at 90°C until ~20 μ l of solution remained. Then, 200 μ l of anthrone reagent was added, the solution vortexed, and heated for 3 minutes at 90°C. Both the glycogen and sugar assays were cooled in ice, and solutions pipetted into the ELISA plate. Absorbance at 630 nm was recorded and compared to calibration lines as described earlier using a glycogen standard (50 mg D glycogen, CAS, 9005-79-2, Fisher Scientific, 50 ml purified water) and sugar standard (50 mg sucrose, 50 ml 25% ethanol in water).

An analysis was run for each sex for each response variable: lipid, glycogen and sugar. Each response variable was tested with treatment as a fixed effect and the cage as a random effect, with either a normal or lognormal distribution where appropriate in PROC GLIMMIX. If a treatment effect was significant, means comparisons were done with Tukey HSD.

Results

Parasitoid behavior

The proportion of time *A. platensis* spent parasitizing and walking significantly increased with prior exposure to flowering marigold (Table 1). Wasps exposed to marigold parasitized 190% and walked 50% more than unexposed wasps [$100 \times (\text{avg. marigold} - \text{avg. no marigold}) / \text{avg. no marigold}$]. On the other hand, wasps without prior marigold exposure spent significantly more time stationary, and marginally more time grooming than marigold-exposed wasps (Table 1). Stationary time was 440% and grooming time was 130% longer in unexposed *A. platensis*. Since time spent parasitizing was higher with prior marigold exposure, it is not surprising that subsequent parasitism on these aphids was also affected (Table 1); parasitism was 155% higher with prior marigold exposure. Parasitism rates were also affected by the aphid species presented (Table 1); parasitism of *S. graminum* was 67% higher than that of *M. persicae*. Lastly, experimental treatments did not affect the time spent probing, emergence rates for mummified aphids, or sex ratio of offspring.

Parasitoid survival

Providing *A. platensis* various foods affected their survival (Fig. 1, $\chi^2 = 139.7$, d.f. = 2, $P < 0.0001$). Survival on honey was longer than on blooming marigold, and survival on either food was greater than on non-blooming marigold. On day 5, all parasitoids from non-blooming marigold were dead. Honey-provisioned wasps lived up to 18 days and blooming marigold provisioned wasps lived up to 16 days.

Nutrient analyses

Overall, lipid, glycogen, or sugar levels of wasps that were given food were not different from newly-emerged wasps. Lipid levels of *A. platensis* females and males did not differ among the four treatment groups (Table 2). Newly-emerged females had numerically the highest lipid level of 2.2 μg in an assay combining two females, or an estimated 1.1 μg per wasp (Fig. 2 a). Individual wasps had on average 0.6-1.1 μg of lipid. Glycogen levels of females and males also did not differ significantly, although trends were marginally significant in females (Table 2). Both honey-fed females and males had numerically higher glycogen levels than other wasps (Fig. 2 b). Individual wasps had on average 0.6-0.95 μg of glycogen. Interestingly, sugar levels were not affected by treatment for males, but were for females (Table 2). Females given access to marigold infested with *M. persicae* aphids had 180% higher sugar levels than females with marigold only (Fig. 2 c). Individual wasps had on average 0.15-0.6 μg of sugar.

Discussion

This study showed that *A. platensis* previously exposed to blooming marigold spent more time walking on the leaf and parasitizing *M. persicae* and *S. graminum* aphids than completely starved wasps. Consequently, they parasitized a greater proportion of aphids (Table 1); on average 6 *M. persicae* aphids were parasitized by floral-exposed wasps versus 2.2 by starved wasps, and 10 *S. graminum* versus 4, respectively. This increase in host search could be due to the parasitoid having more energy and is supported by the observation that starved wasps spent more time stationary. Alternatively, the increased host search could be due to marigold-exposed wasps having more eggs available, which was not assessed in this study. Starved *A. platensis* probed for a similar amount of time as fed wasps, and parasitized 11-20% of the 20 aphids, indicating that they had some eggs and some interest in hosts. In future studies, it would be worthwhile to see how various diets affect egg load by dissecting the ovaries of these small 1.7-2.3 mm wasps. Numerous past studies support that floral

sources increase parasitoid host foraging. Olfactometer studies reveal that sugar-fed wasps orient towards host cues (Jacob and Evans 2001; Siekmann et al. 2004; Takasu and Lewis 1993), although high levels of satiation reduce movement (Lightle et al. 2010). Wasps fed sugar or nectar have higher egg loads (Aduba et al. 2013; Araj and Wratten 2015; Tylianakis et al. 2004). While sugar feeding is expected to increase fecundity via increasing parasitoid lifespan, it has also increased the short-term activity of wasps to parasitize three times more hosts in 24 hours than unfed wasps (Mitsunaga et al. 2004), and 8% more in 5 hours (Géneau et al. 2013).

This study also revealed a difference in host suitability between two aphid pests, something not known previously. Female *A. platensis* spent similar time in ‘parasitizing’ behavior with both aphid species, but ultimately parasitized more *S. graminum* aphids than *M. persicae* during 15 minutes of observation. This may be related to the smaller 1.3-2.1 mm body size of *S. graminum* (Nuessly and Nagata 2005) compared to the larger 1.7-2.0 mm body size of *M. persicae* (Capinera 2001). During observations, the ovipositor of *A. platensis* would touch the body of *M. persicae* and slide off, suggesting that the parasitoid had more difficulty handling this aphid. Another parasitoid, *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae), attacked *Acyrtosiphon pisum* more than *Sitobion avenae* aphids (Hemiptera: Aphididae); and size was suggested to affect encounter rate and stabbing ability (Daza-Bustamante et al. 2003). In our study, both aphid species may have been suitable in terms of quality. Among mummified aphids, 50-69% successfully emerged into parasitoids, and 43-66% of offspring were female. Other *Aphidius* species showed similar trends. Emergence rates of *Aphidius gifuensis* (Ashmead) were similar among *M. persicae* and *S. avenae* (Pan and Liu 2014); emergence of *A. colemani* was similar among *Aphis gossypii* Glover and *M. persicae* even though *A. gossypii* was attacked more frequently (Sampaio et al. 2001).

Our survivorship study revealed that access to honey or blooming marigold extends the longevity of *A. platensis*. Wasps lived up to 18 days on honey, 16 days on marigold, and 5 days on non-blooming marigold. Access to flowers usually enhances parasitoid survival as reported in a meta-analysis (Russell 2015) and more recent studies (Araj and Wratten 2015; Zhu et al. 2015). Honey may have been a superior food source since it is comprised of carbohydrates (95%), proteins including enzymes and free amino acids (0.5%), and the rest in vitamins, minerals, aroma compounds and polyphenolic compounds (Alvarez-Suarez et al. 2009). Other lab studies have also found honey to benefit parasitoids more than floral nectar (Charles and Paine 2016; Davies et al. 2004; Irvin et al. 2007; Nafziger and Fadamiro 2011). Marigolds may have intermediate benefits because the nectar is oftentimes concealed, which

limits access. In a floral survey, Asteraceae flowers had less consistent effects on extending parasitoid lifespan because of its concealed anthers and nectar (Tooker and Hanks 2000). In addition, *Tagetes* spp. flowers could have secondary metabolites that are toxic to insects (Salinas-Sánchez et al. 2012).

Lastly, nutrient levels of *A. platensis* were examined to see if exposure to different sugar sources elevated their energetic storage. Parasitoids that feed on sugar solutions often have elevated glycogen and sugar (Fadamiro et al. 2005; Lightle et al. 2010; Zhang et al. 2011) and sometimes lipid levels compared to unfed parasitoids (Lee and Heimpel 2007). In this study, *A. platensis* exposed to various sugar-rich foods for 24 hours had similar nutrient levels as newly-emerged wasps; this suggests that feeding on these three food sources allowed wasps to maintain reserves similar to emergence levels. Additional nutrient assays of starved *A. platensis* at 1 day could further confirm the benefits of feeding. Nevertheless, assays with the related *A. colemani* show that starved wasps have lower glycogen or sugar levels than honey-fed wasps (Supplementary appendix A). Previous studies have not always found higher nutrient levels in wasps following floral exposure. Two braconid wasp species lived longer with buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench, but their carbohydrate levels were not statistically different from starved wasps (Aduba et al. 2013; Nafziger and Fadamiro 2011). In those studies, and our study, it is possible that ingested food is metabolized quickly before differences are detected, or prolonged exposure to food may be needed to build energetic stores. Lastly, one treatment stood out in our study. The sugar levels of females exposed to aphid honeydew and marigold (aphid-infested marigold) were two-fold higher than females with only marigold. Since aphid honeydew may be widely accessible in the field, it may be important for conserving *A. platensis*. Honeydew has increased the longevity of other parasitoid species, although it is often inferior to other sugar sources (Wäckers et al. 2008).

In summary, this study supports that marigolds may have a beneficial impact on *A. platensis* survival and parasitism activity, and that additional access to aphid honeydew leads to higher sugar reserves in *A. platensis*. Future studies are needed to determine whether honeydew also enhances longevity and parasitism, whether other floral species are more beneficial, and how attractive marigold and other flowers are to *A. platensis*. Based on a model incorporating the energy status and spatial distribution of parasitoids, floral attractiveness is key to enhancing biological control in the field (Bianchi and Wackers 2008). Further studies could also test marigolds in a banker system for increasing control of *S. graminum* aphids in cereal fields. Marigolds could provide nectar for adult *A. platensis* and *M. persicae* aphids for parasitoid reproduction and honeydew. This aphid species does not feed

on cereal crops and represents a viable way to continually maintain *A. platensis* parasitoids in the field for biological control.

Acknowledgements

We thank all people that work on DEN, UFLA especially to the Biological control and Conservation biological control laboratories. We thank the USDA-ARS Horticultural Crops Research Unit for facilitating a visit to perform part of the experiments, and J. Wong for comments, Hanna McIntosh and Katerina Velasco-Graham for reviewing the manuscript. This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) funding, travel by the Universidade Federal de Lavras Sandwich program, and nutrient assays by base funds USDA CRIS 2072-22000-040-00D.

REFERENCES

- Aduba OL, Olson DM, Ruberson JR, Hartel PG, Potter, TL (2013) Flowering plant effects on adults of the stink bug parasitoid *Aridelus rufotestaceus* (Hymenoptera: Braconidae). *Biol Control* 67:344-349
- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Auto Control* AC 19:716-723
- Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M (2009) Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Med J Nutrition Metab* 3:15-23
- Araj S-E, Wratten SD (2015) Comparing existing weeds and commonly used insectary plants as floral resources for a parasitoid. *Biol Control* 81:15-20
- Arrese EL, Soulages JL (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol* 55:207-225
- Baker HG, Baker I (1983) A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: Bentley B, Elias T (eds) *The biology of nectaries*, 1st edn. Columbia University Press, New York 126-152
- Balmer O, Géneau CE, Belz E, Weishaupt B, Förderer G, Moos S, Ditner N, Juric I, Luka H (2014) Wildflower companion plants increase pest parasitism and yield in cabbage fields: experimental demonstration and call for caution. *Biol Control* 76:19-27

- Balzan MV, Wäckers FL (2013) Flowers to selectively enhance the fitness of a host-feeding parasitoid: adult feeding by *Tuta absoluta* and its parasitoid *Necremnus artynes*. *Biol Control* 67:21-31
- Berndt LA, Wratten SD (2005) Effects of alyssum flowers on the longevity, fecundity, and sex ratio of the leafroller parasitoid *Dolichogenidea tasmanica*. *Biol Control* 32:65-69
- Bianchi FJJA, Wäckers FL (2008) Effects of flower attractiveness and nectar availability in field margins on biological control by parasitoids. *Biol Control* 46:400-408
- Bueno VHP (2005) Controle biológico de pulgões ou afídeos-praga em cultivos protegidos. *Inf Agropec* 26:9-17
- Capinera JL (2001) Green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Insecta: Hemiptera: Aphididae). In: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Available via website. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN37900.pdf>. Cited 29 Sep 2017
- Charles JJ, Paine TD (2016) Fitness effects of food resources on the polyphagous aphid parasitoid, *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *PLoS ONE* 11(1): e0147551
- Davies AP, Ceballos FA, Walter GH (2004) Is the potential of *Coccidoxenoides perminutus*, a mealybug parasitoid, limited by climatic or nutritional factors? *Biol Control* 31:181-188
- Daza-Bustamante P, Fuentes-Contreras E, Niemeyer HM (2003) Acceptance and suitability of *Acyrtosiphon pisum* and *Sitobion avenae* as hosts of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). *Eur J Entomol* 101:49-53
- Dyer LE, Landis DA (1996) Effects of habitat, temperature, and sugar availability on longevity of *Eriborus terebrans* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Environ Entomol* 25:1192-1201
- Eijs IEM, Ellers J, Van Duinen GJ (1998) Feeding strategies in drosophilid parasitoids: the impact of natural food resources on energy reserves in females. *Ecol Entomol* 23:133-138
- Ellis JA, Walter AD, Tooker JF, Ginzl MD, Reagel PF, Lacey ES, Bennett AB, Grossman EM, Hanks LM (2005) Conservation biological control in urban landscapes:

