

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Interação entre rúcula (*Eruca sativa* Miller) e rizobactéria (*Bacillus subtilis* GB03): efeitos na oviposição e desenvolvimento larval da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)**

**Rafaela Cristina dos Santos**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração:  
Entomologia

**Piracicaba  
2016**

Rafaela Cristina dos Santos  
Engenheira Agrônoma

**Interação entre rúcula (*Eruca sativa* Miller) e rizobactéria (*Bacillus subtilis* GB03):  
efeitos na oviposição e desenvolvimento larval da traça-das-crucíferas,  
*Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)**  
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **PAUL WHITAKER PARÉ**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração:  
Entomologia

**Piracicaba  
2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Santos, Rafaela Cristina dos

Interação entre rúcula (*Eruca sativa* Miller) e rizobactéria (*Bacillus subtilis* GB03):  
efeitos na oviposição e desenvolvimento larval da traça-dascrucíferas, *Plutella xylostella*  
(L.) (Lepidoptera: Plutellidae) / Rafaela Cristina dos Santos. - - versão revisada de acordo  
com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.  
55 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. PGPR 2. Voláteis de plantas 3. Interação microrganismo-planta-inseto  
4. Microrganismos benéficos I. Título

CDD 635.5  
S237i

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho aos meus pais Valmir e Ione, à minha irmã Gabriela, às minhas avós Maria Joana e Regina e ao meu namorado Felipe.*



## *Agradecimentos*

*A Deus e à Nossa Senhora Aparecida por estarem sempre comigo me abençoando, iluminando e protegendo.*

*Aos meus pais Valmir e Ione, à minha irmã Gabriela e às minhas avós Maria Joana e Regina, por todo amor, incentivo, por sempre estarem ao meu lado sendo meu maior apoio.*

*Ao meu namorado Felipe, pelo amor, companheirismo, compreensão, paciência, amizade e por ter sido meu apoio nas horas de fragilidade.*

*Ao professor Paul Paré pelos ensinamentos e orientação durante o mestrado.*

*Ao professor José Maurício Simões Bento, por todas as oportunidades oferecidas, por ter me recebido no laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos da ESALQ.*

*À CAPES por ter me concedido bolsa para realização dos meus estudos durante o mestrado.*

*À professora Cristiane Nardi por ser minha mãe entomológica.*

*Ao professor Sérgio de Bortoli do Laboratório de Biologia e Criação de Insetos da Unesp, Jaboticabal, pelo fornecimento de pupas de *P. xylostella* para o início da criação.*

*Ao professor Ítalo Delalibera e à Solange por permitirem o uso do Laboratório de Patologia de Insetos.*

*À secretária do Departamento de Entomologia e Acarologia, Andrea, por sempre saber tudo, nos passar as informações que precisamos e salvar nossas vidas.*

*À professora Maria Fernanda Peñaflor pelos ensinamentos, exemplo de pessoa e de vida e por estar sempre disposta a ajudar e passar o conhecimento.*

*À Franciele Santos agradeço imensamente por toda disposição em me ajudar, principalmente nos momentos finais, pela amizade, apoio e paciência.*

*À Arodí pelo auxílio com os equipamentos e análises e pelos puxões de orelha.  
À Patrícia Sanches, pela amizade, companheirismo, pelo exemplo de dedicação, por me ajudar com as minhas “filhas” e pelas descobertas estatísticas juntas.*

*À Mariana Leite pela amizade, por alegrar meus dias e pela parceria nas disciplinas durante o mestrado.*

*À Luiza por ter me recepcionado ao chegar a Piracicaba.*

*Ao teacher Fernando Sujimoto pela ajuda com o inglês e com as disciplinas.*

*À Kamila pelo auxílio com os cuidados da criação de *Plutella*.*

*À Denise Alves e ao professor Luis Carlos Marchini por me darem permissão para utilizar o Laboratório de Insetos Úteis da ESALQ.*

*A todos os integrantes do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, minha hermana Natalia, mami Lucila, a sementinha da discórdia Aline, às Camila's, ao Weliton, Davi, Diego, Janaína, Felipe e Fernando Cabezas, pela convivência, amizade, pelos cafés, conversas, momentos de descontração, por terem contribuído de alguma forma para o meu projeto e meu crescimento pessoal.*

*A todos os meus colegas de turma do mestrado, por sofrermos juntos, pelos momentos de descontração e por tornarem a nossa turma muito especial, unida e descontraída.*

*À minha amiga e colega de casa Gislaine, por estar sempre do meu lado, pelo companheirismo, apoio, conselhos e amizade.*

*À minha mineira preferida Ana Clara, por ser uma simpatia em pessoa, por alegrar meus dias e por ser minha companheira em todos os momentos.*

*“O pior erro que alguém pode cometer é desistir  
de aprender o que quer que seja apenas  
porque encontrou uma dificuldade.”*

*Professor Pier*





## SUMÁRIO

RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	15
1 INTRODUÇÃO .....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Aspectos biológicos e importância econômica de <i>Plutella xylostella</i> .....	19
2.2 Família Brassicaceae .....	21
2.3 <i>Bacillus subtilis</i> (GB03) .....	22
2.4 Plantas como mediadoras de interações entre microrganismos radiculares e insetos de parte aérea.....	23
3 METODOLOGIA .....	25
3.1 Multiplicação e inoculação de <i>B. subtilis</i> (GB03).....	25
3.2 Cultivo das plantas .....	26
3.3 Criação de <i>P. xylostella</i> .....	26
3.4 Crescimento de plantas de rúcula.....	28
3.5 Desempenho de <i>P. xylostella</i> em plantas de rúcula.....	27
3.6 Bioensaio em olfatômetro.....	28
3.7 Teste de preferência de oviposição de <i>P. xylostella</i> .....	29
3.8 Coleta de voláteis .....	30
3.9 Análise Estatística .....	31
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Área foliar e biomassa seca de plantas de rúcula inoculadas e não inoculadas com <i>B. subtilis</i> (GB03) .....	33
4.2 Ganho de peso de lagartas de <i>P. xylostella</i> e área foliar consumida de plantas de rúcula .	34
4.3 Preferência de oviposição de <i>P. xylostella</i> .....	36
4.4 Voláteis emitidos por plantas de rúcula.....	37
4.5 Análise dos componentes principais (PCA) .....	39
5 DISCUSSÃO.....	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	45
REFERÊNCIAS .....	47



## RESUMO

### **Interação entre rúcula (*Eruca sativa* Miller) e rizobactéria (*Bacillus subtilis* GB03): efeitos na oviposição e desenvolvimento larval da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)**

As rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) são microrganismos que ocorrem naturalmente no solo, são conhecidas por proporcionar melhorias no desenvolvimento das plantas atuando de diversas formas. *Bacillus subtilis* (cepa GB03) é uma PGPR disponível para comercialização como fungicida biológico concentrado, utilizada no tratamento de sementes de diversas culturas como algodão, soja, amendoim, trigo e cevada. Destaca-se pela capacidade de promover o crescimento de plantas por meio da emissão de voláteis. Vários estudos com *Arabidopsis thaliana* já comprovaram que *B. subtilis* (GB03) é capaz de auxiliar no desenvolvimento da planta por meio da promoção de crescimento e pela supressão de patógenos habitantes de solo. No entanto, o seu papel na proteção de plantas contra a herbivoria de insetos ainda não é bem caracterizado. Deste modo, buscou-se avaliar os efeitos da interação de *B. subtilis* (GB03) com plantas de rúcula (*Eruca sativa*) e *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas). Este inseto pertence à ordem Lepidoptera, considerado praga de maior importância no cultivo de Brassicaceae ao redor do mundo. Devido à sua alta prolificidade e capacidade de adaptação e ao seu curto ciclo de vida, tornou-se uma das pragas mais resistentes e de difícil controle da agricultura. Atualmente, os custos em escala mundial com o controle da praga anualmente chegam em torno de US \$ 4 a 5 bilhões. Foram utilizados dois tratamentos, plantas inoculadas com *B. subtilis* (GB03) e controle (plantas não inoculadas). Avaliou-se o crescimento de plantas de rúcula e o peso seco de parte aérea. Para avaliar o desempenho e dano de *P. xylostella* em ambos tratamentos, previamente foram pesados grupos de quinze lagartas e submetidas a alimentação de plantas de rúcula durante 24 horas. Posteriormente, as lagartas foram retiradas e pesadas novamente e a área foliar consumida foi calculada por meio do software editor de imagens ImageJ®. A preferência de oviposição do inseto foi testada por meio de olfatométria, composta apenas de pistas olfativas e em arenas contendo tanto pistas olfativas quanto visuais. A emissão de voláteis foi caracterizada quantitativamente e qualitativamente por cromatografia gasosa e analisada por espectrometria de massas. A inoculação com GB03 em plantas de rúcula promoveu melhor crescimento das plantas em relação ao tratamento controle, ao mesmo tempo em que diminuiu os danos pelo consumo alimentar do inseto na planta. *P. xylostella* não apresentou distinção entre os odores das plantas nos testes de olfatométria. Entretanto, observou-se menor número de ovos em plantas com GB03 nos bioensaios de arena. Não foram constatadas diferenças significativas na emissão total de voláteis entre os tratamentos com e sem GB03, no entanto, foram encontradas concentrações diferentes dos compostos (Z)-3-hexenol e 2-ethyl-1-decanol. Outros testes devem ser realizados com a finalidade de estabelecer o papel desempenhado por GB03 na indução de defesas de plantas contra insetos.

Palavras-chave: PGPR; Voláteis de plantas; Interação microrganismo-planta-inseto; Microrganismos benéficos



## ABSTRACT

### **Arugula (*Eruca sativa* Miller) and rhizobacteria (*Bacillus subtilis*, GB03) interaction: effects on oviposition and larval development of Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)**

The plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are microorganisms that naturally live in the soil, known by improving the plants' development in many ways. *Bacillus subtilis* (strain GB03) is a commercial available PGPR, sold as a concentrated biological fungicide, applied in seed treatment of different cultures as cotton, soybean, peanut, wheat and barley. Moreover, it stands out by its capacity of plant growth promoting via volatiles emission. Several studies with *Arabidopsis thaliana* showed that *B. subtilis* (GB03) can help the plant development via growth promotion and by soil pathogens suppression. However, its role in plant protection against insect herbivory has not been characterized yet. Thus, it aimed to evaluate the interaction effects among *B. subtilis* (GB03), arugula plants (*Eruca sativa*) and *Plutella xylostella* (Diamondback moth). This insect belongs to the order Lepidoptera and have been considered the main pest in Brassicaceae fields around the world. Due to its high prolificacy and plasticity in field survival, and its short life cycle, it has become one of the most resistant and hard control pest in agriculture. Currently, the annual world costs with this pest control is about US \$ 4-5 billions. Here, it was used two treatments, inoculated plants with *B. subtilis* (GB03) and control (non-inoculated plants). The arugula plants growth and dry mass of shoots were evaluated. To analyze the performance and damage by *P. xylostella* in both treatments, it was previously weighed groups with fifteen caterpillars and submitted to feeding on arugula plants during 24 hours. After that, the caterpillars were removed and weighed again and the consumed leaf area was calculated by the image editor software ImageJ®. The insect oviposition preference was tested by olfactometry, with only olfactory cues and in arenas containing both, olfactory and visual cues. Volatiles emission was quantitatively and qualitatively characterized by gas chromatography and analyzed by mass spectrometry. GB03 inoculation in arugula plants promoted a better growth when compared to control, and, at the same time, there was an increasing in the plant damage by insect food consumption. *P. xylostella* did not show distinction between odors of the plants in olfactometry tests. Although, it was observed less number of eggs in plants with GB03 in arena bioassays. It was not found significant differences in total volatile emission between the treatments with and without GB03, even though different concentrations of (Z)-3-hexenol and 2-ethyl-1-decanol were observed. Other tests must be performed in order to establish the role played by GB03 in plant induction defense against insects.

**Keywords:** PGPR; Plants volatiles; Microorganism-plant-insect interaction; Beneficial microorganisms



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
ISR	Indução de Resistência Sistêmica
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
SAR	Resistência Sistêmica Adquirida
AJ	Ácido Jasmônico
AS	Ácido Salicílico
TSA	Ágar Triptona de Soja
DIC	Detector de Ionização de Chama
KI	Kovats
PCA	Principal Component Analysis
COV	Compostos orgânicos voláteis
EAG	Eletroantenograma





## 1 INTRODUÇÃO

A família Brassicacea é uma das famílias de olerícolas mais numerosas, composta por muitas espécies de importância agrícola, compreendendo aproximadamente 340 gêneros e 3350 espécies (KOCH; HALBOULD; MITCHELL-OLDS, 2001). Entre as espécies pertencentes a essa família a rúcula (*Eruca sativa* Miller) destaca-se por sua composição nutricional e por seu odor e sabor característicos, alcançando cada vez mais espaço no mercado e na alimentação humana (FILGUEIRA, 2003; TRANI e PASSOS, 1998). Em contrapartida, a rúcula ainda é uma espécie pouco estudada e o crescente aumento do número de produtores dessa olerícola indica a necessidade da implementação de ações multidisciplinares para melhoria das suas táticas de manejo (MOURA et al., 2008).

Entre os fatores limitantes na produção dessas hortaliças pode-se destacar a ocorrência da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758), considerada a praga de maior importância econômica no cultivo de brassicáceas ao redor do mundo, os danos ocasionados por este lepidóptero reduzem drasticamente a produção e aumentam significativamente os custos com controle (DICKSON et al., 1990; SHELTON; NAULT, 2004). A traça-das-crucíferas foi o primeiro inseto a ser constatado o desenvolvimento de resistência a cepas de *Bacillus thuringiensis* em vários países (FERRÉ et al., 1991; MORISHITA; AZUMA; YANO, 1992; SHELTON et al., 1993; TABASHNIK et al., 1990). Além disso, o seu curto ciclo de vida e sua alta fecundidade fazem com que muitas gerações sejam expostas à ação de inseticidas usados rotineiramente pelos produtores, aumentando a pressão de seleção e contribuindo para o desenvolvimento de resistência à maioria dos princípios ativos de inseticidas encontrados atualmente no mercado (SAYYED; OMAR; WRIGHT, 2004),

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR- *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) ocorrem naturalmente no solo e vivem em simbiose com as raízes, estimulando o crescimento das plantas (KLOEPPER, 1980). As PGPR podem interagir de várias formas com os insetos acima do solo por meio das plantas, que atuam como mediadoras dessas interações (ERB et al., 2009; PINEDA et al., 2010; VAN DER PUTTEN et al., 2001). A promoção do crescimento de plantas é considerado o principal mecanismo mediador de interações entre plantas, microrganismos e insetos. A importância das defesas induzidas das plantas neste processo ainda tem sido pouco explorada, especialmente, o papel da indução da resistência sistêmica (ISR) nessas interações (BEZEMER; VAN DAM, 2005; VANNETTE; HUNTER, 2009).

Algumas PGPR encontram-se disponíveis para comercialização para serem utilizadas na agricultura, como é o caso de *Bacillus subtilis* (GB03), a qual é comercialmente produzida como fungicida biológico concentrado (Kodiak®, Bayer CropScience), indicado para o uso no tratamento de sementes de diversas culturas, como algodão, amendoim, feijão, soja, trigo, cevada e milho. A capacidade de *B. subtilis* (GB03) em estimular o crescimento de plantas por meio da emissão de voláteis, já foi comprovada em plantas de *Arabidopsis* (RYU et al., 2003) e rúcula (CHOI et al., 2014), assim como a melhoria no desenvolvimento e bem estar de plantas de *Arabidopsis* pelo aumento da capacidade fotossintética e tolerância à salinidade (ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2008b) e a melhoria na absorção de ferro em plantas de mandioca (FREITAS et al., 2015). Além disso, sua habilidade em competir e inibir o desenvolvimento de outros microrganismos também foi confirmada, sendo altamente efetiva na supressão de patógenos de raiz, como *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia solani* (BACKMAN; BRANNEN; MAHAFFEE, 1994; TURNER; BACKMAN, 1991). No entanto, os estudos sobre os efeitos da inoculação das plantas com *B. subtilis* (GB03) sobre o comportamento e desenvolvimento de insetos ainda são recentes, o que requer que mais estudos sejam realizados nesta área.

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da rizobactéria *B. subtilis* (GB03) sobre o crescimento de plantas de rúcula e seus efeitos na oviposição e desempenho larval de *P. xylostella*. Assim como, identificar e quantificar as concentrações dos voláteis emitidos por plantas de rúcula inoculadas ou não com a rizobactéria.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos biológicos e importância econômica de *Plutella xylostella*

Conhecida popularmente como traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1958) (Lepidoptera: Plutellidae), é considerada a praga de maior importância no cultivo de brássicas, devido à sua abrangência territorial e os danos às culturas (MORATÓ, 2000; ULMER et al., 2002). Sua capacidade em causar altos níveis de dano está relacionada ao seu elevado potencial reprodutivo e curto ciclo de vida, proporcionando várias gerações ao longo do ano (FRANÇA et al., 1985). A temperatura é um fator abiótico determinante no desenvolvimento deste inseto, de modo que, em regiões tropicais com temperaturas mais elevadas, o inseto pode apresentar até 15 gerações anuais (DIAS; SOARES; MONNERAT, 2004; POELKING, 1992).

Acredita-se que a traça-das-crucíferas seja originária do sul da Europa, provavelmente da região do Mediterrâneo e que migrou para outras partes do mundo, sendo considerada uma praga cosmopolita (CHAPMAN et al., 2002). No Brasil, os primeiros relatos de ocorrência deste lepidóptero foram realizados por Bondar (1928), em plantações de repolho na Bahia. O sucesso da colonização de plantações ao redor do mundo deve-se principalmente ao alto potencial biótico, a grande habilidade de dispersão a longas distâncias e a facilidade de adaptação em diversos ambientes (CASTELO BRANCO; GATEHOUSE, 2001; METCALF, 1981).

Os adultos são microlepidópteros, possuem hábito noturno, medem 8 a 10 mm de comprimento e apresentam coloração parda. Quando em repouso, a margem posterior das asas assume um formato semelhante ao de um diamante, fato que tornou a espécie conhecida por '*Diamondback moth*'. O dimorfismo sexual nos adultos pode ser verificado nos últimos segmentos do abdômen, onde pode-se observar duas manchas circulares de coloração marrom-avermelhada nas fêmeas, enquanto que os machos possuem apenas uma mancha alongada (GUIMARÃES; MICHEREFF FILHO; SETTI DE LIZ, 2011; VACARI, 2009).

As fêmeas são altamente prolíferas, podendo colocar mais de 300 ovos no decorrer do ciclo reprodutivo. As posturas normalmente são realizadas próximas às nervuras e podem ser agrupadas ou isoladas (THULER, 2009; TORRES; ZANUNCIO, 2001). Os ovos têm cerca de 1 mm de diâmetro, são de coloração amarelada e arredondados. Após dois ou três dias da oviposição, as lagartas começam a eclodir. No primeiro instar alimentam-se do mesófilo foliar, em seguida abandonam as galerias e passam a se alimentar da epiderme (IMENES et

al., 2002; MEDEIROS et al., 2003), passando por quatro instares até completar todo o seu desenvolvimento larval. O tamanho máximo observado nessa fase do desenvolvimento é de 8 a 10 mm de comprimento. Posteriormente, as lagartas transformam-se em pupas de 5 a 9 mm envoltas em um casulo branco de seda e podem apresentar colorações que variam de branco-amarelado à esverdeado, tornando-se mais escuras próximo à emergência que ocorre cerca de quatro dias após a formação das pupas (CASTELO BRANCO; FRANÇA; VILLAS BOAS, 1997).

O ataque de *P. xylostella* prejudica a comercialização das hortaliças, e os danos nas plantas são ocasionados pela alimentação das lagartas, especialmente no quarto instar onde observa-se o ataque mais severo da traça em todas as partes da planta (CAPINERA, 2015; CASTELO BRANCO; FRANÇA; VILLAS BOAS; 1997). A traça-das-crucíferas pode ocasionar danos à cultura durante todo o seu ciclo, apresentando maior importância na fase de muda, sendo prejudicial para a formação de cabeça em brócolis, repolho e couve-flor (CAPINERA, 2015). Em repolho as perdas podem atingir até 96% das cabeças comerciais (CASTELO BRANCO, 1999), já na cultura da couve, dependendo da região, do clima e da época de plantio, estima-se que os prejuízos causados à cultura podem chegar a 95% (CZEPAK et al., 2005).

No início dos anos 90 o custo anual para controle da traça-das-crucíferas era estimado em aproximadamente um bilhão de dólares (JAVIER, 1992). No entanto, entre os anos de 1993 e 2009 ocorreu um aumento de cerca de 39% na área cultivada de plantas da família Brassicaceae. Deste modo, observou-se que o custo com o manejo da praga teve um aumento diretamente proporcional à área cultivada, chegando a custar atualmente cerca de 4 a 5 bilhões de dólares por ano (ZALUCKI et al., 2012).

Apesar do controle químico ser a forma mais utilizada para controlar *P. xylostella*, a resistência a vários inseticidas tem sido um problema frequente (SHELTON et al., 1993). De acordo com Thuler (2006), a manifestação da resistência em *P. xylostella* pode ser explicada devido à sua elevada prolificidade e ao seu curto ciclo de vida, reduzindo drasticamente a eficiência dos produtos utilizados (CASTELO BRANCO et al., 2001; GEORGHIOU; LAGUNES-TEJADA, 1991).

Ankersmit (1953) fez os primeiros relatos sobre a resistência de *P. xylostella* ao diclorodifeniltricloroetano (DDT), na Índia, apenas três anos após o início da sua utilização, sendo o primeiro inseto a desenvolver resistência a esse princípio ativo. Também foi o primeiro inseto que mostrou-se resistente as toxinas de *Bacillus thuringiensis* no campo (KIRSCH; SCHUMUTTERER, 1988; TABASHINIK et al., 1990). Ao longo dos anos, a

traça-das-crucíferas tornou-se o lepidóptero mais resistente à ação de inseticidas, sendo constatada a resistência a mais de 51 princípios ativos utilizados no mundo (VASQUEZ, 1995).