- manipulating parasitoids of bagworm (Lepidoptera: Psychidae) with flowering forbs. *Biol Control* 34: 99-107
- Fadamiro HY, Chen L, Onagbola EO, Graham LF (2005) Lifespan and patterns of accumulation and mobilization of nutrients in the sugar-fed phorid fly, *Pseudacteon tricuspis*. *Physiol Entomol* 30:212-224
- Géneau CE, Wäckers FL, Luka H, Balmer O (2013) Effects of extrafloral and floral nectar of *Centaurea cyanus* on the parasitoid wasp *Microplitis mediator*: olfactory attractiveness and parasitization rates. *Biol Control* 66:16-20
- Giordanengo P, Brunissen L, Rusterucci C, Vincent C, Van Bel A., Dinant S, Gironse C, Faucher M, Bonnemain JL (2010) Compatible plant-aphid interactions: how aphids manipulate plant responses. *C R Biol* 333:516-523
- Hahn DA, Denlinger DL (2007) Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. *J Insect Physiol* 53:760-773
- Heimpel GE, Jervis MA (2005) Does floral nectar improve biological control by parasitoids? In: Wäckers FL, van Rijn PCJ, Bruin J (eds) *Plant-provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications*. Cambridge University Press, Cambridge 267-304
- Idris AB, Grafius E (1995) Wildflowers as nectar sources for *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Environ Entomol* 24: 1726-1735
- Irvin NA, Hoddle MS (2007) Evaluation of floral resources for enhancement of fitness of *Gonatocerus ashmeadi*, an egg parasitoid of the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca vitripennis*. *Biol Control* 40:80-88
- Irvin NA, Hoddle MS, Castle SJ (2007) The effect of resource provisioning and sugar composition of foods on longevity of three *Gonatocerus* spp., egg parasitoids of *Homalodisca vitripennis*. *Biol Control* 40:69-79
- Jacob HS, Evans EW (2001) Influence of food deprivation on foraging decisions of the parasitoid *Bathyplectes curculionis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Ann Entomol Soc Am* 94:605-611

- Jacob HS, Joder A, Batchelor KL (2006) Biology of *Stethynium* sp (Hymenoptera: Mymaridae), a native parasitoid of an introduced weed biological control agent. *Environ Entomol* 35:630-636
- Jervis MA, Lee JC, Heimpel GE (2004) Use of behavioural and life-history studies to understand the effects of habitat manipulation. In: Gurr GM, Wratten S, Altieri M (eds) *Ecological engineering for pest management: advances in habitat manipulation for arthropods*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia 65-100
- Krugner R, Daane KM, Lawson AB, Yokota GY (2005) Biology of *Macrocentrus iridescens* (Hymenoptera: Braconidae): a parasitoid of the obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae). *Environ Entomol* 34:336-343
- Leatemia JA, Laing JE, Corrigan JE (1995) Effects of adult nutrition on longevity, fecundity, and offspring sex ratio of *Trichogramma minutum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Can Entomol* 127:245-254
- Landis DA, Wratten SD, Gurr GM (2000) Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annu Rev Entomol* 45:175-201
- Lee JC, Heimpel GE (2007) Sugar feeding may reduce short-term activity of a parasitoid wasp. *Physiol Entomol* 32:99-103
- Lee JC, Heimpel GE (2008a) Effect of floral nectar, water, and feeding frequency on *Cotesia glomerata* longevity. *BioControl* 53:289-294
- Lee JC, Heimpel GE (2008b) Floral resources impact longevity and oviposition rate of a parasitoid in the field. *J Anim Ecol* 77:565-572
- Lee JC, Heimpel GE, Leibe GL (2004) Comparing floral nectar and aphid honeydew diets on the longevity and nutrient levels of a parasitoid wasp. *Entomol Exp Appl* 111:189-199
- Lewis WJ, Stapel JO, Cortesero AM, Takasu K (1998) Understanding how parasitoids balance food and host needs: importance to biological control. *Biol Control* 11:175-183
- Lightle D, Ambrosino M, Lee JC (2010) Sugar in moderation: sugar diets affect short-term parasitoid behaviour. *Physiol Entomol* 35:179-185

- Michels JrGJ (1986) Gramineous North American host plants of the greenbug with notes on biotypes. *Southwest Entomol* 11:55-66
- Mitsunaga T, Shimoda T, Yano E (2004) Influence of food supply on longevity and parasitization ability of a larval endoparasitoid, *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae). *Appl Entomol Zool* 39:691-697
- Nafziger TD, Fadamiro HY (2011) Suitability of some farmscaping plants as nectar sources for the parasitoid wasp, *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae): effects on longevity and body nutrients. *Biol Control* 56:225-229
- Namrata P, Mittal PK, Singh OP, Sagar DV, Padma V (2000) Larvicidal action of essential oils from plants against the vector mosquitoes *Anopheles stephensi* (Liston), *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L.). *Int Pest Control* 42:53-55
- Nascimento AR, Almeida-Neto M, Almeida AM, Fonseca CR, Lewinsohn TM, Pentead-Dias AM (2014) Parasitoid wasps in flower heads of Asteraceae in the Brazilian Cerrado: taxonomical composition and determinants of diversity. *Neotrop Entomol* 43:298-306
- Nicolson SW, Thornburg RW (2007) Nectar chemistry. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E (eds) *Nectaries and nectar*. Springer, The Netherlands 215-264
- Nuessly GS, Nagata RT (2005) Greenbug, *Schizaphis graminum* (Rondani) (Insecta: Hemiptera: Aphididae). In: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Available via website. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN63400.pdf>. Cited 11 Oct 2017
- Olson DM, Fadamiro H, Lundgren JG, Heimpel GE (2000) Effects of sugar feeding on carbohydrate and lipid metabolism in a parasitoid wasp. *Physiol Entomol* 25:17-26
- Otoni EB (2016) The etholog homepage release 2.25. Available via website. <http://www.ip.usp.br/docentes/eботtoni/EthoLog/ethohome.html>. Cited 23 Feb 2018.
- Pan MZ, Liu TX (2014) Suitability of three aphid species for *Aphidius gifuensis* (Hymenoptera: Braconidae): parasitoid performance varies with hosts of origin. *Biol control* 69:90-96
- Rahat S, Gurr GM, Wratten S, Mo J, Neeson R (2005) Effect of plant nectars on adult longevity of the stinkbug parasitoid, *Trissolcus basalus*. *Int J Pest Manage* 51:323-326

- Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez VH (1999) Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais 5a aproximação. UFV, Viçosa
- Rivero A, Casas J (1999) Incorporating physiology into parasitoid behavioral ecology: the allocation of nutritional resource. *Res Popul Ecol* 41: 39-45
- Russell M (2015). A meta-analysis of physiological and behavioral responses of parasitoid wasps to flowers of individual plant species. *Biol Control* 82:96-103
- Salinas-Sánchez DO, Aldana-Llanos L, Valdés-Estrada ME, Gutiérrez-Ochoa M, Valladares-Cisneros G, Rodríguez-Flores E (2012) Insecticidal activity of *Tagetes erecta* extracts on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Fla Entomol* 95:428-432
- Sampaio MV, Bueno VH, Lenteren JC (2001) Host preference of *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Aphidiidae) for *Myzus persicae* (Sulzer) and *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). *Neotrop Entomol* 30:655-660
- Sampaio MV, Bueno VHP, De Conti BF (2008) The effect of the quality and size of host aphid species on the biological characteristics of *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Eur J Entomol* 105:489-494
- SAS Institute Inc. (2010) SAS 9.3. Cary, NC, USA
- Segoli M, Rosenheim JA (2013) Spatial and temporal variation in sugar availability for insect parasitoids in agricultural fields and consequences for reproductive success. *Biol Control* 67:163-169
- Siekmann G, Keller MA, Tenhumberg B (2004) The sweet tooth of adult parasitoid *Cotesia rubecula*: ignoring hosts for nectar? *J Insect Behav* 17:459-476
- Silveira LCP, Berti-Filho E, Pierre LSR, Peres SC, Louzada JL (2009) Marigold (*Tagetes erecta* L.) as an attractive crop to natural enemies in onion fields. *Sci Agric* 66:780-787
- Singh G, Singh OP, De Lampasona MP, Catalan CA (2003) Studies on essential oils. Part 35: chemical and biocidal investigations on *Tagetes erecta* leaf volatile oil. *Flavour Frag J* 18:62-65
- Starý P (1975) *Aphidius colemani* Viereck: its taxonomy, distribution and host range (Hymenoptera, Aphidiidae). *Acta Entomol Bohemoslov* 72:156-163

- Takasu K, Lewis WJ (1993) Host-foraging and food-foraging of the parasitoid *Microplitis croceipes*: learning and physiological state effects. *Biol Control* 3:70-74
- Tomanović Ž, Petrović A, Mitrović M, Kavallieratos NG, Starý P, Rakhshani, Rakhshanipour M, Popović A, Shukshuk AH, Ivanović A. (2014). Molecular and morphological variability within the *Aphidius colemani* group with redescription of *Aphidius platensis* Brethes (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *B Entomol Res* 104:552-565
- Tooker JF, Hanks LM (2000) Flowering plant hosts of adult hymenopteran parasitoids of central Illinois. *Ann Entomol Soc Am* 93:580-588
- Tylianakis JM, Didham RK, Wratten SD (2004) Improved fitness of aphid parasitoids receiving resource subsidies. *Ecology* 85:658-666
- Van Handel E (1985a) Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 1:299-301
- Van Handel E (1985b) Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 1:302-304
- Wäckers FL (1994) The effect of food deprivation on the innate visual and olfactory preferences in the parasitoid *Cotesia rubecula*. *J Insect Physiol* 40:641-649
- Wäckers FL, van Rijn PCJ, Heimpel GE (2008) Honeydew as a food source for natural enemies: making the best of a bad meal? *Biol Control* 45:176-184
- Wanner H, Gu H, Dorn S (2006) Nutritional value of floral nectar sources for flight in the parasitoid, *Cotesia glomerata*. *Physiol Entomol* 31:127-133
- Zhang YB, Liu WX, Wang W, Wan FH, Li Q (2011) Lifetime gains and patterns of accumulation and mobilization of nutrients in females of the synovigenic parasitoid, *Diglyphus isaea* Walker (Hymenoptera: Eulophidae), as a function of diet. *J Insect Physiol* 57:1045-1052
- Zhu P, Wang G, Zheng X, Tian J, Lu Z, Heong KL, Xu H, Chen G, Yang Y, Gurr GM (2015) Selective enhancement of parasitoids of rice Lepidoptera pests by sesame (*Sesamum indicum*) flowers. *BioControl* 60:157-167.

Table 1. Average \pm SE proportion of time spent in the five behaviors, and reproductive outcomes of *Aphidius platensis* with/out prior exposure to marigold in an arena with *Myzus persicae* or *Schizaphis graminum*.

Behavior	<i>M. persicae</i>		<i>S. graminum</i>		d.f.	Flower		Aphid		Flower x aphid	
	Marigold	No marigold	Marigold	No marigold		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Grooming	0.019 \pm 0.01	0.055 \pm 0.02	0.023 \pm 0.01	0.041 \pm 0.01	1, 56	3.71	0.059	0.12	0.733	0.41	0.525
Parasitizing	0.015 \pm 0.01	0.003 \pm 0.01	0.018 \pm 0.03	0.008 \pm 0.02	1, 56	12.1	0.001	2.09	0.154	0.14	0.710
Probing	0.12 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02	0.14 \pm 0.04	0.11 \pm 0.02	1, 56	1.56	0.216	0.68	0.41	0.06	0.81
Stationary	0.06 \pm 0.03	0.24 \pm 0.05	0.02 \pm 0.01	0.23 \pm 0.06	1, 56	19.2	<.0001	0.36	0.551	0.10	0.755
Walking	0.78 \pm 0.04	0.62 \pm 0.06	0.79 \pm 0.04	0.61 \pm 0.07	1, 56	9.22	0.0036	0.01	0.961	0.04	0.841
Outcomes											
Parasitism	0.3 \pm 0.04	0.11 \pm 0.04	0.5 \pm 0.06	0.2 \pm 0.05	1, 56	27.0	<.0001	8.97	0.0041	1.3	0.260
Emergence	0.58 \pm 0.06	0.5 \pm 0.13	0.53 \pm 0.08	0.69 \pm 0.11	1, 49	0.262	0.611	0.47	0.495	1.52	0.224
Sex ratio	0.43 \pm 0.11	0.47 \pm 0.17	0.66 \pm 0.08	0.57 \pm 0.11	1, 42	0.047	0.829	2.15	0.150	0.31	0.579

Significant ($P < 0.05$) values in bold are from a two-factor ANOVA. D.f. are identical for the three effects in a given test. Parasitism = mummies/aphids, emergence = parasitoids/mummies, sex ratio = female/all parasitoids.

Table 2 Statistical tests between marigold, aphid-infested marigold, honey and newly-emerged treatments for the lipid, glycogen and sugar levels of female and male *Aphidius platensis*.

Sex	Nutrients	d.f.	<i>F</i>	<i>P</i>
Females	Lipid	3, 110	0.1	0.962
	Glycogen	3, 252	2.17	0.092
	Sugar	3, 112	4.19	0.008
Males	Lipid	3, 79	0.23	0.877
	Glycogen	3, 193	0.81	0.492
	Sugar	3, 74	0.62	0.602

Significant ($P < 0.05$) values in bold are from a generalized linear mixed model.