A resistência de *P. xylostella* a inseticidas tem colaborado para o incentivo a pesquisas visando técnicas de manejo mais adequadas e conseqüentemente o desenvolvimento de estratégias dentro do manejo integrado de pragas (TALEKAR; SHELTON, 1993; THULER, 2006), destacando-se a rotação de culturas, controle biológico com parasitoides e fungos entomopatogênicos (CASTELO BRANCO; MEDEIROS, 2001; MONNERAT et al., 2000), cultivares resistentes e armadilhas com feromônio (EIGENBRODE; SHELTON; DICKSON, 1990; IMENES et al., 2002).

## 2.2 Família Brassicaceae

A família Brassicaceae é composta por diversas espécies de importância econômica, tais como a couve-flor, brócolis, canola, repolho, couve e rúcula. As plantas pertencentes à esta família podem ser encontradas e cultivadas no mundo todo, pois possuem elevada capacidade de adaptação às variações climáticas (HONG et al., 2008). No Brasil, são cultivadas principalmente na região centro-sul e apresentam custo de produção relativamente baixo comparado com outras espécies olerícolas (FILGUEIRA, 2008).

Devido às características nutricionais e ao baixo custo, as brassicáceas participam da base da alimentação mundial. Possuem em sua composição química grandes quantidades de compostos fenólicos secundários, os glucosinolatos, que são responsáveis pelo aroma e sabor característico dessa família e estão relacionados com a defesa da planta contra os insetos (CARTEA, 2011; DIXON, 2007; KEHR; BUTZ, 2011).

Além das plantas cultivadas que exercem importância econômica dentro da família Brassicaceae, pode-se também destacar a importância de *Arabidopsis thaliana* nesse grupo de olerícolas. *A. thaliana* tem sido utilizada como planta modelo para diversos estudos, os quais tem assumido papel importante na análise dos genomas de plantas, proporcionando melhor entendimento dos processos que ocorrem em diversas espécies, até mesmo em humanos (MEINKE et al., 1998; MEYEROWITZ; SOMERVILLE, 1994).

*A. thaliana* possui um genoma relativamente pequeno em relação a outras espécies, com cinco cromossomos e cerca de 26000 genes, o que facilita seu estudo. Possui também outras características que a tornam um bom modelo para realização de pesquisas, como: ciclo relativamente curto (seis semanas), alta capacidade reprodutiva, o que garante um elevado

número de sementes, é facilmente cultivável e possui um número significativo de linhagens geneticamente modificadas facilitando a análise e manipulação (FRANSZ et al., 1998; MEINKE et al., 1998). Deste modo, as semelhanças genéticas, fisiológicas e biológicas existentes entre as plantas pertencentes à família Brassicaceae podem auxiliar na aplicação em plantas cultivadas dos estudos realizados utilizando-se como base *A. thaliana*.

### **2.3 *Bacillus subtilis* (GB03)**

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) são microrganismos que ocorrem naturalmente no solo, colonizando raízes e estimulando o crescimento das plantas. Estas bactérias são aplicadas a uma ampla variedade de espécies agrícolas para melhorar o desenvolvimento das plantas, apresentando efeitos no aumento da emergência das sementes, peso da planta e indução de resistência a pragas e doenças (KLOEPPER et al., 1980).

*B. subtilis* (GB03) é uma PGPR que pode ser encontrada na região da rizosfera e possui a capacidade de emitir e modificar o perfil de voláteis e promover o crescimento das plantas (RYU et al, 2003; 2005). Estudos genéticos e fisiológicos em plantas de *Arabidopsis* demonstram que *B. subtilis* (GB03) possui compostos orgânicos voláteis que mediam a sinalização da auxina, expandindo a célula e permitindo a promoção do crescimento celular (ZHANG et al., 2008).

Ryu et al. (2003) constataram que em interações de plantas e rizobactérias, uma mistura de produtos químicos é liberado por cepas específicas de PGPR que pode desencadear a promoção do crescimento e induzir a resistência sistêmica em *Arabidopsis* e mudas vizinhas. Nesse estudo constatou-se que 2,3-butanodiol é um componente essencial bacteriano responsável pela sinalização química no ar provocando o crescimento em *Arabidopsis*.

Em estudos realizados posteriormente, constatou-se que *B. subtilis* (GB03) e *B. amyloliquefaciens* (IN937a) influenciaram plantas de *Arabidopsis* na promoção do crescimento e na indução de resistência sistêmica através de emissões de compostos voláteis. Foram detectados os metabólitos 2,3-butanodiol e 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) em GB03 e IN937a, enquanto esses mesmos compostos não foram detectados em outras cepas bacterianas não promotoras do crescimento (RYU et al., 2004, FARAG et al., 2006).

## 2.4 Plantas como mediadoras de interações entre microrganismos radiculares e insetos de parte aérea

As plantas são capazes de interagir de diversas formas com as mais variadas formas de vida durante seu ciclo e atuam como mediadoras entre organismos que vivem no solo e na parte aérea. Os microrganismos simbiotes que vivem no solo proporcionam melhorias no desenvolvimento das plantas e podem desencadear mudanças fisiológicas que influenciam nas interações com insetos de parte aérea. As PGPR atuam em simbiose com as plantas promovendo o crescimento e melhorias na resistência contra estresses bióticos e abióticos (ONGENA et al., 2007; PANGESTI et al., 2013; PINEDA et al., 2010).

Algumas PGPR são capazes de induzir a resistência sistêmica (ISR) nas plantas o que comumente resulta na redução do crescimento do patógeno e afeta a alimentação e desenvolvimento de insetos herbívoros. O mecanismo de ação desencadeado na ISR é semelhante ao induzido por patógenos, a qual é conhecida como resistência sistêmica adquirida (SAR) (RYU et al., 2004). A indução da SAR leva a um aprimoramento da resistência contra maiores ataques do mesmo patógeno ou de um microrganismo diferente (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997). A ISR ocorre pela colonização da rizobactéria na raiz em direção à parte aérea. O aumento da ISR pode ocorrer pela mediação dos fitormônios ácido jasmônico (AJ) e ácido salicílico (AS) (RYU et al., 2004; WEI; KLOEPPER; TUZUN, 1991).

Dependendo do hábito alimentar do inseto a ISR pode ser desencadeada via ácido jasmônico/etileno ou via ácido salicílico, ativando diferentes conjuntos de genes associados à defesa da planta (PANGESTI et al., 2013). Em geral, os insetos mastigadores são afetados pelas vias de defesa mediadas pelo ácido jasmônico (HOWE; JANDER, 2008; VAN OOSTEN et al., 2008; ZHENG et al., 2007), enquanto os insetos sugadores desencadeiam a ISR via ácido salicílico (DE VOS et al., 2007; ZARATE; KEMPEMA; WALLING, 2007).

A ISR e a promoção de crescimento de plantas por PGPR já foi comprovada por vários autores, como em plantas de tomate inoculadas com *B. subtilis* BsDN (VALENZUELA-SOTO et al., 2010). Estudos em campo também comprovaram a eficiência da utilização de PGPR afetando significativamente a população de crisomelídeos em plantas de pepino, ao mesmo tempo que foi constatado que as plantas inoculadas apresentaram um melhor desenvolvimento quanto ao tamanho e ao número de frutos (ZEHNDER et al., 1997).

O perfil de voláteis também pode ser alterado na presença de PGPR influenciando na seleção hospedeira dos insetos. Em estudos recentes comprovou-se que a inoculação de



plantas de milho com *Azospirillum brasilense* aumentou a emissão do composto (E)- $\beta$ -cariofileno, agindo como repelente de larvas de *Diabrotica speciosa* onde observou-se uma migração das larvas para as raízes das plantas sem a rizobactéria (SANTOS et al., 2014).

O grau de especialização do inseto também pode afetar as interações entre plantas, insetos e microrganismos. Insetos herbívoros generalistas normalmente são mais afetados por metabólitos tóxicos liberados por determinada espécie de planta, enquanto insetos especialistas geralmente não são afetados, podendo até mesmo utilizar esses compostos para reconhecimento de sua planta hospedeira (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE 2005). Esse fato foi observado em *Arabidopsis thaliana* inoculada com *Pseudomonas fluorescens* e avaliado seus efeitos sobre o desenvolvimento de um inseto especialista, *Pieris rapae*, e um generalista *Spodoptera exigua*. Verificou-se que o inseto especialista não foi afetado pelo mecanismo de ISR desencadeado por *P. fluorescens*, no entanto, a espécie generalista foi afetada negativamente pela presença da rizobactéria (VAN OOSTEN et al., 2008). O mesmo resultado foi observado quando se testou o efeito de *A. thaliana* inoculada com *P. fluorescens* sobre o afídeo generalista *Myzus persicae* e o especialista *Brevicoryne brassicae* (PINEDA et al., 2012).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Multiplicação e inoculação de *B. subtilis* (GB03)

As colônias de *B. subtilis* (GB03) foram obtidas do acervo de microrganismos da Texas Tech University, Lubbock, Texas, EUA. Para a repicagem do microrganismo utilizou-se uma alça de platina flambada e fria, retirando-se as células bacterianas da placa colonizada e deslizando a alça em zig-zag empregando o método de estriamento sobre uma nova placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo o meio de cultura agar triptona de soja (TSA), composto por 15g de caseína, 5g de peptona de soja, 5g de cloreto de sódio e 15g de ágar, para cada 1L de água destilada. A combinação de caseína e peptona de soja fornece nitrogênio orgânico ao meio, tornando-o nutritivo, o cloreto de sódio é responsável por manter o equilíbrio osmótico e o ágar dá a consistência ao meio, deste modo, o meio TSA pode ser utilizado para uma série de finalidades e suporta o crescimento de microrganismos não fastidiosos e moderadamente fastidiosos. Posteriormente, as placas foram vedadas com papel filme e mantidas em câmara incubadora tipo BOD à temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotofase de 12 horas durante 24 horas para o seu crescimento.

Para a inoculação das plantas com a rizobactéria, adicionou-se 10 mL de água destilada autoclavada em cada placa contendo as colônias bacterianas e em seguida realizou-se a raspagem com o auxílio de uma alça de Drigalski, obtendo-se uma suspensão aquosa bacteriana. Para a quantificação das colônias, 180 $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana diluída por três vezes foram colocados em uma Câmara de Neubauer e observados em microscópio óptico, adequando-se até chegar a uma concentração final de  $5\times 10^9$  bactérias  $\text{mL}^{-1}$ . Após a quantificação, adicionou-se 50 $\mu\text{L}$  da suspensão ao substrato juntamente com a semente de rúcula no momento da semeadura (Figura 1).