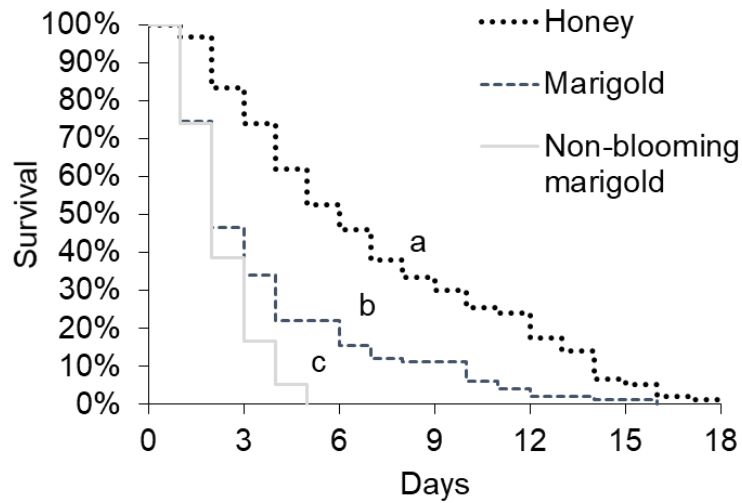


Fig. 1 Survival of *Aphidius platensis* provided honey + non-blooming marigold, blooming marigold, or non-blooming marigold. Different letters show significant treatment differences following Sidak adjustment: honey vs. marigold $P < .0001$, honey vs. water $P < .0001$, marigold vs. water $P = 0.0041$

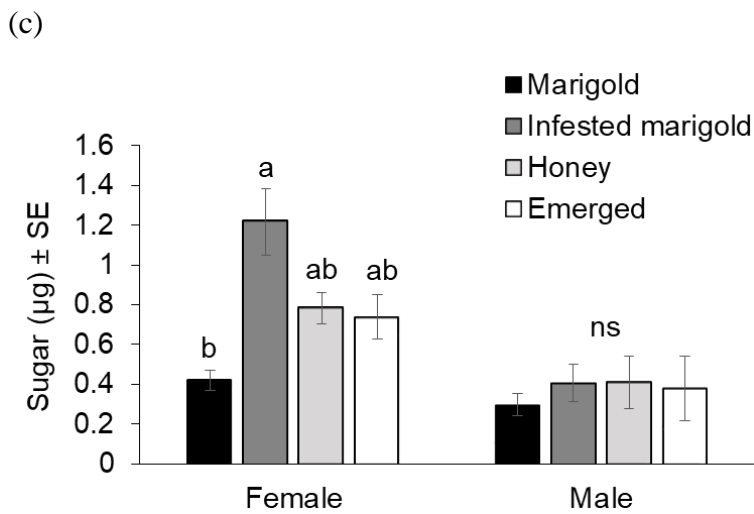
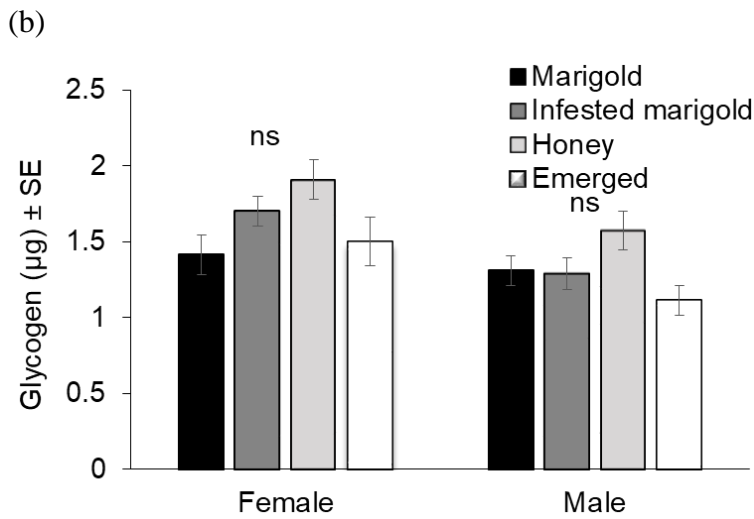
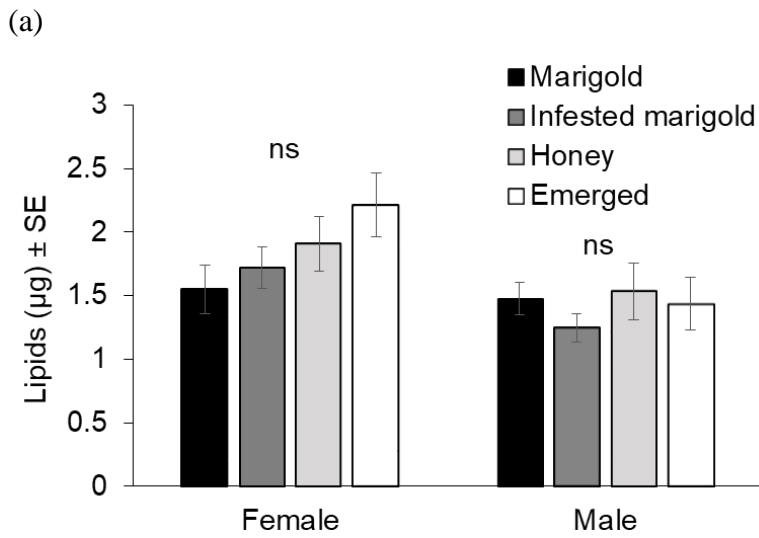


Fig. 2 Average (\pm SE) levels of lipid (a), glycogen (b) and sugar (c) of *Aphidius platensis* from four treatments, values are from two wasps assayed together. Letters indicate a significant difference between treatments with Tukey HSD, $P < 0.05$ (Table 2), ns indicates no differences between treatments for a given sex

Supplementary appendix A: Nutrient assay of *Aphidius colemani* with various foods

Main paper: Effects of marigold on the behavior, survival and nutrient reserves of *Aphidius platensis*

Objective: To determine the lipid, glycogen, and sugar levels of *A. colemani* exposed to different food treatments, and confirm that the modified protocol can detect differences in nutrient levels in this small sized wasp.

Rationale: The main study with *A. platensis*, held wasps with various diets and compared their nutrient levels to the newly emerged controls. Most starved *A. platensis* died before 1 day and could not be included in the nutrient comparisons with the other treatments. Since *A. platensis* is present in Brazil and not available in the USA, where the nutrient assays were done, we conducted a study with *A. colemani*, which is related to *A. platensis* and a similar size.

Methods: *Aphidius colemani* wasps (Evergreen Growers, Portland, Oregon, USA) were shipped as mummies to the USDA lab. Wasps that already emerged were not used in the experiment and were removed from the transport vial. On the same day, newly emerged wasps were isolated in glass vials and sexed under the microscope. Some wasps were immediately frozen at -80°C, while others were transferred to 23 x 23 x 25 cm plastic cages with a mesh sleeve. Cages contained either: 1) cut flowering marigold in water flask, 2) honey streaked on sides, 3) water wick, or 4) nothing (complete starvation). Wasps were held in cages with marigold, honey or water for 24 hours, and in cage with nothing for 12 hours before wasps were frozen. Cages were set up from June 22 to August 2, 2017 on three separate days from three different parasitoid shipments. For nutrient analyses, wasps were assayed in pairs, the same sex from the same treatment cage using the same protocol described in the main paper. Sixteen pairs, or 32 females and 32 males per treatment group, were assayed for glycogen, and 8 pairs per treatment group were assayed for lipid and sugar levels.

Analyses were done separately for females and males for each response variable: lipid, glycogen and sugar. Treatment was a fixed effect, and cage was a random effect. A generalized linear mixed model with a lognormal distribution was fit using PROC GLIMMIX in SAS 9.3 (SAS Institute 2010).

Results: The variously treated *A. colemani* did not vary in lipid levels. Honey-fed wasps often had higher glycogen and sugar levels than starved wasps given water or nothing (Table A1). Newly emerged *A. colemani* generally had intermediate levels of nutrients, with no statistical difference from honey-fed wasps in four out of six comparisons.

Table A1 Average nutrient levels (\pm SE) of paired *A. colemani* from diet treatments, and statistical results.

Treatment	Females			Males		
	Lipid (μ g)	Glycogen	Sugar	Lipid	Glycogen	Sugar
Emerged	4.37 ± 0.93	1.83 ± 0.32 b	0.99 ± 0.18 b	4.30 ± 0.69	1.65 ± 0.19 a	2.01 ± 0.64 ab
Honey	3.71 ± 0.73	3.98 ± 0.59 a	6.55 ± 1.89 a	2.02 ± 0.37	2.41 ± 0.36 a	5.40 ± 1.49 a
Marigold	5.98 ± 1.22	1.30 ± 0.14 ab	1.01 ± 0.34 b	2.77 ± 0.71	1.49 ± 0.19 ab	1.08 ± 0.24 ab
Nothing	3.84 ± 1.05	1.43 ± 0.48 ab	0.86 ± 0.26 b	3.56 ± 0.56	1.46 ± 0.24 ab	2.42 ± 1.10 ab
Water	4.02 ± 0.97	1.78 ± 0.24 b	2.72 ± 0.85 ab	2.43 ± 0.39	0.86 ± 0.10 b	0.43 ± 0.16 b
d.f.	4,20	4,60	4,20	4,20	4,60	4,20
<i>F</i>	0.30	5.31	4.85	1.67	6.05	4.85
<i>P</i>	0.877	0.001	0.0067	0.197	0.0004	0.0067

ARTIGO 2 ATRATIVIDADE E IDENTIFICAÇÃO DOS VOLÁTEIS MEDIANDO INTERAÇÃO ENTRE PLANTAS DE CRAVO AMARELO E PIMENTÃO E O PARASITOIDE *APHIDIUS PLATENSIS* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

Ivana Lemos Souza^{1*}, Rosangela Cristina Marucci¹, Luís Cláudio Paterno Silveira¹, Diego Bastos Silva², Maria Fernanda Gomes Villalba Peñaflor¹

¹ *Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Entomologia, Caixa postal 3037, Lavras, MG, 37200-000, Brasil*

² *Escola de Agricultura Luiz de Queiroz (USP/ESALQ), Departamento de Entomologia e Acarologia, Universidade de São Paulo, Caixa postal 9, Piracicaba, SP, 13418-900, Brasil*

* Autor correspondente. E-mail: ilemossouza@gmail.com

Este artigo foi escrito de acordo com as normas do periódico Journal of Chemical Ecology, para o qual será submetido após tradução.

RESUMO

O cravo amarelo (*Tagetes erecta* L.) é utilizado no controle biológico conservativo para atrair inimigos naturais em cultivos de hortaliças no entanto, os compostos orgânicos voláteis envolvidos na atratividade de parasitoides ainda é uma lacuna. *Aphidius platensis* é um endoparasitoide de afídeos de importância agrícola com destaque para *Myzus persicae*, Primeiramente, foi avaliado a resposta olfativa de *A. platensis* na atração por plantas de cravo amarelo em estágio vegetativo ou em floração e floração infestado pelo pulgão *Myzus persicae* e de pimentão intactas ou infestadas por *M. persicae*. Posteriormente, identificou e comparou a composição das misturas dos compostos voláteis emitidos por essas plantas, coletando as amostras da parte aérea das plantas e analisando-as com GC-FID e GC-MS. *T. erecta* em floração atraiu *A. platensis*, os derivativos de ácidos graxos representou a classe mais importante de compostos nas misturas voláteis do cravo em floração, houve diferenças entre o cravo floração e vegetativo. Entre os terpenos o linalol apresentou nível mais altos no cravo em floração em relação aos outros tratamentos com o cravo. Contudo *T. erecta* em floração, emite COVs que influenciam a preferência olfativa, na atração do parasitoide *A. platensis*. O parasitoide foi atraído pelos odores da planta de cravo em floração, quando esta foi ofertada junto ao pimentão, ao invés de pimentão isoladamente. Além disso, plantas de pimentão infestadas por *M. persicae* atraíram o parasitoide, o qual discriminou em relação ao pimentão intacto. Essas informações sugerem que as flores do cravo amarelo, podem ser utilizadas como estratégia do controle biológico conservativo, pois oferece pistas olfativas atrativas ao parasitoide de pulgão *A. platensis*.

Palavras-chaves: Parasitoide de afídeos, Compostos orgânicos voláteis, Controle Biológico Conservativo, Ecologia química

INTRODUÇÃO

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) provenientes de plantas em floração desempenham um papel importante na mediação de interações parasitoide-planta (Belz et al. 2013), uma vez que estes utilizam pistas olfativa dos aromas florais para localização das plantas hospedeiras (Lewis e Takasu 1990; Wäckers e Lewis 1994).

Plantas colonizadas e danificadas por insetos herbívoros produzem um grupo de COVs muitas vezes chamados de voláteis de plantas induzidos por herbivoria (VPIHs), que podem incluir semioquímicos que atuam como repelentes para insetos herbívoros e como atrativos para inimigos naturais. Esses sinais podem indicar que a planta já está infestada e, portanto, menos adequada como hospedeira, ou, por outro lado, podem recrutar parasitoides dos herbívoros (Pickett et al. 2006; Khan et al. 2008).

A utilização de plantas como recursos florais associados aos cultivos agrícolas é uma estratégia do controle biológico conservativo, que visa manter e aumentar a população de inimigos naturais na área, por meio do manejo de habitats, o que envolve a adição de plantas em floração ou faixas de flores silvestres em ambientes simplificados, de baixa biodiversidade (Gurr et al. 2004).