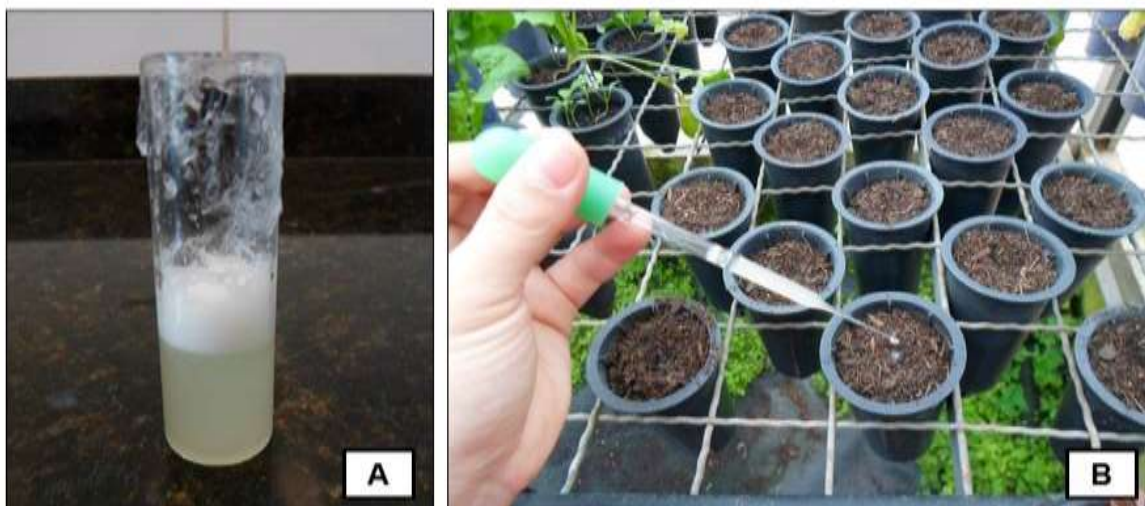


Figura 1 – Metodologia utilizada para inoculação de sementes de rúcula com *B. subtilis* (GB03). A) Suspensão de *B. subtilis* (GB03) contendo  $5 \times 10^9$  bactérias  $\text{mL}^{-1}$ ; B) Sementes sendo inoculadas com *B. subtilis* (GB03).

### 3.2 Cultivo das plantas

Sementes de rúcula foram semeadas em tubetes com capacidade de 200 mL preenchidos com substrato comercial Basaplant® e 2,5g do fertilizante Osmocote Plus® (15-09-12). O cultivo das plantas com inoculação de *B. subtilis* GB03 foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 3.1. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até completarem quarenta dias após emergência, sendo posteriormente utilizadas para a realização de bioensaios.

### 3.3 Criação de *P. xylostella*

Para dar início à criação, foram fornecidas quarenta pupas de *P. xylostella* da criação-estoque do Laboratório de Biologia e Criação de Insetos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal. Os insetos foram criados no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, em sala climatizada, com temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotofase de 12 horas e umidade relativa de  $70 \pm 10\%$ .

Os adultos recém-emergidos foram mantidos em gaiola de acrílico (30 cm de largura x 40 cm de altura x 30 cm de profundidade) com abertura frontal (13 cm de diâmetro) coberta por “voile” para facilitar o manuseio dos insetos. Plantas de couve e rúcula cultivadas em casa de vegetação foram colocadas no interior da gaiola como substrato para oviposição. A

alimentação dos adultos foi realizada por capilaridade, onde foram fornecidos pequenos recipientes plásticos contendo algodão e solução de mel a 10% (Figura 2, A). Após a eclosão das lagartas, as plantas do interior da gaiola foram substituídas por plantas novas e as lagartas foram transferidas para potes plásticos (5 cm de altura x 15 cm de comprimento x 12 cm de largura) e alimentadas com dieta natural a base de folhas de couve manteiga, sendo realizada a troca de alimento diariamente até os insetos atingirem a fase pupal (Figura 2, B).

As pupas foram retiradas das folhas com o auxílio de uma pinça entomológica e acondicionadas em potes plásticos (9 cm de diâmetro x 5 cm de altura) para obtenção dos adultos.



Figura 2 – Criação de *P. xylostella* em laboratório. A) Gaiola de acrílico para manutenção dos adultos; B) Recipiente contendo dieta natural à base de couve para alimentação das lagartas

### 3.4 Crescimento de plantas de rúcula

Plantas de rúcula com quarenta dias após a semeadura inoculadas e não inoculadas com *B. subtilis* (GB03) foram avaliadas quanto à área foliar e ao peso seco de parte aérea. Para isso, primeiramente as folhas das plantas foram retiradas e escaneadas para calcular a área foliar utilizando-se o software editor de imagens ImageJ®. Em seguida, as folhas foram mantidas em estufa a 160°C durante 72 horas, para a secagem do material com a finalidade de se obter o peso seco da parte aérea.

### 3.5 Desempenho de *P. xylostella* em plantas de rúcula

Avaliou-se o desempenho de *P. xylostella* em plantas de rúcula inoculadas e não inoculadas com *B. subtilis* (GB03) aos quarenta dias após a emergência, cada tratamento foi

composto por doze repetições. Deste modo, foram colocadas quinze lagartas de terceiro instar previamente pesadas em cada planta. Em seguida, as plantas foram envoltas com sacos de “voile” (20 cm de largura x 30 cm de comprimento) e amarrados com elástico para evitar a dispersão dos insetos. As plantas foram mantidas em sala climatizada à temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $70\pm 10\%$  e fotofase de 12 horas (Figura 3).

Após 24 horas da montagem do bioensaio, as lagartas foram retiradas das plantas e realizou-se novamente a pesagem para contabilizar o ganho de peso durante o período do experimento. A área foliar consumida foi calculada por meio do software editor de imagens Image J®.



Figura 3 – Bioensaio para verificar o desempenho de lagartas de *P. xylostella* em plantas de rúcula inoculadas e não inoculadas com *B. subtilis* (GB03).

### 3.6 Bioensaio em olfatômetro

A resposta olfativa de fêmeas de *P. xylostella* foi avaliada utilizando-se um olfatômetro em ‘Y’ para verificar a preferência do inseto quando exposto a dois odores diferentes. Para a realização do bioensaio, previamente formou-se casais com os adultos recém-emergidos para que ocorresse o acasalamento. Em seguida, as fêmeas fecundadas foram individualizadas para a utilização nos testes em olfatômetro. Os ensaios foram conduzidos em uma sala com condições controladas, mantida a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $70\pm 10\%$  e fotofase de 12 horas. O olfatômetro utilizado consistiu de um tubo simples e dois laterais cada um com 10 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. O sistema de olfatometria foi conectado ao ‘ARS Volatile Collection System’ (ARS, Gainesville, FLA, 19 USA). Nesse sistema, o fluxo de ar de entrada do equipamento passa por filtros de carvão, nos quais ocorre a limpeza do ar, em seguida, o ar é empurrado para o interior das cubas de vidro fechadas

contendo as plantas dos tratamentos e para os braços laterais do olfatômetro por meio de mangueiras flexíveis de Teflon®. O fluxo de ar dentro do sistema foi calibrado para 1,1 L/min para cada braço lateral do olfatômetro (Figura 4).

Em cada avaliação, liberou-se uma fêmea no tubo central do olfatômetro e observou-se por um período máximo de cinco minutos, registrando-se a escolha entre os tratamentos. A escolha do inseto por um dos tratamentos foi considerada após o cruzamento de uma linha que divide a metade dos braços laterais. A cada três avaliações os lados do olfatômetro foram invertidos e a cada dez repetições o olfatômetro e as plantas foram trocados.

Para avaliar os efeitos dos odores das plantas de rúcula na resposta olfativa de *P. xylostella*, utilizou-se as seguintes combinações de tratamentos: (i) Branco (cuba sem planta) vs. Controle (Plantas não inoculadas com *B. subtilis* (GB03)) e (ii) Controle vs. Planta inoculada com *B. subtilis* (GB03). Cada combinação foi constituída de 30 repetições.

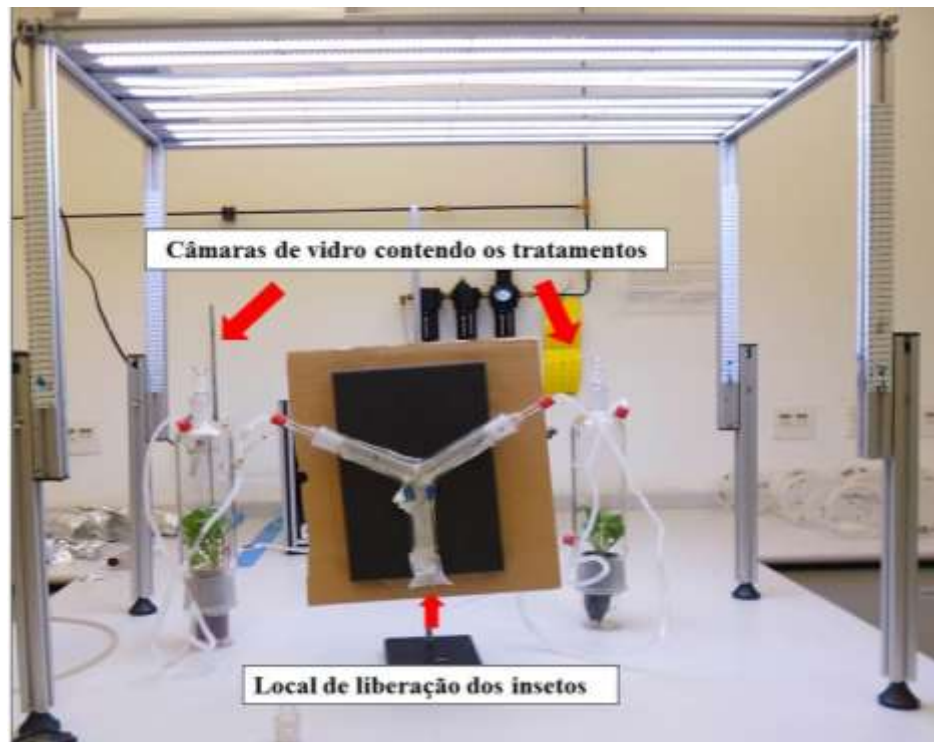


Figura 4 - Sistema de olfatometria utilizado para verificar a resposta olfativa de fêmeas fecundadas de *P. xylostella* quando exposta a diferentes odores

### 3.7 Teste de preferência de oviposição de *P. xylostella*

A preferência de oviposição de *P. xylostella* por plantas de rúcula inoculadas ou não inoculadas com *B. subtilis* (GB03) foi avaliada em arena de isopor (8L, 26 cm de comprimento, 11 cm de largura e 22 cm de altura). Fêmeas fecundadas foram inseridas individualmente nas caixas contendo uma planta controle e uma planta inoculada, totalizando

doze repetições. Para evitar a fuga dos insetos, a superfície superior da caixa foi vedada com tecido “voile” (Figura 5). As fêmeas permaneceram nessas condições durante 24 horas e após 12 horas as plantas foram trocadas para a contagem do número de ovos de cada período do dia.