Neste sistema, as espécies de flores candidatas ao consórcio não devem competir com a planta principal do cultivo por recursos ou atrair e colonizar insetos-praga. Além disso, devem não somente aumentar a sobrevivência e fecundidade dos parasitoides, mas também, serem altamente visitadas por estes (Foti et al. 2017).

O acesso aos recursos florais tem sido explorado para atratividade olfativa de parasitoides (Foti et al. 2017), resultando em maior longevidade (Géneau et al. 2016) e maiores taxas de parasitismo (Hoffmann et al. 2017). Na seleção de hospedeiros, *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) prefere plantas danificadas por afídeos, seus hospedeiros preferenciais, do que por lagartas (Silva et al. 2016). *Trissolcus basalis* Wollaston (Hymenoptera: Platygasteridae) preferiu pistas olfativas de flores do trigo em relação ao trigo vegetativo. Após identificação dos compostos voláteis dessas plantas, verificou-se perfis muito distintos e pouca sobreposição entre os compostos do trigo em estágio vegetativo e floração (Perović et al. 2010).

Flores do cravo amarelo, *Tagetes erecta* Linn. (Asteraceae), têm sido utilizadas como componentes de arranjos espaciais no manejo de habitats (Silveira 2009; Sampaio et al. 2008; Haro et al. 2018), de modo a promover, não somente o aumento das populações de inimigos naturais, mas também de suprimir insetos, ácaros, nematoides, bactérias, fungos e vírus (Marques et al. 2011; Salinas-Sanchez 2012).

Em cultivo de cebola, o cravo amarelo usado em bordaduras, promoveu maior riqueza e abundância de parasitoides, comparado com o monocultivo (Silveira 2009). Em cultivo de alface, as flores do cravo amarelo aumentaram o tamanho do corpo e a biomassa de inimigos naturais, o número de ligações ecológicas (compreendido pelo número de ligações tróficas entre todas as espécies na cadeia alimentar), o número médio de presas para espécies de inimigos naturais e o número médio de inimigos naturais por presa, a taxa de onivoria e o comprimento da cadeia alimentar na complexidade de artrópodes, (Haro et al. 2018).

A sobrevivência e a taxa de parasitismo do endoparasitoide de pulgões, *Aphidius platensis* Brethes (Hymenoptera: Braconidae) aumentaram na presença do cravo amarelo em função do fornecimento de lipídios, glicogênio e açúcar (néctar) e por abrigar hospedeiros alternativos (Souza et al. 2018). Contudo, não há informações a respeito dos COVs do cravo amarelo envolvidos na atratividade de *A. platensis*.

Neste trabalho utilizou-se como cultura principal o pimentão (*Capsicum annuum* L.) (Solanaceae) e como planta atrativa o cravo amarelo. O afídeo *Myzus persicae* Sulzer 1776 (Hemiptera: Aphididae) pela polifagia e importância econômica mundial foi o herbívoro utilizado como hospedeiro do parasitoide, *A. platensis*.

Assim, os objetivos foram investigar a atratividade olfativa do parasitoide *A. platensis* aos COVs e aos VPIHs emitidos pela planta cravo amarelo em estágio de floração e vegetativo, assim como da planta de pimentão e complementarmente, coletar e identificar estes compostos visando definir o papel dos voláteis das flores do cravo amarelo no comportamento de busca hospedeira de *A. platensis*. Conseqüentemente, procurou-se compreender como esta planta, utilizada frequentemente como componente da diversificação vegetal pode otimizar ou aprimorar o controle biológico conservativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas e insetos. O cravo amarelo e o pimentão foram semeados em solo esterilizado (Tropostrato HA Hortaliças, Mogi Mirim-SP, Brasil) e irrigados diariamente. Para os testes de olfatometria, foram semeados entre junho e agosto de 2016 e em outubro de 2017 na Universidade Federal de Lavras - UFLA em Lavras, Minas Gerais, Brasil. Para coleta e identificação de voláteis a semeadura foi realizada entre dezembro de 2016 e fevereiro de 2017 na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP em Piracicaba, São Paulo, Brasil. As sementes de cravo foram semeadas um mês antes desde pimentão.

Quando as plantas atingiram de 10 a 15 cm de altura, foram transplantadas para vasos plásticos de 2 L contendo uma mistura de solo de barranco (Latosolo Vermelho) na proporção de 3 partes de solo e 1 parte de esterco bovino e mantidas em casa de vegetação livre de insetos sob luz e temperatura naturais e irrigação diária. A fertilização das plantas foi realizada a cada 15 dias de acordo com as recomendações do Estado de Minas Gerais (Ribeiro et al. 1999). As plantas de cravo usadas nos testes tinham 70 dias e as de pimentão, 40 dias de idade.

As colônias de *M. persicae* e o parasitoide *A. platensis* e foram mantidos em gaiolas (50 x 50 x 30 cm) no laboratório de Controle Biológico do Departamento de Entomologia da UFLA. Os parasitoides foram criados sob *M. persicae* em plantas de pimentão. As folhas contendo múmias resultantes do parasitismo foram acondicionadas em placas de Petri (10 cm de diâmetro) seladas com filme plástico e mantidas a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase 14 h. Fêmeas do parasitoide recém-emergidas com um dia de idade (3ª geração para o experimento realizado no ano de 2016 e na 10ª geração para aqueles realizados em 2017), foram posteriormente usadas nos testes de olfatometria.

Para padronização das idades das ninfas de segundo e terceiro ínstaes de pulgões, fêmeas adultas de *M. persicae* foram isoladas em placas de Petri, contendo folhas de pimentão sob uma fina camada de ágar a 1%, e mantidas em câmaras climatizadas a $22 \pm 1^\circ \text{C}$, de $70 \pm 10\%$ UR e fotofase 14 h.

Tratamentos. Cinco dias antes dos testes as plantas foram transferidas da casa de vegetação para o laboratório e mantidas sob condições controladas ($25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 h). As plantas de cravo foram utilizadas em estágio de floração e vegetativo e infestadas e as plantas de pimentão intactas e infestadas. As plantas foram infestadas com 100 ninfas de *M. persicae* de segundo ou terceiro ínstaes e mantidas em gaiolas de acrílico (15 x 21 x

23 cm) por dois dias até serem utilizadas nos testes. Uma única fêmea recém-emergida do parasitoide *A. platensis* foi utilizada para cada resposta.

Foram utilizadas as seguintes combinações: (1) cravo (C) vs. ar limpo, (2) pimentão (P) vs. ar limpo, (3) cravo (C) vs. cravo + pimentão (CP), (4) pimentão (P) vs. cravo + pimentão (CP), (5) cravo floração (CF) vs. cravo (C), (6) cravo floração (CF) vs. pimentão (P), (7) cravo floração (CF) vs. cravo floração + pimentão (CFP), (8) cravo floração + pimentão (CFP) vs. pimentão (P), (9) cravo floração infestado por *M. persicae* (CFI) vs. cravo floração (CF), (10) cravo floração infestado por *M. persicae* (CFI) vs. pimentão infestado por *M. persicae* (PI), (11) pimentão infestado por *M. persicae* (PI) vs. cravo floração (CF), (12) pimentão infestado por *M. persicae* (PI) vs. pimentão (P).

Respostas olfativas. A resposta olfativa das fêmeas *A. platensis* foi avaliada em um olfatômetro de vidro em tubo-Y, projetado com um braço principal de 17 cm de comprimento, 14 cm de lado e 2 cm de diâmetro interno e um ângulo de 90° entre os dois braços. As plantas foram colocadas em câmaras de vidro (apenas tratamentos vegetativos) e em sacos transparentes de poliéster (40 x 50 cm) (Stewart-Jones e Poppy 2006), às quais foram conectados ao sistema de olfatomia por mangueiras de silicone, apresentando dois odores para o parasitoide dentro do tubo.

O ar foi empurrado para dentro do sistema por uma bomba de ar que, anteriormente à entrada nos sacos de poliéster, foi limpo pela passagem em um filtro de carvão ativado e, em umidificadores. Após a passagem pelas plantas (fontes de odor), o ar foi conduzido para os braços laterais do olfatômetro a uma vazão de 0,6 L/min/braço. Foram utilizadas mangueiras de silicone em todas as conexões entre as partes do sistema de olfatomia. Antes de montar o sistema de bioensaios, todo o material de vidro e silicone foi limpo com etanol e colocado em um forno a 120 °C por pelo menos 24 horas.

Para os tratamentos que utilizaram a combinação de duas plantas de um lado, os sacos foram conectados, através de um tubo de silicone de 5 cm e apenas uma mangueira conectada nos braços laterais do olfatômetro. O ar limpo foi empurrado através dos tubos, para duas câmaras de vidro (10 cm de diâmetro x 5 cm de altura), cada uma contendo uma única planta e, em seguida, para os braços laterais do olfatômetro. Todas as plantas foram checadas quanto à saúde geral e falta de injúrias causada por algum organismo.

Os parasitoides foram introduzidos individualmente no braço central do olfatômetro e observados por 5 min. Os insetos considerados como tendo feito uma escolha, foram àqueles que cruzaram a linha de limite (localizada a 2 cm do final de cada braço) e mantiveram-se por pelo menos 20 segundos. Se o inseto não fizesse uma escolha após 5 minutos, era considerado uma não resposta. Cada parasitoide foi usado uma vez e apenas os parasitoides que fizeram a escolha de um braço dentro de 5 min, foram incluídas nas análises estatísticas.

Após cada dois testes, os lados da entrada de ar das plantas no olfatômetro foram invertidos, para evitar tendência para algum lado. A cada dez respostas as plantas dos tratamentos foram substituídas por novas plantas, a fim de replicar as fontes de odores. Todo o bioensaio foi realizado durante o dia, já que o gênero *Aphidius* responde durante esse período (Benelli et al. 2013). O número total de *A. platensis* testado foi de 40 indivíduos para cada combinação de teste.

Coleta de voláteis e composição química. A coleta e identificação de voláteis foram realizadas no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos da Escola Superior Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, Piracicaba, SP. As plantas foram colocadas em sacos de poliéster e mantidas sob luz artificial em uma sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura e $70 \pm 10\%$ UR. Filtros contendo 30 mg de polímero adsorvente HayeSep® (Supelco, Bellefonte, PA, USA) foram acoplados aos sacos de poliéster, os quais foram conectados a um sistema de coleta de voláteis (ARS, Gainesville, FLA, USA). Foram coletados os voláteis de seis plantas por tratamento durante 8 horas (nas plantas de cravo no estágio vegetativo, pimentão, pimentão infestado e ar limpo) e 3 horas para o cravo em floração e cravo floração infestado. Realizado em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura e $70 \pm 10\%$ UR.

Após a coleta, os filtros foram eluídos com 150 μL de hexano (Merck, Kenilworth, NJ, USA) misturado com 5 μL de acetato de nonil (Sigma-Algdrich, Sto Louis, Mo, USA) a 50ng/ μL , utilizado como padrão interno. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até a análise. As análises dos voláteis foram realizadas por cromatografia gasosa (Shimadzu, GC-2010 Gas Chromatograph), com detecção de ionização por chama (GC-FID) a 280°C . A quantificação foi baseada na comparação da área sob o pico GC-FID com o padrão interno e corrigida pelo peso seco (g) de cada planta. Injetou-se uma alíquota de 1 μL de cada amostra no modo sem divisão pulsada em uma coluna capilar HP-1 (Agilent J & W GC Columns, Santa Clara, CA, EUA - 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μm de espessura de película).

O gás de arraste foi o hélio de alta pureza com um caudal de 0,9 mL/min. O forno foi programado com uma temperatura inicial de 40°C durante 5 min, aumentando a 5°C/min até 150°C, e depois mantido durante 1 minuto subsequentemente a 200°C a 20°C/min seguido de uma pós-corrída de 5 minutos a 250°. A solução GC (versão 2.32.00, Shimadzu) foi utilizada para aquisição de sinal e integração de pico.

A amostra mais representativa de cada tratamento, selecionada com base na média da quantidade de compostos e aquela que apresentou menos contaminantes em comparação com a amostra em branco, foi também analisada por cromatografia em fase gasosa (Agilent 6890 Series GC system G1530A), acoplada a um espectrômetro de massa (GC-MS). O GC-MS operou em modo de impacto de elétrons (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector, linha de transferência 230°C, fonte 230°C, potencial de ionização 70 eV, faixa de varrimento 33-28 amu).

No geral, uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi injetada no modo sem divisão pulsada em uma coluna capilar HP-1 (Alltech Associates, Deerfield, IL, EUA - 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm de espessura de película). Utilizou-se hélio (0,9 ml/min) como gás de arraste. A temperatura do forno GC foi inicialmente mantida a 40°C durante 3 minutos, aumentada para 100°C a 8°C/min e subsequentemente para 200°C a 5°C/min seguida por um pós-processamento de 5 min a 250°C.

Os voláteis detectados foram identificados por comparação dos seus espectros de massa com os da biblioteca NIST 11. Além disso, a injeção de padrões sintéticos e o cálculo do índice de retenção linear (IRL) de cada composto também foram utilizados como critério adicional para a identificação dos compostos.

Análise estatística. As análises das escolhas feitas por *A. platensis* no bioensaio de olfatométrica, foram realizadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2), utilizando R software version 3.1.1 (www.R-project.org). De acordo com Dudareva et al. (2012), os dados de emissões dos voláteis, foram agrupados em três classes químicas: derivativos de ácidos graxos (DAGs), fenilpropanoides e terpenos. As análises foram realizadas entre todos os tratamentos (cravo + pimentão), apenas com cravo e apenas com pimentão.