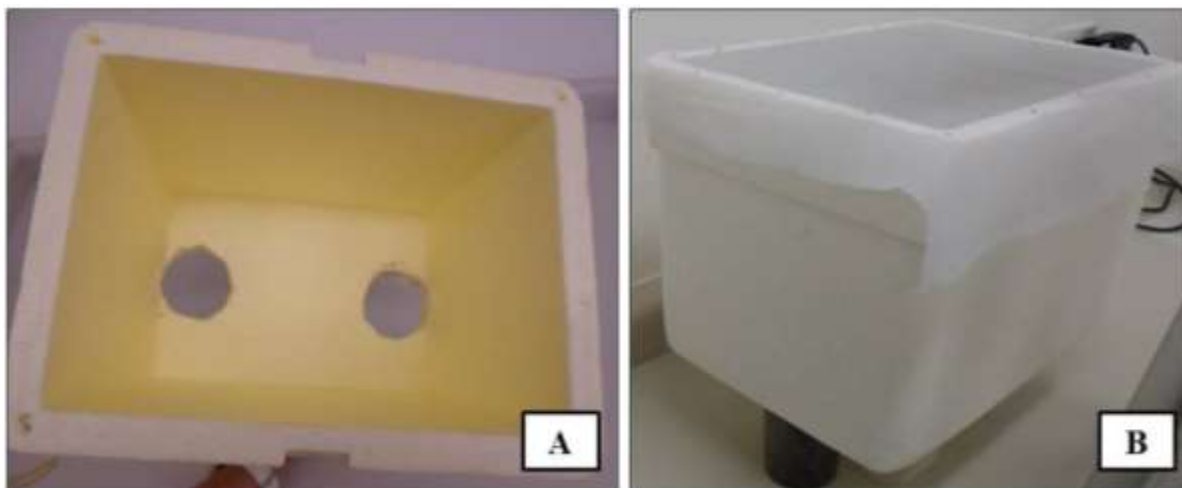


Figura 5 - Arenas utilizadas para testes de preferência de oviposição de *P. xylostella* mediante dois tratamentos diferentes. A) Interior da arena e local de inserção dos tubetes com os tratamentos; B) Arena contendo os tratamentos e coberta com “voile” para evitar a saída dos insetos

### 3.8 Coleta de voláteis

O sistema de coleta de voláteis de plantas utilizado foi baseado na metodologia descrita por Turlings et al. (1998). As plantas de rúcula foram acondicionadas em câmaras de vidro (10 cm de diâmetro x 5 cm de altura) previamente lavadas com acetona e hexano e acopladas ‘ARS Volatile Collection System’ (ARS, Gainesville, FLA, 19 USA), com fluxo de entrada de ar de 1.1 L/min, assim como o de saída, o qual foi mantido por meio de uma bomba a vácuo conectada a filtros com 30 mg de polímero adsorvente Super-Q® conectados às câmaras com plantas. As plantas de rúcula foram mantidas nesse sistema durante 24 horas, em sala climatizada, com temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $70\pm 10\%$  e fotofase de 12 horas. Foram coletados voláteis de oito plantas inoculadas e não inoculadas com *B. subtilis* GB03. Os filtros de polímero foram trocados a cada 12 horas (7:00 horas e as 19:00), com o objetivo de discriminar os voláteis emitidos no decorrer do dia e da noite (Figura 6). Posteriormente, os filtros foram eluídos com 150  $\mu\text{L}$  de solvente diclorometano. Os extratos foram armazenados em frascos de vidro, vedados e mantidos em um freezer a  $-30^{\circ}\text{C}$  até a análise.

A quantificação dos compostos foi realizada em GC-FID com coluna HP5, com o injetor ajustado em *splitless*, detector de ionização de chama (DIC) e hélio como gás de arraste (24 cm/s). A identificação dos compostos foi feita por meio de cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas (GC-MS- 2010 Plus) com coluna capilar HP1 MS (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m). Após a injeção e uma alíquota de 1  $\mu$ l de cada amostra, a temperatura da coluna foi mantida a 40°C por 1 min, elevada a uma velocidade de 5°C/min até atingir 150°C e depois reduzida para 20°C/min até 250°C. Os compostos foram identificados pela comparação dos espectros das amostras com a biblioteca NIST08, pelo cálculo do Índice de Kovats (KI) utilizando padrões de n-alcano (C7-C30) e os tempos de retenção de cada composto, assim como pela comparação dos espectros com os dos respectivos compostos sintéticos.

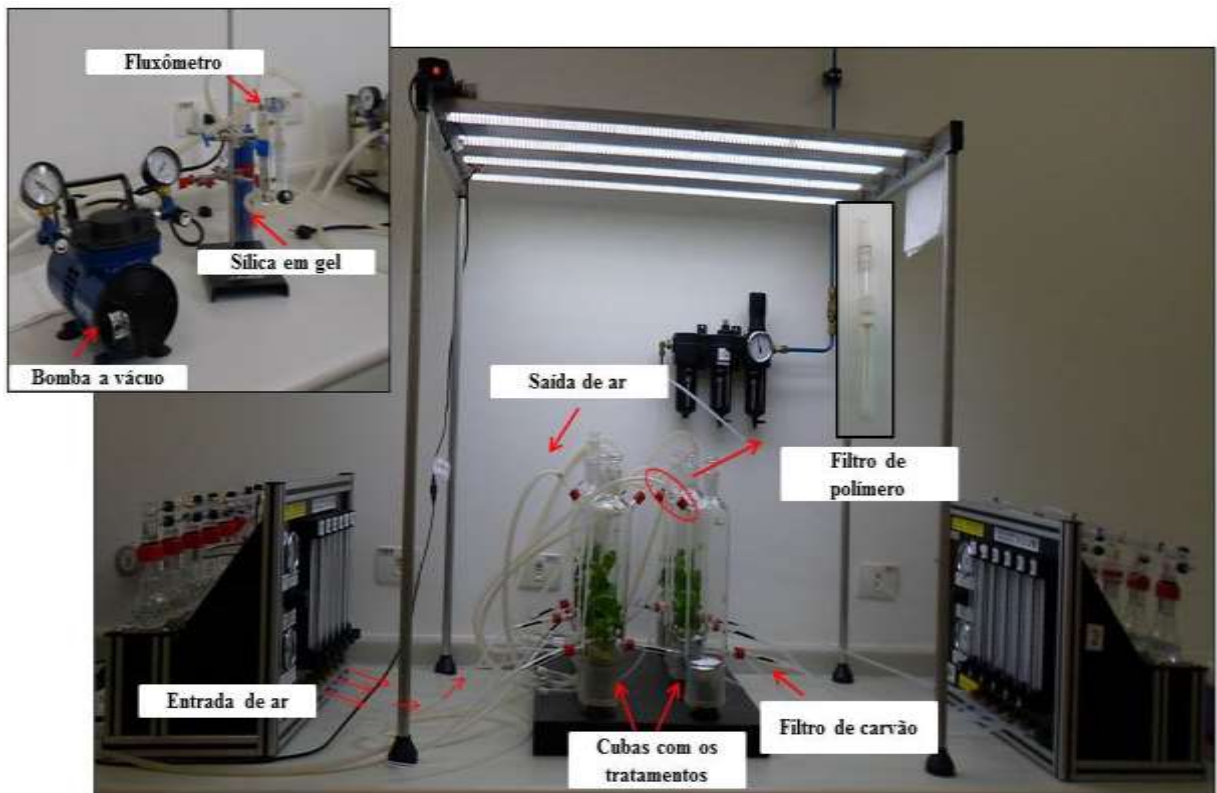


Figura 6 – Sistema utilizado para a coleta de voláteis, ‘ARS Volatile Collection System’, composto por dois ARS responsáveis pela entrada de ar nas cubas contendo as plantas de rúcula, conectados a elas por mangueiras de teflon e filtro de carvão e uma bomba à vácuo utilizada para o fluxo de saída do ar, conectada às cubas por filtros de polímero

### 3.9 Análise Estatística

A normalidade e homogeneidade dos dados foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Os dados referentes ao peso de lagartas de *P. xylostella*, a área foliar e biomassa seca de plantas foram analisados pelo teste t não pareado, enquanto que



os dados correspondentes ao teste de preferência de oviposição foram analisados pelo teste de Wilcoxon, não paramétrico. As proporções obtidas nos ensaios de preferência de *P. xylostella* em olfatométrica foram analisadas pelo teste de qui-quadrado. Estas análises foram conduzidas no pacote estatístico R (versão 3.0.3) ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

Os dados referentes à emissão total de voláteis foram analisados utilizando o teste de Tukey. Para averiguar se havia diferença na quantidade de cada composto entre os tratamentos utilizou-se o teste de análise de variância não paramétrico Kruskal-Wallis ranqueado.

Os dados de quantidade relativa (área de pico) dos voláteis emitidos pelas plantas de rúcula foram avaliados por uma análise exploratória, a análise dos componentes principais (ACP ou PCA – “*Principal Component Analysis*”) no pacote estatístico R (versão 2.15.3) ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

O PCA é um método de projeção de dados (ERIKSSON et al., 2001) que os correlaciona de acordo com a máxima variância. A variação dos dados originais é condensada em um número menor de dados, perdendo o mínimo possível de informação, denominados de componentes principais (OLIVEIRA, 2007). As áreas de pico de cada composto foram transformadas por  $\log_{10}$  para posteriormente analisa-las por PCA (TOOKER; DE MORAES, 2007). O PCA faz uma correlação entre as variáveis, o coeficiente de correlação ( $r$ ) varia entre 1 e -1, deste modo, quanto mais próximos forem desses valores forem os valores de  $r$  de cada variável maior é a correlação entre elas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Área foliar e biomassa seca de plantas de rúcula inoculadas e não inoculadas com *B. subtilis* (GB03)

Observou-se que as plantas de rúcula quando em simbiose com *B. subtilis* (GB03) apresentaram maior área foliar em relação às plantas que não foram inoculadas com a PGPR (Controle) (n=8; F= 12,603;  $P<0,006$ ; Figura 7).

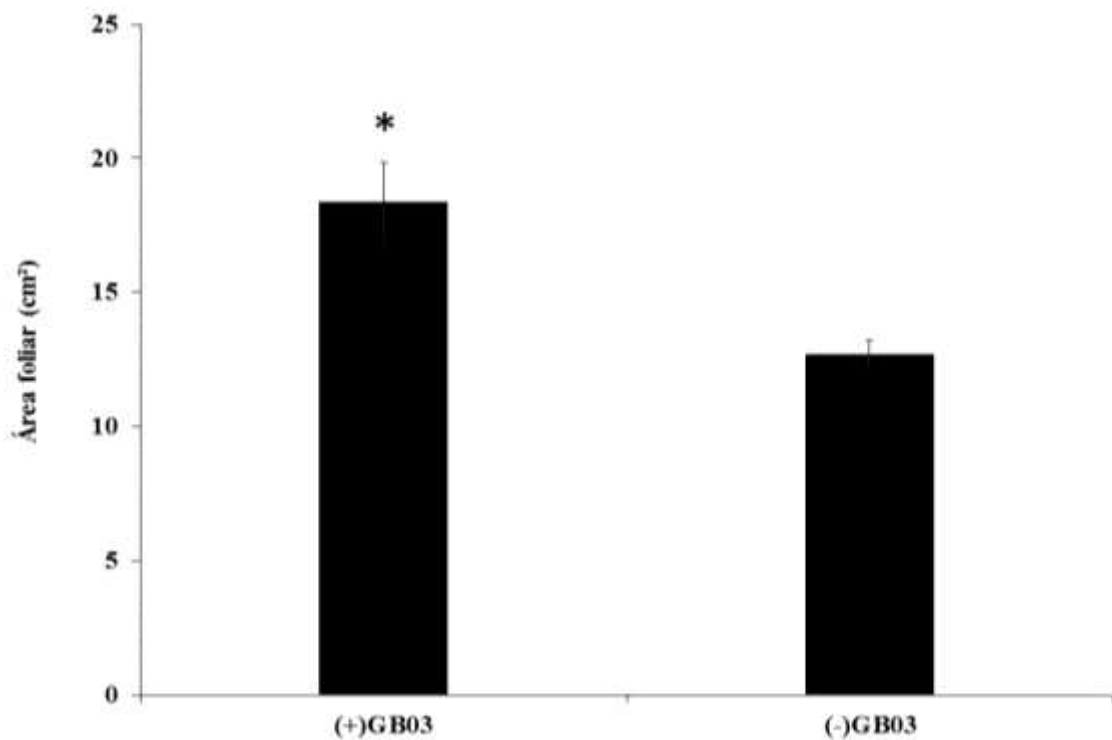


Figura 7 – Área foliar (cm<sup>2</sup>) de plantas de rúcula, aos quarenta dias após a semeadura, inoculadas e não inoculadas (Controle) com *B. subtilis* (GB03). (\*) Indica que os tratamentos diferem significativamente entre si pelo teste t não pareado ( $P<0,05$ )

Do mesmo modo, verificou-se que as plantas de rúcula quando inoculadas com *B. subtilis* (GB03) apresentaram maiores valores de peso seco da parte aérea (n=8; F=9,309;  $P<0,01$ ; Figura 8).

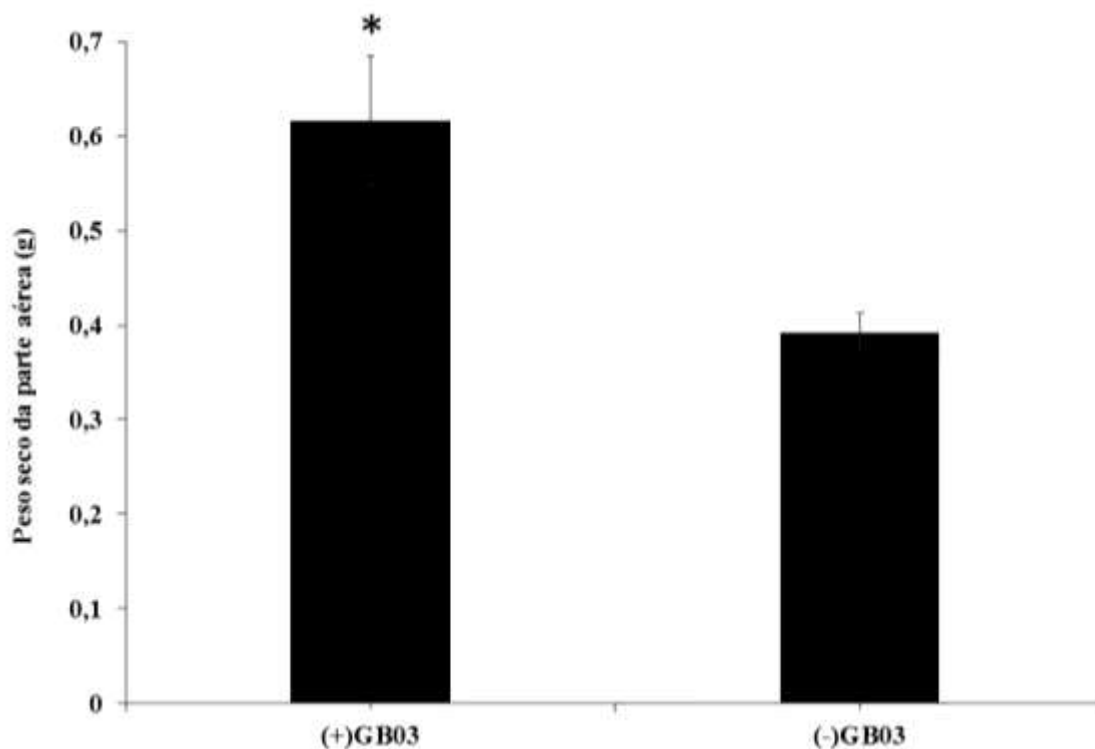


Figura 8 – Peso seco (g) da parte aérea de plantas de rúcula inoculadas e não inoculadas (Controle) com *B. subtilis* (GB03) aos quarenta dias após a sementeira. (\*) Indica que os tratamentos diferem entre si pelo teste t não pareado ( $P < 0,05$ )

#### 4.2 Ganho de peso de lagartas de *P. xylostella* e área foliar consumida de plantas de rúcula

Quanto ao peso das lagartas de terceiro instar de *P. xylostella* submetidas à alimentação em plantas de rúcula na presença e ausência de simbiose com *B. subtilis* (GB03) durante 24 horas, pode-se constatar que estas apresentaram ganho de peso similar em ambos tratamentos ( $n=12$ ;  $F=3,71$ ;  $P < 0,06$ ; Figura 9).

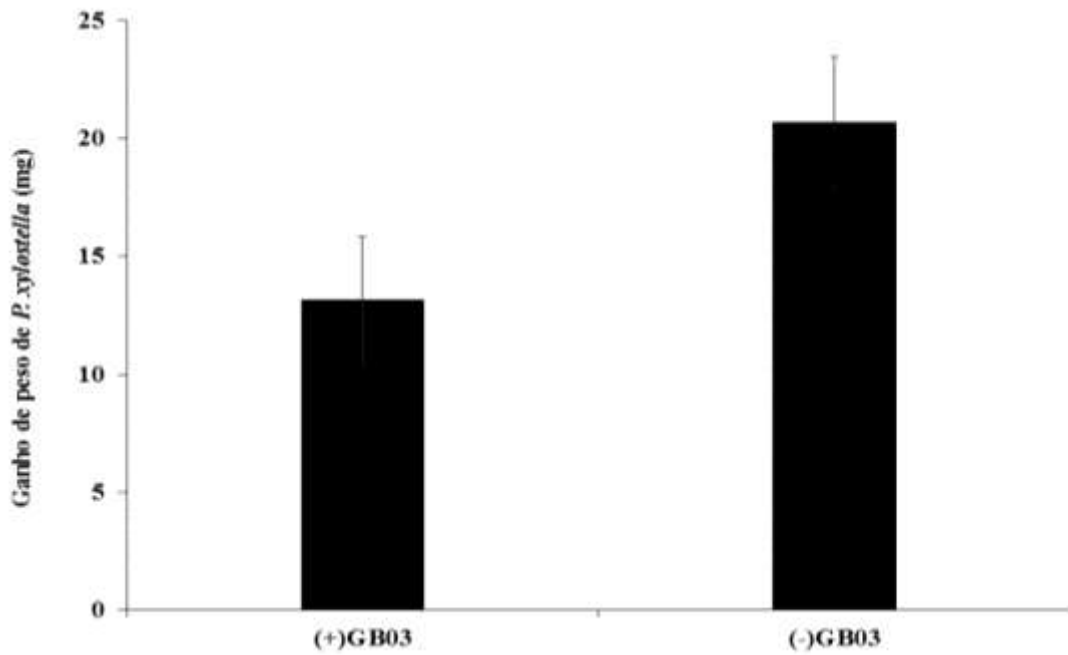


Figura 9 – Ganho de peso de lagartas de terceiro instar de *P. xylostella* submetidas à alimentação durante 24 horas em plantas de rúcula inoculadas e não inoculadas (Controle) com *B. subtilis* (GB03). Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t não pareado ( $P < 0,05$ )

Entretanto, observou-se que o consumo da área foliar pelas lagartas praticamente dobrou em plantas controle (não inoculadas) em relação às plantas inoculadas com a rizobactéria ( $n=12$ ;  $F=20,985$ ;  $P < 0,0001$ ; Figura 10).

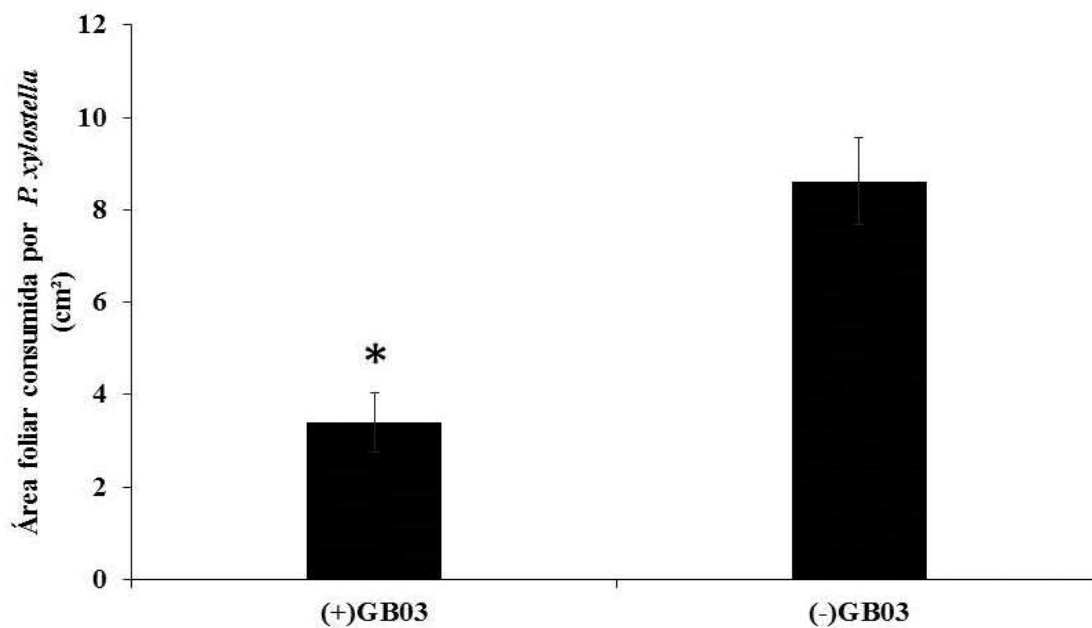


Figura 10 – Área foliar de plantas de rúcula inoculadas e não inoculadas (Controle) com *B. subtilis* (GB03) consumida em 24 horas por lagartas de *P. xylostella* de terceiro instar. (\*) Indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t não pareado ( $P < 0,05$ )

#### 4.3 Preferência de oviposição de *P. xylostella*

Ao testar-se o olfatômetro em “Y” notou-se que as fêmeas fecundadas de *P. xylostella* não foram capazes de distinguir entre os odores dos tratamentos avaliados, não sendo observada diferença na resposta olfativa do inseto ( $n=30$ ;  $\chi^2=1,49$ ;  $P < 0,715$ ; Figura 11).