Os dados foram inicialmente testados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Como as distribuições, mesmo após as transformações, não atenderam aos pressupostos para os testes

paramétricos, os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguidos por teste de correção de médias por Monte Carlo teste.

A comparação das quantificações relativas às classes químicas dos voláteis entre os tratamentos (todos os tratamentos, apenas cravo e apenas pimentão), foram realizadas pela análise de variância multivariada (MANOVA), seguida por ANOVA univariada. A composição dos voláteis foi analisada por meio dos componentes principais (PCA). Todas as análises foram realizadas em Minitab® Release 14 (Minitab Inc., State College, PA, USA), usando nível de significância de 5 a 1%.

RESULTADOS

Fêmeas do parasitoide foram atraídas pelas diferentes composições dos voláteis das plantas de cravo amarelo em floração isoladamente, quando comparadas ao cravo em floração junto com pimentão e pimentão infestado por *M. persicae*.

Quando os parasitoides foram expostos ao cravo no estágio vegetativo *vs.* ar limpo e ao pimentão *vs.* ar limpo, não houve resposta olfativa (Fig. 1). Além disso, não houve discriminação entre cravo no estágio vegetativo *vs.* cravo no estágio vegetativo e pimentão e pimentão *vs.* cravo no estágio vegetativo e pimentão (Fig. 1).

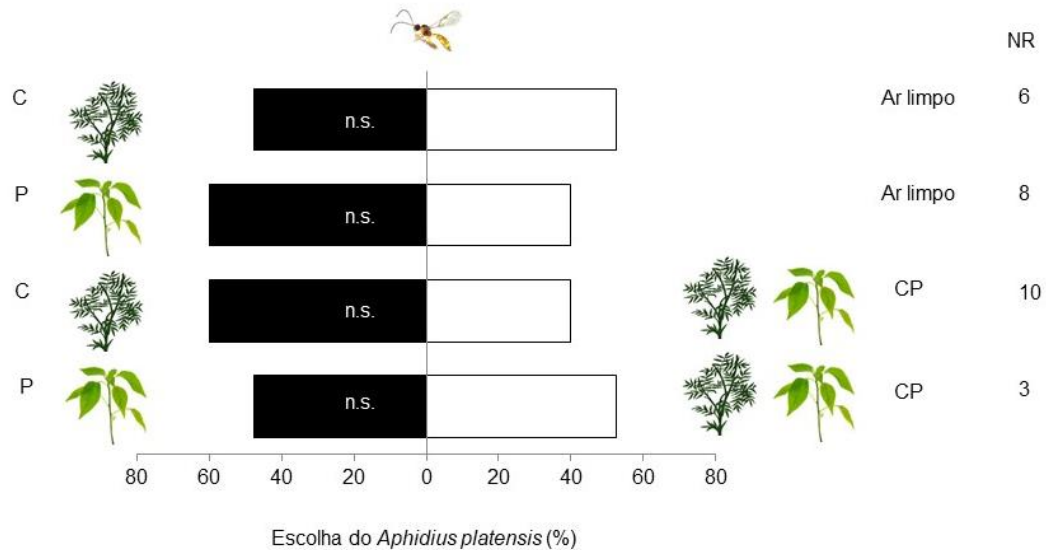


Fig. 1 Resposta olfativa de fêmeas de *Aphidius platensis* as plantas de cravo no estágio vegetativo (C) vs. ar limpo, pimentão (P) vs. ar limpo, cravo no estágio vegetativo (C) vs. cravo no estágio vegetativo (C) e pimentão (P), pimentão (P) vs. cravo no estágio vegetativo (C) e pimentão (P) em olfatômetro de tubo Y. As barras indicam a escolha das fêmeas do parasitoide (n = 40), que se deslocaram para as fontes de voláteis em situações de escolha correspondentes indicado à esquerda. NR indica o número de indivíduos testados que não tiveram resposta. Teste de qui-quadrado (* $P < 0,05$, n.s. = não significativo).

Quando os parasitoides foram expostos aos voláteis das plantas de cravo em floração e em estágio vegetativo, houve atração pela floração, em relação ao cravo no estágio vegetativo (Figura 2, χ^2 , $P=0,0114$). Entretanto, ambos os odores foram igualmente atrativos para *A. platensis* em relação aos voláteis provenientes das combinações do cravo floração vs. pimentão e cravo floração vs. cravo floração e pimentão, apesar de que a resposta ao cravo em floração foi maior do que ao pimentão (Figura 3; χ^2 , $P=0,0578$). Contudo, *A. platensis* preferiu os odores de cravo floração e pimentão, comparado ao pimentão apenas (Fig. 2; χ^2 , $P=0,0269$).

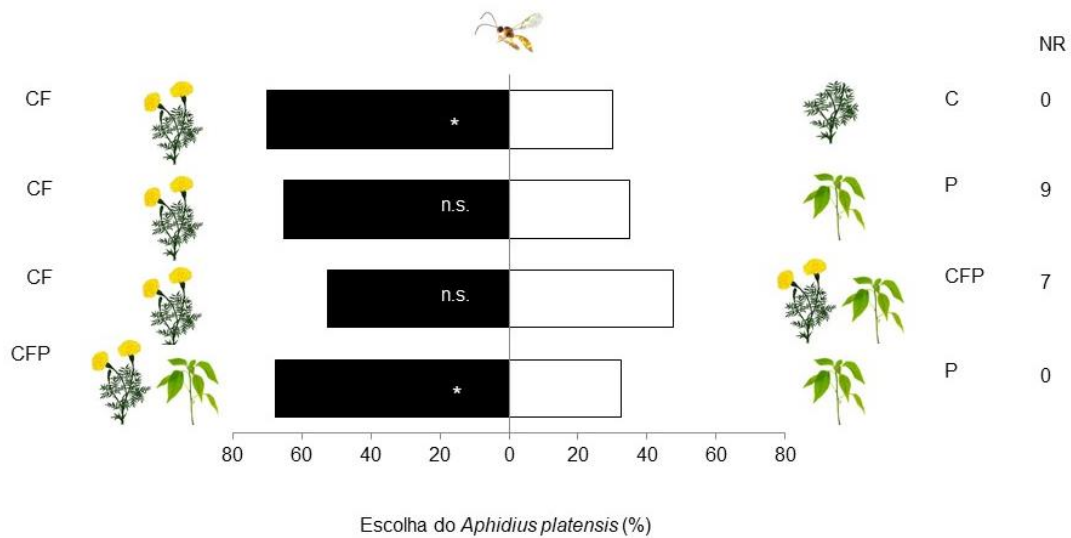


Fig. 2 Resposta olfativa de fêmeas de *Aphidius platensis* as plantas de cravo floração (CF) vs. cravo no estágio vegetativo (C), cravo floração (CF) vs. pimentão (P), cravo floração (CF) vs. cravo floração (CF) e pimentão (P), cravo floração (CF) e pimentão (P) vs. pimentão (P) em olfato metro de tubo Y. As barras indicam a escolha das fêmeas do parasitoide (n = 40), que se deslocaram para as fontes de voláteis em situações de escolha correspondentes indicado à esquerda. NR indica o número de indivíduos testados que não tiveram resposta. Teste de qui-quadrado (*P < 0,05 n.s. = não significativo).

Com relação as combinações envolvendo plantas infestadas por *M. persicae*, os parasitoides não tiveram preferência quando foram expostos ao cravo floração infestado vs. cravo floração, cravo floração infestado vs. pimentão infestado e pimentão infestado vs. cravo floração (Fig. 3). No entanto, as fêmeas escolheram plantas de pimentão infestadas por pulgões em relação ao pimentão apenas (Fig. 3; χ^2 , $P=0,0269$).

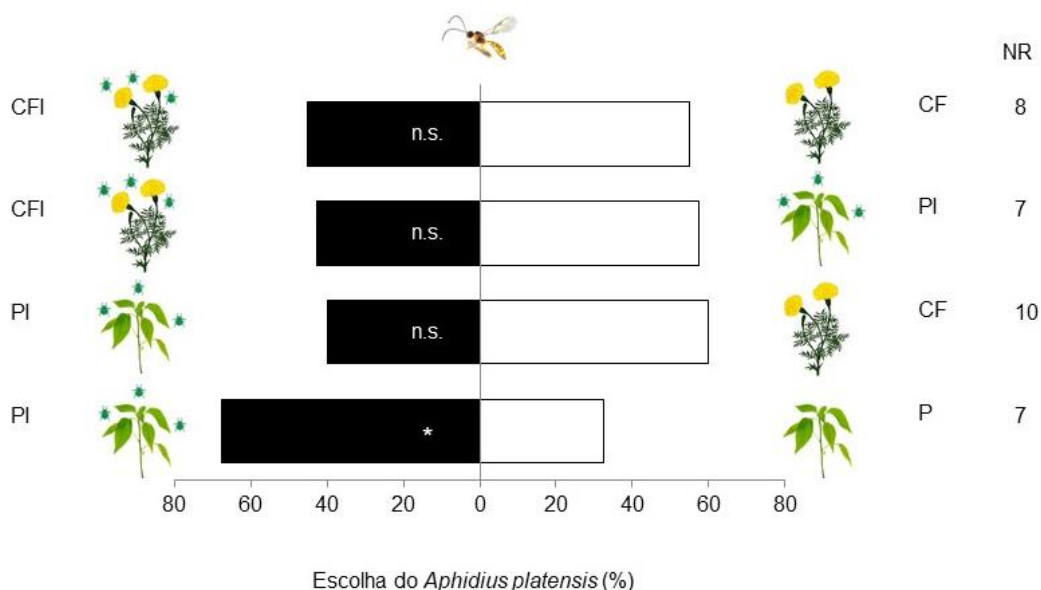


Fig. 3 Resposta olfativa de fêmeas de *Aphidius platensis* as plantas de cravo floração infestado por *Myzus persicae* (CFI) vs. cravo floração (CF), cravo floração infestado por *M. persicae* (CFI) vs. pimentão infestado (PI), pimentão infestado por *M. persicae* (PI) vs. cravo floração (CF), pimentão infestado por *M. persicae* (PI) vs. pimentão (P) em olfatometro de tubo Y. As barras indicam a escolha das fêmeas do parasitoide (n = 40), que se deslocaram para as fontes de voláteis em situações de escolha correspondentes indicado à esquerda. NR indica o número de indivíduos testados que não tiveram resposta. Teste de qui-quadrado (*P < 0,05, n.s. = não significativo).

Identificaram-se os compostos voláteis emitidos pelas plantas de cravo amarelo em estágio vegetativo e em floração, em floração infestado por *M. persicae* e pelas plantas de pimentão intactas e infestadas por pulgão. Através da análise da mistura de voláteis coletados a partir da parte aérea das plantas foi encontrado um total de 21 compostos (Tabela 1), dos quais 15, foram comuns a todos os tratamentos. Dentre as classes químicas analisadas houve diferença para os DAGs, apenas entre os tratamentos com o cravo (Bonferroni, $P < 0,0167$), no qual o cravo em floração diferiu significativamente do vegetativo (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de emissão de voláteis (média \pm EP ng.g⁻¹ das amostras do peso seco) emitidos por plantas de cravo (C), cravo floração (CF), cravo floração infestado por *Myzus*

persicae (CFI), pimentão (P) e pimentão infestado por *Myzus persicae* (PI). A quantificação foi baseada na área relativa do pico ao padrão interno. O Sistema de coletas da parte aérea das plantas é dado separadamente e agrupado de acordo com a sua classe química.