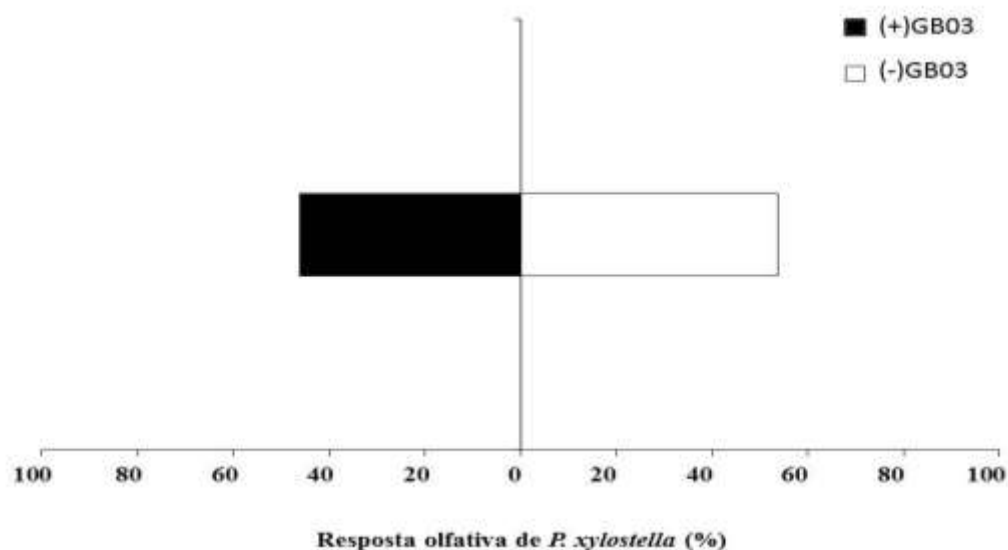


Figura 11 - Resposta olfativa de *P. xylostella* quando submetida a plantas de rúcula inoculadas e não inoculadas (Controle) com *B. subtilis* (GB03). Não houve diferença significativa pelo teste qui-quadrado ( $P < 0,05$ )

No entanto, ao avaliar-se a preferência de oviposição de *P. xylostella* em gaiolas de isopor, disponibilizando tanto pistas visuais quanto olfativas aos insetos, constatou-se maior número de ovos em plantas de rúcula não inoculadas com *B. subtilis* (GB03), tanto no período da noite (W=368,5; P<0,005; Figura 12) quanto durante o dia (W=589; P<0,04; Figura 12).

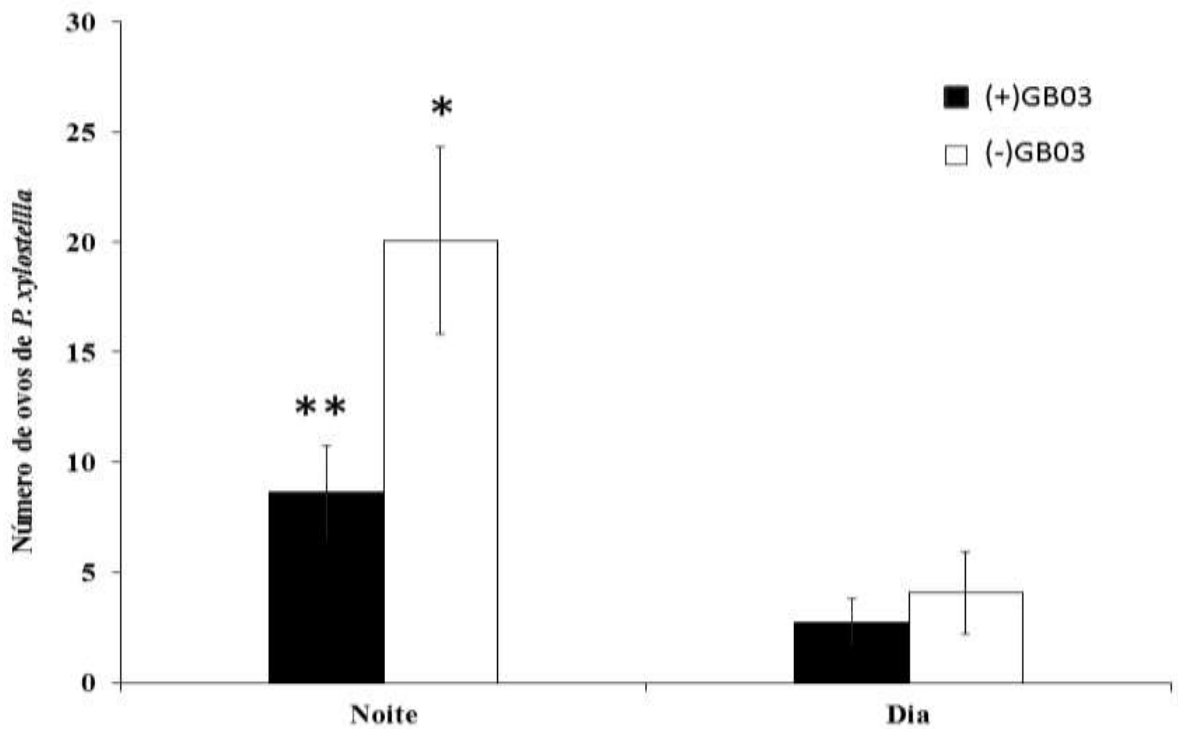


Figura 12 – Oviposição de *P. xylostella* em plantas de rúcula inoculadas e não inoculadas (Controle) com *B. subtilis* (GB03) nos períodos da noite e do dia. (\*) Indica que os tratamentos diferem significativamente entre si pelo teste não paramétrico de Wilcoxon ( $P < 0,05$ )

#### 4.4 Voláteis emitidos por plantas de rúcula

Ao analisar a quantidade total de compostos orgânicos voláteis (COV) emitidos pelas plantas de rúcula, pode-se perceber que todos os tratamentos emitiram quantidades semelhantes de voláteis. Deste modo não foi encontrada diferença entre os tratamentos avaliados pelo teste de Tukey (Figura 14).

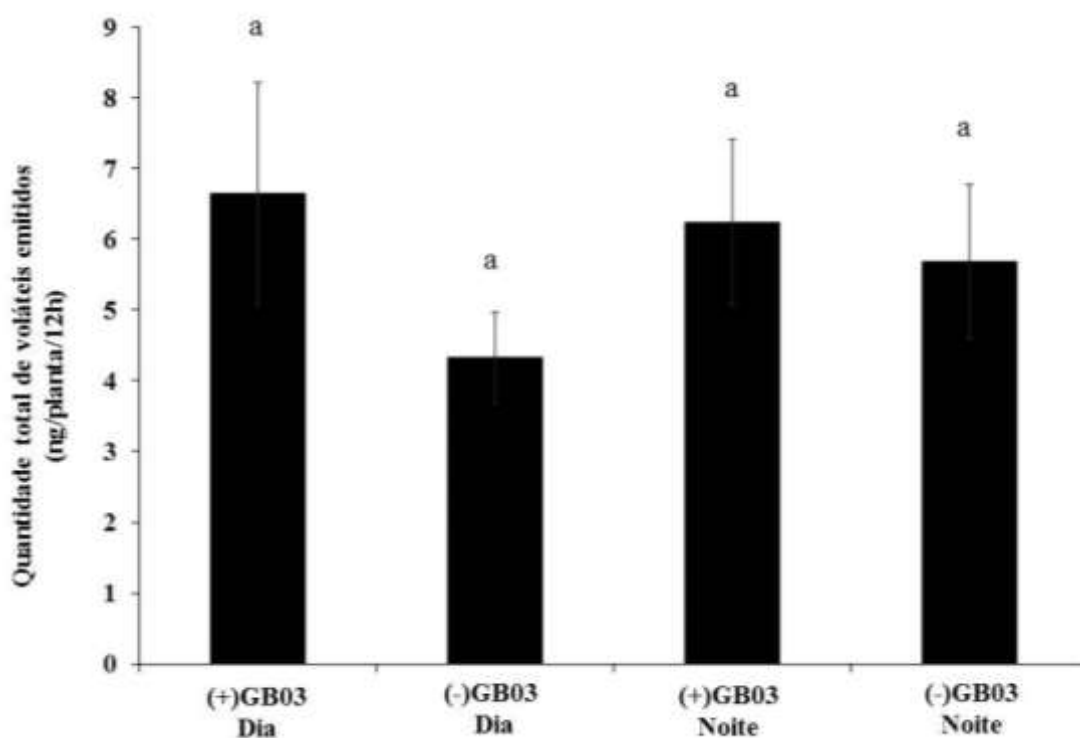


Figura 14 – Média relativa ( $\pm$  EP) do total de voláteis coletados durante o dia e noite de plantas de rúcula inoculadas e não inoculadas (Controle) com *B. subtilis* (GB03). Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ )

Por outro lado, observou-se diferenças no perfil de voláteis dos tratamentos analisados (Tabela 1). Foram identificados cinco compostos liberados pelas plantas de rúcula, inoculadas e não inoculadas com a rizobactéria GB03: (Z)-3-hexenol, 2-ethyl-1-decanol, limonene, 2-ethyl-1-hexanol e  $\alpha$ -farnesene e outros quatro compostos foram identificados como voláteis de planta por meio de comparação dos espectros, no entanto, ainda é necessária a confirmação exata dos nomes dos compostos. Plantas de rúcula inoculadas e não inoculadas com *B. subtilis* (GB03) liberaram o composto (Z)-3-hexenol somente durante o dia ( $n=8$ ;  $F=15,96$ ;  $P < 0,001$ ), e estas últimas não emitiram 2-ethyl-1-decanol durante a noite, diferentemente dos demais tratamentos ( $n=8$ ;  $F=11,28$ ;  $P < 0,01$ ). O composto não identificado 4, foi emitido em maiores concentrações nas plantas não inoculadas durante à noite, comparativamente ao dia, porém não apresentou diferença das plantas inoculadas em ambos os períodos ( $n=8$ ;  $F=8,27$ ;  $P < 0,04$ ).

Tabela 1 - Composição dos perfis de voláteis liberados no decorrer do dia e da noite, por plantas de rúcula inoculadas e não inoculadas com *B. subtilis* (GB03), classe dos compostos e Kovats (KI)

Composto	Classe	KI	(+)GB03	(-)GB03	(+)GB03	(-)GB03
			Dia	Dia	Noite	Noite
ng/planta/12h (Média ± EP)						
não indentificado 1			0,81 ± 0,175 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,09 ± 0,43 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,18 <sup>a</sup>
não indentificado 2			0,99 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,60 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,18 <sup>a</sup>
(Z)-3-hexenol	Álcool		0,23 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,19 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>
2-ethyl-1-decanol	Cetona	1009	2,16 ± 1,14 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,05 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>
Limonene	Sesquiterpeno	1022	0,26 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,08 <sup>a</sup>
2-ethyl-1-hexanol	Álcool	1046	0,61 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,34 <sup>a</sup>
não indentificado 3		1117	1,28 ± 0,55 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,36 <sup>a</sup>	1,99 ± 0,79 <sup>a</sup>	2,41 ± 0,71 <sup>a</sup>
não indentificado 4		1281	0,12 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,34 ± 0,12 <sup>a</sup>
α-farnesene	Sesquiterpeno	1491	0,15 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,08 <sup>a</sup>

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Kruskall Wallis ( $P < 0,05$ ).