N	Compostos	Tratamentos				
		C (N = 6)	CF (N = 6)	CFI (N = 6)	P (N = 6)	PI (N=6)
Derivativos de ácidos graxos						
1	(Z) 2-hexenol	0,4 ± 0,1	4,5 ± 1,3	0,8 ± 0,5	0,9 ± 0,5	4,5 ± 1,0
2	3-hexanol	0,3 ± 0,1	2,4 ± 0,7	0,9 ± 0,5	0,9 ± 0,5	9,8 ± 3,8
3	(Z) 3-hexeno-1-ol, acetato	0,8 ± 0,4	3,1 ± 1,1	1,8 ± 0,6	2,8 ± 1,7	5,3 ± 2,2
14	2-etila-1-hexanol	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	2,2 ± 1,1	12,3 ± 2,3	3,6 ± 1,2
16	Nonanol	1,2 ± 0,6	2,6 ± 1,2	2,2 ± 1,6	4,1 ± 2,8	0,8 ± 0,5
	Total	2,9 ± 0,2a	12,8 ± 0,7b	8,0 ± 0,3ab	21,0 ± 9,4A	24,0 ± 1,5A
Fenilpropanoide						
5	Benzaldeído	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	10,2 ± 5,9	1,7 ± 1,0
13	Indol	8,2 ± 2,2	3,1 ± 1,0	3,6 ± 2,2	0,0 ± 0,0	9,9 ± 4,4
17	Salicilato de metila	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,6	3,2 ± 3,0	15,9 ± 13,8	15,3 ± 10,9
19	Acetato de linalila	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,8 ± 1,6	17,4 ± 5,2
	Total	8,2 ± 2,0a	3,7 ± 0,7a	6,7 ± 1,0a	30,9 ± 3,4 A	44,3 ± 3,5A
Terpenos						
4	α-pineno	0,8 ± 0,2	4,0 ± 0,9	3,3 ± 1,4	10,8 ± 4,7	24,2 ± 6,8
6	β-pineno	2,2 ± 0,4	2,6 ± 1,1	0,9 ± 0,4	10,8 ± 3,3	1,0 ± 0,5
7	β-felandreno	2,9 ± 0,8	2,3 ± 0,4	6,6 ± 3,3	20,1 ± 2,5	2,1 ± 1,0
8	Linalol	0,2 ± 0,1	2,3 ± 0,8	1,5 ± 0,9	5,9 ± 0,7	10,3 ± 1,0
9	β-mirceno	1,8 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,2	1,7 ± 0,7	1,9 ± 0,8
10	δ-limoneno	32,9 ± 6,8	8,3 ± 1,6	5,6 ± 2,3	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,7
11	γ-terpineno	2,1 ± 0,7	1,3 ± 0,6	12,4 ± 3,8	5,7 ± 2,5	2,9 ± 1,1

12	Canfeno	3,4 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,2	7,4 ± 2,9	14,8 ± 4,5
15	Careno	26,0 ± 9,7	3,9 ± 0,7	1,2 ± 0,6	0,9 ± 0,4	4,9 ± 0,6
18	Piperitone	14,5 ± 7,7	15,5 ± 7,9	1,6 ± 1,0	0,0 ± 0,0	5,1 ± 1,2
20	Cariofileno	0,8 ± 0,3	3,0 ± 0,6	8,2 ± 1,9	5,4 ± 0,7	19,4 ± 2,4
21	(Z) β-farneseno	0,7 ± 0,3	0,3 ± 0,2	3,2 ± 1,2	0,2 ± 0,1	2,7 ± 0,8
Total		88,4 ± 3,2a	43,5 ± 1,3a	45,6 ± 1,1a	69,0 ± 1,7 A	91,0 ± 2,3A

*Médias seguidas de letras minúsculas e maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com Kruskal Wallis non-parametric test ($P < 0,05$)

O cravo no estágio vegetativo emitiu 18 compostos, altas emissões dos níveis de terpenos foram liberadas, principalmente β-mirceno, δ-limoneno, canfeno e careno (grupo monoterpene) que tiveram maiores níveis em relação aos tratamentos com cravo em floração. Os derivativos de ácidos graxos e fenilpropanoide tiveram as menores emissões e os fenilpropaniodes salicilato de metila e acetato de linalila (classe éster) e o benzaldeído (grupo aldeído) não foram encontrados no cravo no estágio vegetativo (Tabela 1).

As plantas de cravo em floração emitiram 17 compostos, liberaram níveis mais altos de derivativos de ácidos graxos do que os demais tratamentos com o cravo, exceto o 2-etila-1-hexanol que foi maior pra o infestado. Em contraposição, níveis mais baixos foram encontrados nos fenilpropaniodes (não emitiram benzaldeído e acetato de linalila). Não houve emissão dos terpenos β-mirceno e canfeno (grupo monoterpene). Entre os terpenos, linalol (grupo monoterpene) se destacou, apresentou nível mais alto no cravo em floração em relação aos outros tratamentos com o cravo (Tabela 1).

O cravo em floração infestado emitiu 19 compostos, sendo que o DAG 2-Etila-1-hexanol, o fenilpropanoide salicilato de metila e os terpenos β-felandreno, γ-terpineno (grupo monoterpene), cariofileno e (Z) β- farneseno (grupo sesquiterpene) tiveram maiores emissões em relação aos demais tratamentos com cravo. Os fenilpropaniodes, acetato de linalila e o benzaldeído não foram emitidos quando o cravo em floração estava infestado por *M. persicae* (Tabela 1).

Foram emitidos 17 compostos pelas plantas de pimentão, sendo que os DAGs terpenos e fenilpropanoide tiveram as menores emissões em comparação ao pimentão infestado. Dentre os

derivativos de ácidos graxos, os compostos 2-etila-1-hexanol (grupo álcool), nonanol (grupo aldeído), se destacaram com maiores níveis do que os demais tratamentos. O benzaldeído encontrado exclusivamente em plantas de pimentão, é o composto mais abundante no pimentão intacto. Entre os terpenos, os compostos β -pineno e β -felandreno (grupo monotерpeno) tiveram maiores níveis no pimentão intacto do que no pimentão infestado. Não foram encontrados nos DAGs, o indol (classe aromático heterocíclico) e nos terpenos, os δ -limoneno e piperitone (Tabela 1).

O pimentão infestado apresentou o maior número de compostos emitidos (20), os DAGs, terpenos e fenilpropanoides tiveram as maiores emissões em comparação ao pimentão intacto. Dentre os DAGs, os compostos (*Z*) 2-hexenol e (*Z*) 3-hexeno-1-ol, acetato, tiveram mais altos níveis comparados com o pimentão intacto. Dentre os fenilpropanoides, o acetato de linalila, não encontrado nos tratamentos com cravo, teve maior emissão do que no pimentão intacto. Entre os terpenos, quatro compostos tiveram altos níveis comparados aos outros tratamentos, α -pineno, linalol (grupo monotерpeno), canfeno e cariofileno (grupo sesquiterpeno) (Tabela 1).

Quando compararam-se todos os tratamentos em análise multivariada (MANOVA), em relação às três classes de compostos químicos: DAGs, fenilpropanoides e terpenos, estes diferiram, consideravelmente em sua composição (Wilks' test, $P=0,002$). O mesmo não ocorreu quando foram comparados apenas os tratamentos com o cravo (Wilks' test, $P=0,080$) e entre os tratamentos apenas com o pimentão (Wilks' test, $P=0,900$).

A análise de componentes principais (PCA) dos tratamentos com o cravo, apresentou um total de cinco componentes principais, sendo que o componente principal 1 e 2 explica 51,4% da variância total. O gráfico plotado nos dois eixos do PCA mostrou separação entre as misturas do cravo. De acordo com o componente principal um, existe uma tendência de aproximação entre o cravo em floração e infestado, diferindo do vegetativo (Fig. 4). Para a análise dos componentes principais do pimentão, o perfil químico entre pimentão intacto e pimentão infestado foi mais claramente distinto do que foi encontrado nas plantas de cravo (Fig. 5). Existem três significantes componentes principais, com o primeiro explicando 44% e o segundo 25% da variância total. Em relação a junção de todos os tratamentos não houve clara distinção entre eles, porém houve uma leve separação do cluster do pimentão comparado com os demais tratamentos (Fig. 6).

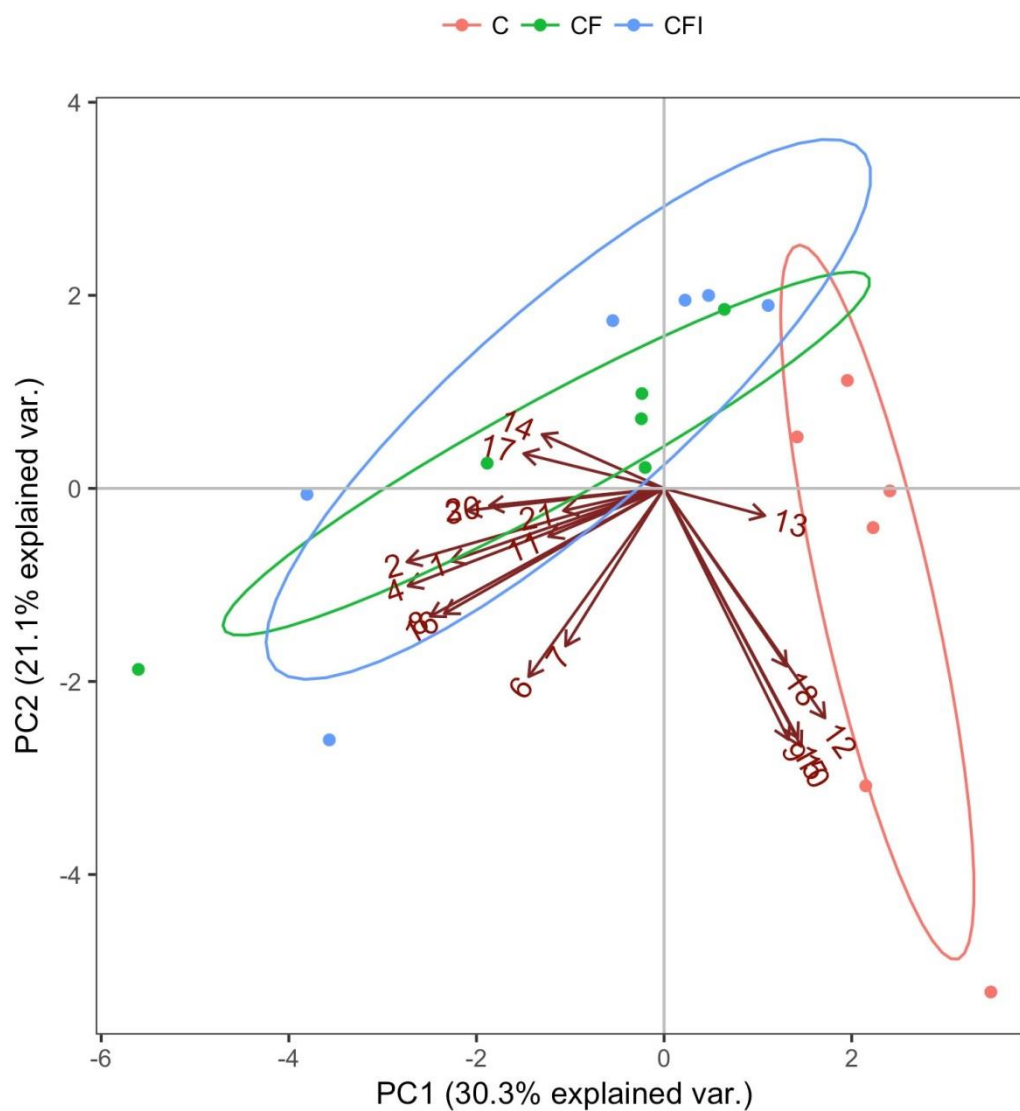


Fig. 4 Análise de componentes principais (PCA) na composição de voláteis emitidos por plantas de cravo no estágio vegetativo (C), cravo floração (CF) e cravo floração infestado por *Myzus persicae* (CFI). Número de vetor correspondem aos compostos enumerados na Tabela 1.

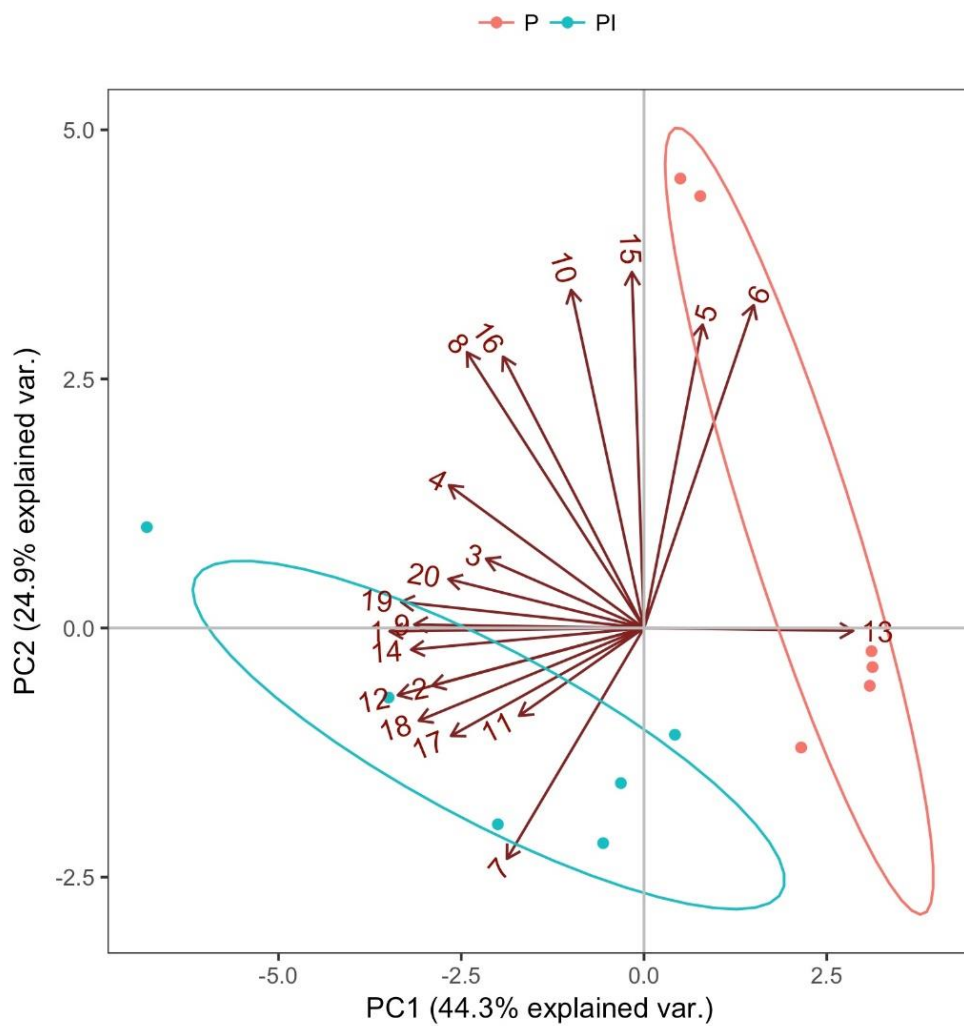


Fig. 5 Análise de componentes principais (PCA) na composição de voláteis emitidos por plantas de pimentão (P) e pimentão infestado por *Myzus persicae* (PI). Número de vetor correspondem aos compostos enumerados na Tabela 1.

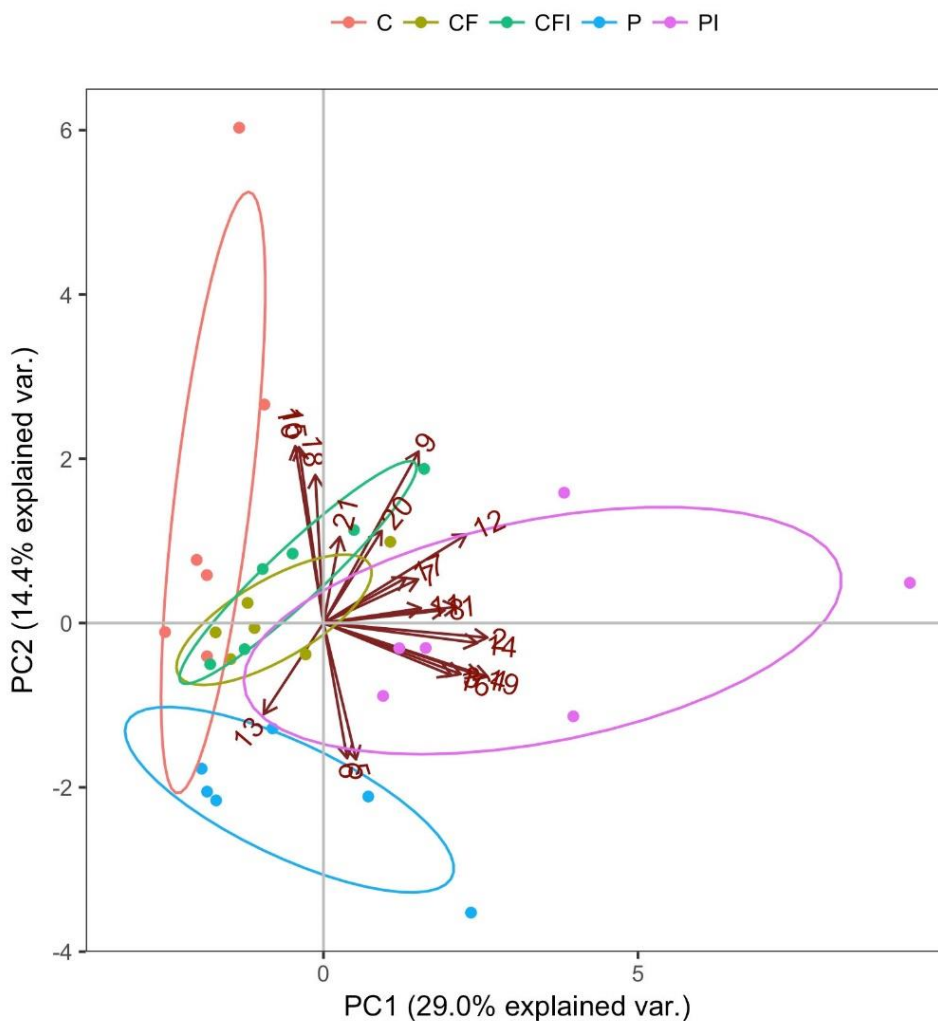


Fig. 6 Análise de componentes principais (PCA) na composição de voláteis emitidos por plantas de cravo no estágio vegetativo (C), cravo floração (CF), cravo floração infestado por *Myzus persicae* (CFI) pimentão (P) e pimentão infestado por *Myzus persicae* (PI). Número de vetor correspondem aos compostos enumerados na Tabela 1

DISCUSSÃO

As fêmeas de *A. platensis*, privadas de alimentação, não tiveram preferência na resposta olfativa pelas plantas de cravo amarelo em estágio vegetativo e pimentão intacto, já que estas plantas em estágio vegetativo não poderiam fornecer néctar e pólen indispensáveis à

sobrevivência dos parasitoides adultos (Jervis et al. 1996; Thompson; Hagen 1999; Wäckers 2001), fato que reforça a importância das flores para atrair e manter os parasitoides no ambiente.

No entanto, quando foi adicionado a componente floração, as plantas de cravo foram atrativas ao *A. platensis* em relação ao cravo no estágio vegetativo. O mesmo ocorreu quando foram ofertadas plantas trigo e manjerição em estágio vegetativo e floração para fêmeas do parasitoide *Trissolcus basalis* Wollaston (Hymenoptera: Scelionidae), que preferiu as plantas com floração (Foti et al. 2017). Assim, as fêmeas não alimentadas recém-emergidas de *A. platensis*, foram atraídas pelos voláteis das flores de cravo amarelo, provavelmente em busca de alimentos para desempenhar suas funções biológicas e comportamentais. De acordo com Souza et al. (2018) fêmeas não alimentadas de *A. platensis* liberadas em uma arena com pulgões hospedeiros, gasta mais tempo andando, possivelmente em busca de alimentos, do que propriamente, parasitando seus hospedeiros.

Aphidius platensis respondeu positivamente ao cravo em floração combinado com pimentão, ao invés do pimentão isoladamente, pois como discutido nos trabalhos de Wäckers (2004); Belz et al. (2013); Géneau et al. (2013); Sigsgaard et al. (2013) e Foti et al. (2017), a adição de uma planta que dê suporte ao parasitoide, influenciará na permanência deste no ambiente. Corroborando com resultados também encontrados por van Emden et al. (2008), que descobriu que a prole de *Aphidius rhopalosiphi* DeStefani Perez (Hymenoptera: Braconidae), proveniente de *Metopolophium dirhodum* Walker (Hemiptera: Aphididae), criados em plantas de trigo (planta hospedeira) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.), em teste com chance de escolha, preferiu o odor de plantas de trigo e tomate, ao odor de apenas trigo. Também Nilsson et al. (2012), onde as fêmeas de *Trybliographa rapae* Westwood (Hymenoptera: Figitidae) foram atraídas pelos odores combinados de repolho (*Brassica oleracea* var. alba cv. Castello) infestados por *Delia radicum* L. (Diptera: Anthomyiidae) e trigo (*Fagopyrum esculentum* Moench), a apenas o repolho infestado.

A manutenção dos inimigos naturais nos cultivos agrícolas está atrelada ao refúgio em outras plantas, ao fornecimento de recursos (fontes alternativas de alimento, hospedeiros, habitats alternativos e fontes de néctar) que podem estar ausentes no monocultivo (Landis et al. 2000; Wackers 2004; Perovic´ et al. 2010). Belz et al. (2013) mostraram que o parasitoide *Microplitis mediator* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) respondeu a cinco flores testadas (*Ammi majus* L.,

Centaurea cyanus L., *F. esculentum*, *Iberis amara* L. e *Origanum vulgare* L., para atração olfativa.

No entanto, quando foram combinados o cravo floração vs. pimentão e cravo floração com pimentão vs. pimentão, não houve preferência olfativa por *A. platensis*. A espécie de *A. platensis* utilizada no presente estudo foi criada sobre *M. persicae* mantidos em plantas de pimentão. Muitos parasitoides reconhecem pistas olfativas e físicas associadas aos hospedeiros de criação, e usam essas pistas aprendidas para localizar hospedeiros (Lewis e Tumlinson, 1988; Tumlinson et al., 1993; Turlings et al., 1993; De Rijk et al. 2018). O aprendizado na busca por hospedeiros pode desempenhar um papel importante na localização de alimentos pelos parasitoides.

Ao adicionar o herbívoro *M. persicae* o parasitoide preferiu o odor das plantas de pimentão infestadas em relação às plantas de pimentão intactas. *Diaeretiella rapae* McIntosh (Hymenoptera: Braconidae) preferiu os voláteis de *Brassica oleracea* var. *gemmifera* L. (Brassicaceae) infestadas com *Brevicoryne brassicae* (L., 1758) (Hemiptera: Aphididae), do que não infestadas (Najar-Rodriguez; Friedli; Dorn 2015). Comportamento similar ocorreu com as fêmeas de outra família de parasitoide, em que *T. rapae* foi atraída pelos odores de plantas de repolho infestadas por *D. radicum*, do que por repolho intacto (Nilsson et al. 2012).

De acordo com Desurmont et al. (2015), plantas em floração infestadas podem oferecer dupla recompensa (hospedeiro e comida) aos parasitoides. *D. rapae* preferiu o odor de flores de *Sinapis alba* (Brassicaceae) danificadas por *Lipaphis erysimi* Kaltentbach (Hemiptera: Aphididae), às flores da planta não danificada (Pareja et al. 2012). No presente estudo, as pistas olfativas dos recursos florais do cravo acrescidas da presença do pulgão, não resultaram na preferência pelo parasitoide

Dentro dos conceitos do Controle biológico conservativo, os recursos florais utilizados precisam fornecer nutrientes imprescindíveis à alimentação e emitir odores para atração e visitação dos parasitoides.

Neste estudo foi apresentado que o parasitoide *A. platensis* não tem preferência pelos odores das plantas de cravo em estágio vegetativo. Os terpenoides, δ -limoneno e careno foram um dos compostos dominantes nestas plantas, segundo Himejima et al. (1992) e Alarcon et al. (2015) eles apresentam atividade antimicrobiana, assim esses compostos podem ter influenciado na não atração pelo cravo vegetativo.

O perfil dos odores do cravo floração revelaram diferença entre os DAGs do cravo floração para o vegetativo. O DAGs são aldeídos (C6), álcoois e ésteres, são os compostos principais que contribuem para o “odor de folhas verdes”, característico de folhas (Hatanaka 1993). São moléculas-chave na sinalização entre plantas e outros organismos (Matsui et al., 2006). No geral, foram identificados cinco DAGs (3-hexanol, (Z) 2-hexenol, (Z) 3-hexeno-1-ol, acetato, 2-etila-1-hexanol e nonanol) no cravo, dos quais, todos foram encontrados em baixos níveis no cravo em estágio vegetativo. No cravo infestado apenas o composto 2-etila-1-hexanol teve maior concentração, do que o cravo em floração e o nonanol não teve diferença entre esses tratamentos.

O linalol é conhecido por ser componente típico de fragrâncias florais que atraem polinizadores (Bergström 1991; Ibanez et al. 2010) e componente atrativo para o *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) (Du et al. 1998). Embora não houve diferença significativa, verificou-se maior quantidade desse composto em cravo floração comparado com o vegetativo e o infestado. Os resultados, tanto das emissões dos DAGs, quanto do linalol para o cravo em floração corroboram com Foti et al. (2017), que encontraram diversos terpenos, como exemplo o linalol e DAG em outra espécie de cravo amarelo, *Tagetes platula* (L.).

O salicilato de metila embora não tenha sido detectado no cravo no estágio vegetativo, foi encontrado no cravo em floração. Esse composto desempenha papel na defesa da planta e atração de inimigos naturais (Heil 2004; Moraes et al. 2009). Assim, o odor das flores do cravo amarelo é especialmente relevante para *A. platensis*, pois o perfil químico dessas flores revelou compostos atrativos ao parasitoide.

Após a ocorrência da injúria, as plantas mudam a composição de voláteis, os parasitoides detectam essas mudanças e as utilizam para localização do hospedeiro (De Moraes et al. 1998; Guerrieri et al. 1993; Turlings et al. 1990). Neste trabalho, o perfil químico do cravo em floração infestado revelou que o DAGs 2-etila-1-hexanol teve maior quantidade em relação aos demais tratamentos com cravo. Os DAGs são conhecidos por fornecer informações químicas, sobre a localização de presas para inimigos naturais (Hoballah e Turlings 2005), o que corrobora com os resultados apresentados neste trabalho, pois esse composto foi o diferencial na resposta olfativa das plantas atacadas pelo herbívoro, *M. persicae*.

Os monoterpenos e sesquiterpenos podem estar envolvidos na resistência das plantas aos insetos e agentes patogênicos (Kesselmeier e Staudt 1999; Alarcon et al. 2015). Os monoterpenos (β -felandreno, γ -terpineno) e os sesquiterpenos (cariofileno e (*Z*) β -farneseno), tiveram maiores concentrações nos tratamentos com cravo floração infestado, que nos demais tratamentos. O salicilato de metila apresentou mais alto nível de emissão quando no cravo em floração infestado, do que no cravo em floração intacto.

No geral, as plantas de cravo não emitiram benzaldeído e acetato de linalila, diferente dos resultados deste trabalho. O benzaldeído foi encontrado em flores de *T. erecta* por Bruce e Cork (2001), em um total sete COVs, diferente também das emissões de 19 compostos apresentadas para as flores do cravo. Contudo, não houve uma grande distinção entre os compostos revelados para o cravo floração intacto e infestado, mas pode-se perceber através da análise de PCA, que os compostos do cravo no estágio vegetativo, separou de ambos cravos em floração.

O perfil químico entre os tratamentos com plantas de pimentão, foi mais claramente distinto, do que foi mostrado para as plantas de cravo. Os terpenos δ -limoneno e piperitone e fenilpropanoide indole, foram correlacionados com as amostras dos voláteis de pimentão infestado. Os COVs encontrados a partir da análise da parte aérea das plantas de pimentão, indicaram que δ -limoneno, piperitone e indole são os voláteis induzidos pela herbívora do *M. persicae*, indicando papel importante na atração do *A. platensis*. O benzaldeído e acetato de linalila que não foram detectados em plantas de cravo, foram encontrados nas plantas de pimentão, ressaltando em maior quantidade dos dois compostos no pimentão intacto.

Os resultados mostraram que somente *T. erecta* em floração, emite COVs que influenciam a preferência olfativa, na atração do parasitoide *A. platensis*. O parasitoide preferiu aos odores da planta de cravo em floração, quando esta foi ofertada junto ao pimentão, mas não para o pimentão isoladamente. Os DAGs foram encontrados em maior quantidade nos cravos em floração. O pimentão infestado foi mais atraente para *A. platensis*, do que o pimentão intacto. Essas informações sugerem que as flores do cravo amarelo, podem ser utilizadas na diversificação dos sistemas agrícolas como estratégia do controle biológico conservativo, pois oferece pistas olfativas atrativas para o parasitoide de pulgão, *A. platensis*. Além disso, encoraja a realização de outras pesquisas utilizando o cravo amarelo na atratividade de diferentes espécies de inimigos naturais.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) Capes pela concessão da bolsa de doutorado ao primeiro autor, ao Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras por viabilizarem a realização dos trabalhos, e ao professor Dr. José Maurício Simões Bento do laboratório de Ecologia química e Comportamento de Insetos na ESALQ e sua equipe pela realização das coletas e identificações de voláteis.

REFERÊNCIAS

- Alarcon AA, Lazazzara V, Cappellin L et al (2015). Emission of volatile sesquiterpenes and monoterpenes in grapevine genotypes following *Plasmopara viticola* inoculation in vitro. *J Mass Spectrom* 50(8):1013-1022. <https://doi.org/10.1002/jms.3615>
- Belz E, Kölliker M, Balmer O (2013) Olfactory attractiveness of flowering plants to the parasitoid *Microplitis mediator*: potential implications for biological control. *BioControl* 58(2):163-173. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9472-0>
- Benelli G, Giunti G, Messing RH, Wright MG (2013). Visual and olfactory female-borne cues evoke male courtship in the aphid parasitoid *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). *J Insect Behav* 26(5), 695-707. <https://doi.org/10.1007/s10905-013-9386-4>
- Bergström G (1991) Chemical ecology of terpenoid and other fragrances of angiosperm flowers. In: Harborne JB, Tomas-Barberan FA (eds) *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*, Clarendon Press, Oxford, pp 287-296
- Bruce TJ, Cork, A (2001). Electrophysiological and behavioral responses of female *Helicoverpa armigera* to compounds identified in flowers of African marigold, *Tagetes erecta*. *J Chem Ecol* 27(6):1119-1131
- De Moraes CM, Lewis WJ, Paré PW, Alborn HT, Tumlinson JH (1998) Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 393:570-573.
- De Rijk M, Sánchez VC, Smid HM et al (2017). Associative learning of host presence in non-host environments influences parasitoid foraging. *Ecol Entomol*. <https://doi:10.1111/een.12504>
- Desurmont GA, Laplanche D, Schiestl FP, Turlings TC (2015). Floral volatiles interfere with plant attraction of parasitoids: ontogeny-dependent infochemical dynamics in *Brassica rapa*. *BMC ecology* 15:1-11

Du Y, Poppy GM, Powell W et al (1998) Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract the parasitoid *Aphidius ervi*. *J Chem Ecol* 24(8):1355-1368.

<https://doi.org/10.1023/A:1021278816970>

Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK, Kaplan I (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol* 198(1):16-32.

<https://doi:10.1111/nph.12145>

Foti MC, Rostás M, Peri E et al (2017) Chemical ecology meets conservation biological control: identifying plant volatiles as predictors of floral resource suitability for an egg parasitoid of stink bugs. *J Pest Sci* 90(1):299-310. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0758-3>

Géneau CE, Wäckers FL, Luka H, Balmer O (2013) Effects of extrafloral and floral nectar of *Centaurea cyanus* on the parasitoid wasp *Microplitis mediator*: olfactory attractiveness and parasitization rates. *Biol Control* 66(1):16-20. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.02.007>

Guerrieri E, Pennacchio F, Tremblay E (1993) Flight behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) in response to plant and host volatiles. *Eur J Entomol* 90:415-421

Gurr GM, Wratten SD, Altieri MA (2004) Ecological engineering, habitat manipulation and pest management. In: Gurr GM, Wratten SD, Altieri MA (eds) *Ecological engineering for pest management: advances in habitat manipulation for arthropods*. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia, pp 1-12

Haro MM, Silveira LCP, Wilby A (2018) Stability lies in flowers: plant diversification mediating shifts in arthropod food webs. *PloS one*, 13(2):e0193045.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193045>

Hatanaka A, Kajiwara T, Sekiya J (1987) Biosynthetic pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. *Chem Phys Lipids* 44:341-361

- Heil M (2004) Induction of two indirect defences benefits Lima bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) in nature. *J Ecol* 92(3):527-536. <https://doi.org/10.1111/j.0022-0477.2004.00890.x>
- Hoballah ME, Turlings TCJ (2005) The role of fresh versus old leaf damage in the attraction of parasitic wasps to herbivore-induced maize volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 31(9):2003-2018. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-6074-7>
- Hoffmann C, Köckerling J, Biancu S et al (2017) Can Flowering greencover crops promote biological control in German vineyards? *Insects* 8(4):121. <https://doi.org/10.3390/insects8040121>
- Himejima M, Hobson KR, Otsuka T, Wood DL, Kubo I (1992) Antimicrobial terpenes from oleoresin of Ponderosa pine tree (*Pinus ponderosa*): a defense mechanism against microbial invasion. *J Chem Ecol* 18(10):1809-1818. <https://doi.org/10.1007/BF02751105>
- Ibanez S, Dotterl S, Anstett MC et al (2010) The role of volatile organic compounds, morphology and pigments of globeflowers in the attraction of their specific pollinating flies. *New Phytol* 188(2):451-63. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03317.x>
- Jervis M, Hawkins B, Kidd NAC (1996) The usefulness of destructive host feeding parasitoids in classical biological control: theory and observation conflict. *Ecol Entomol* 21(1):41-46.
- Kesselmeier J, Staudt M (1999). Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *J Atmos Chem*, 33(1), 23-88.
- Khan ZR, James DG, Midega CAO, Pickett JA (2008) Chemical ecology and conservation biological control. *Biol Control* 45(2):210-224. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.11.009>
- Landis DA, Wratten SD, Gurr GM (2000) Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annu Rev Entomol* 45:175-201. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.175>

Lewis WJ, Takasu K (1990) Use of learned odors by a parasitic wasp in accordance with host and food needs. *Nature* 348(6302):635-636. <https://doi:10.1038/348635a0>

Lewis WJ, Tumlinson JH (1988) Host detection by chemically mediated associative learning in a parasitic wasp. *Nature* 331(6153):257-259. <https://doi:10.1038/331257a0>

Matsui K (2006) Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9(3):274-280. <https://doi:10.1016/j.pbi.2006.03.002>

Marques MM, Morais SM, Vieira ÍG et al (2011) Larvicidal activity of *Tagetes erecta* against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Contr Assoc* 27(2):156-158. <https://doi.org/10.2987/10-6056.1>

Moraes MC, Laumann RA, Pareja, M, et al (2009). Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with cis-jasmone. *Entomol Exp Appl* 131(2):178-188. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00836.x>

Najar-Rodriguez AJ, Friedli M, Klaiber J, Dorn S (2015). Aphid-deprivation from Brassica plants results in increased isothiocyanate release and parasitoid attraction. *Chemoecology* 25(6):303-311.
<https://doi:10.1007/s00049-015-0199-0>

Nilsson U, Eriksson A, Rämert B, Anderson P (2012) Male and female *Trybliographa rapae* (Hymenoptera: Figitidae) behavioural responses to food plant, infested host plant and combined volatiles. *Arth-Plant Int* 6(2):251-258. <https://doi.org/10.1007/s11829-011-9176-x>

Pareja M, Qvarfordt E, Webster B et al (2012). Herbivory by a phloem-feeding insect inhibits floral volatile production. *PLoS One* 7(2):e31971. <https://doi:10.1371/journal.pone.0031971>

Perović DJ, Gurr GM, Raman A, Nicol HI (2010) Effect of landscape composition and arrangement on biological control agents in a simplified agricultural system: a cost-distance approach. *Biol Control*, 52(3):263-270. <https://doi:10.1016/j.biocontrol.2009.09.014>

Pickett JÁ, Bruce TJA, Chamberlain K, Woodcock CM (2006) Plant volatiles yielding new ways to exploit plant defence. In: Dicke M, Takken W (eds) *Chemical ecology: from gene to ecosystem*. Springer, The Netherlands, pp 161-173

Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez VH (1999) Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais 5ª aproximação. UFV, Viçosa

Salinas-Sánchez DO, Aldana-Llanos L, Valdés-Estrada ME, Gutiérrez-Ochoa M, Valladares-Cisneros G, Rodríguez-Flores E (2012) Insecticidal activity of *Tagetes erecta* extracts on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Fla Entomol* 95:428-432.

<https://doi.org/10.1653/024.095.0225>

Sampaio MV, Bueno VHP, De Conti BF (2008) The effect of the quality and size of host aphid species on the biological characteristics of *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Eur J Entomol* 105(3):489-494.

Silva SEB, França JF, Pareja M (2016) Olfactory response of four aphidophagous insects to aphid-and caterpillar-induced plant volatiles. *Arth-Plant Int* 10(4):331-340.

<https://doi.org/10.1007/s11829-016-9436-x>

Silveira LCP, Berti-Filho E, Pierre LSR, Peres SC, Louzada JL (2009) Marigold (*Tagetes erecta* L.) as an attractive crop to natural enemies in onion fields. *Sci Agric* 66:780-787

Sigsgaard L, Betzer C, Naulin C et al (2013). The effect of floral resources on parasitoid and host longevity: prospects for conservation biological control in strawberries. *J Insect Sci* 13(1):1-7.

<https://doi.org/10.1673/031.013.10401>

Souza IL, Marucci RC, Silveira LCP, Paulo NCP, Lee JC, Jana C (2018) Effects of marigold on the behavior, survival and nutrient Reserves of *Aphidius platensis*. *BioControl*.

<https://doi.org/10.1007/s10526-018-9882-8>

Souza IL, Tomazella VB, Santos AJN, Moraes T, Silveira LCP (2018) Parasitoids diversity in organic sweet pepper (*Capsicum annuum*) associated with basil (*Ocimum basilicum*) and marigold (*Tagetes erecta*). *Braz J Biol* 79(4),

Stewart-Jones A, Poppy GM (2006) Comparison of glass vessels and plastic bags for enclosing living plant parts for headspace analysis. *J Chem Ecol* 32(4):845-864.

<https://doi.org/10.1007/s10886-006-9039-6>

Thompson SN, Hagen KS (1999) Nutrition of entomophagous insects and other arthropods. In: Bellows TS, Fisher TW (eds) *Handbook of biological control*. Academic Press, San Diego, pp 594-652

Tumlinson JH, Lewis WJ, Vet LEM (1993) How parasitic wasps find their hosts. *Sci Am* 268(3):100-106

Turlings TCJ, McCall PJ, Alborn HT, Tumlinson JH (1993) An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. *J Chem Ecol* 19(3): 411-425.

<https://doi.org/10.1007/BF00994314>

Turlings TCJ, Tumlinson JH, Lewis WJ (1990) Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* 250(4985):1251-1253.

<https://doi.org/10.1126/science.250.4985.1251>

Van Emden HF, Storeck AP, Douloupaka S et al (2008). Plant chemistry and aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae): imprinting and memory. *Eur J Entomol* 105(3):477-483

Wäckers FL, Lewis WJ (1994) Olfactory and visual learning and their combined influence on host site location by the parasitoid *Microplitis croceipes* (Cresson). *Biol Control* 4(2):105-112.
<https://doi.org/10.1006/bcon.1994.1018>

Wäckers FL (2001) A comparison of nectar- and honeydew sugars with respect to their utilization by the hymenopteran parasitoid *Cotesia glomerata*. *J Insect Physiol* 47(9):1077-1084.
[https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00088-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00088-9)

Wäckers FL, Bonifay C (2004). How to be sweet? Extrafloral nectar allocation in *Gossypium hirsutum* fits optimal defense theory predictions. *Ecology*, 85(6):1512-1518.
<https://doi.org/10.1890/03-0422>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No geral com esse trabalho foi possível elucidar o papel das flores do cravo amarelo (*T. erecta*) para o parasitoide de pulgões *A. platensis*, pois permitiu investigar os benefícios da adição de mais um componente vegetal no cultivo de uma hortaliça de importância agrícola. O cravo amarelo otimizou o comportamento de busca do parasitoide, aumentou a sobrevivência e a taxa de parasitismo e forneceu nutrientes necessários para a alimentação e manutenção deste. Além disso, foi atrativo por apresentar compostos orgânicos voláteis aos quais o parasitoide responde positivamente. Dessa forma, respalda a utilização do cravo amarelo como estratégia do controle biológico conservativo para atrair e manter o parasitoide de pulgão *A. platensis*.