#### 4.5 Análise dos componentes principais (PCA)

O resultado do PCA mostrou que os dois primeiros componentes, PC1 e PC2, representam 88,92% do total da variância, com 51,17 e 37,75%, respectivamente. O PC1 relacionou-se positivamente com todos os tratamentos, enquanto o PC2 agregou os tratamentos diurnos e os separou dos noturnos, de acordo com as suas similaridades. O “plot” das observações foi utilizado para definir qual dos compostos apresentaram maior contribuição para a separação dos tratamentos. Os compostos (Z)-3-hexenol e 2-ethyl-1-decanol, foram os principais responsáveis pela agregação dos tratamentos diurnos, já o composto não indentificado 4 foi o responsável pela agregação das variáveis noturnas. Os demais compostos, estão localizados próximos à zero, indicando que exerceram baixa influência na separação dos tratamentos (Figura 15).



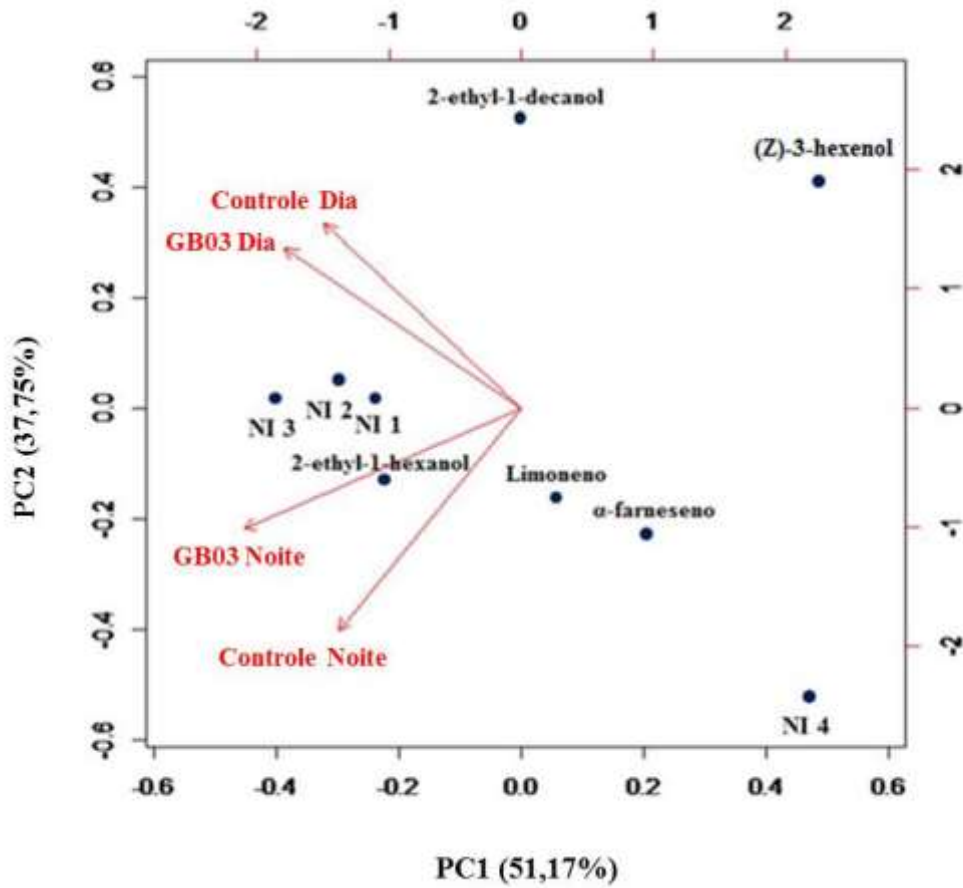


Figura 15 – Análise dos componentes principais (PCA), PC1 com 51,17% e PC2 com 37,75%, dos tratamentos com plantas de rúcula: inoculada com *B. subtilis* (GB03) Dia; não inoculada Dia (Controle Dia); inoculada com *B. subtilis* (GB03) Noite; e não inoculada Noite (Controle Noite); bem como dos compostos 2-ethyl-1-decanol, (Z)-3-hexenol, 2-ethyl-1-hexanol, limoneno,  $\alpha$ -farneseno e não identificados (NI) ( $P < 0,05$ )

## 5 DISCUSSÃO

As PGPR são microrganismos que ocorrem naturalmente na região da rizosfera, estando direta ou indiretamente envolvidas na promoção de crescimento das plantas. Além disso, estimulam o desenvolvimento das plantas, aumentando sua produtividade, peso, número de sementes germinadas e resistência contra estresses bióticos e abióticos. Algumas rizobactérias como cepas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, e *Enterobacter cloacae*, são capazes de promover o crescimento de plantas por meio da liberação de voláteis (RYU et al., 2003).

No presente estudo, constatou-se que plantas de rúcula inoculadas com *B. subtilis* (GB03) apresentaram maior área foliar (Figura 7) e maior biomassa seca (Figura 8) comparadas as plantas que não foram tratadas com a rizobactéria. A promoção de crescimento e aumento do peso fresco também foi observada em experimentos “*in vitro*” com plantas de rúcula em contato com voláteis de *B. subtilis* (GB03) (CHOU, 2013). Do mesmo modo, estudos anteriores com *Arabidopsis thaliana* demonstraram que as plantas quando em interação com *B. subtilis* (GB03) apresentaram melhor crescimento e aumento da eficiência fotossintética (RYU et al., 2003; ZHANG et al., 2008).

A utilização de PGPR possui grande importância para os ecossistemas agrícolas, pois diminui a utilização de defensivos agrícolas, e seus danos sobre o ambiente (WEYENS et al., 2009; YANG; KLOPPER; RYU, 2009). Microrganismos benéficos podem auxiliar as plantas contra patógenos e insetos herbívoros. Os efeitos desses microrganismos sobre a herbivoria de insetos podem apresentar elevada variação (PINEDA et al, 2013), uma vez que as plantas atuam como mediadoras de interações multitróficas em organismos benéficos e prejudiciais a elas (DICKE; VAN LOON; SOLER, 2009; KAPLAN; DENNO, 2007; PIETERSE; DICKE, 2007; SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005) Deste modo, as plantas podem atuar de maneira bidirecional entre membros de comunidades abaixo e acima do solo, como PGPR e insetos herbívoros (BEZEMER; VAN DAM, 2005; ERB et al., 2009; VAN DER PUTTEN et al., 2001) .

A promoção de crescimento de plantas por PGPR tem sido considerado o principal mecanismo subjacente às interações entre microrganismos, plantas e insetos e mais recentemente tem sido explorado o papel da ISR em tais interações (BEZEMER; VAN DAM, 2005; VALENZUELA-SOTO et al., 2010; VANNETTE; HUNTER, 2009; VAN OOSTEN et al., 2008). Acredita-se que a influência das interações em microrganismo, plantas e insetos podem variar de acordo com o grau de especialização do inseto. Insetos generalistas

normalmente são mais afetados por metabólitos tóxicos de certas espécies de plantas que insetos especialistas, que muitas vezes podem usar tais compostos para localizar a plantas hospedeira (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005).

No entanto, a ideia que os insetos especialistas são imunes às defesas da planta hospedeira é muito difundida, porém errônea. Há diversos estudos que mostram os impactos negativos das defesas da planta hospedeira sobre insetos especialistas (ADLER; SCHMITT; BOWERS, 1995; AGRAWAL; KURASHIGE, 2003; BERENBAUM; ZANGERL; LEE, 1989; CORNELL; HAWKINS, 2003; ZALUCKI; BROWER; ALONSO-M, 2001). Ao mesmo tempo que outro estudo com *A. thaliana* mostra que o especialista *Pieris rapae* não foi afetado pela interação entre *Pseudomonas fluorescens* e planta, enquanto que o generalista *Spodoptera exigua* foi afetado negativamente (VAN OOSTEN et al., 2008).

Neste estudo constatou-se que lagartas de *P. xylostella* não foram afetadas por antibiose, ou seja, em ambos os tratamentos testados, com e sem a inoculação de *B. subtilis* (GB03), não houve diferença no ganho de peso das lagartas (Figura 9). Por outro lado, observou-se efeitos do tipo antixenose, onde as lagartas alimentaram-se mais de plantas de rúcula não inoculadas com *B. subtilis* (GB03), apresentando uma área consumida significativamente maior do que plantas de rúcula inoculadas com a rizobactéria (Figura 10). Da mesma forma, estudos realizados com duas espécies de Lepidoptera especialistas *P. rapae*, *P. xylostella*. e uma generalista *Mamestra brassicae*, em cultivares de *Brassica oleracea*, constataram que *P. xylostella* e *M. brassicae* apresentaram desempenho similar em todas as cultivares testadas (POELMAN et al., 2008).

Quanto à preferência de oviposição de *P. xylostella* foi possível verificar que as fêmeas não apresentaram distinção entre os odores de plantas de rúcula inoculadas e não inoculadas com *B. subtilis* (GB03) (Figura 11). Entretanto, quando colocadas em arenas em contato com as plantas observou-se maior oviposição em plantas não inoculadas com a rizobactéria, tanto no período do dia quanto durante a noite (Figura 12). Do mesmo modo, observou-se maior número de ovos no período da noite em relação ao dia (Figura 13).

Sabe-se que adultos da traça-das-crucíferas possuem hábito noturno e as fêmeas normalmente começam a atividade de oviposição no final da tarde e continuam no decorrer da noite, sendo contatado o pico de oviposição entre às 19:00 e 20:00 horas (PIVNICK et al., 1990). A ausência de luz durante o dia pode servir de estímulo para oviposição, no entanto, quando expostas à luz durante a noite a oviposição não é completamente inibida (TABASHNIK, 1985). Além da luminosidade, outros fatores podem influenciar na oviposição do inseto, como a emissão de voláteis de plantas, temperatura, tricomas, textura e

coloração das plantas (PIVNICK et al., 1990; TABASHNIK, 1985). Tais fatores podem explicar os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que a presença da rizobactéria pode alterar a composição do perfil de voláteis da planta e suas características fisiológicas e morfológicas.

Entre os tratamentos avaliados não foi observada diferença significativa entre a quantidade total de voláteis emitidos (Figura 14), todavia observou-se diferença qualitativa entre os compostos. O composto (Z)-3-hexenol foi emitido somente nos tratamentos diurnos e concentrações de 2-ethyl-1-decanol não foram observadas no tratamento controle no período da noite (Tabela 1). Esses dois compostos foram os responsáveis por agrupar os tratamentos controle e inoculado com *B. subtilis* (GB03) do dia e separá-los dos tratamentos noturnos que foram agrupados principalmente devido ao composto não identificado 4, na análise de componentes principais (PCA). Os demais compostos encontrados nos tratamentos, 2-ethyl-1-hexanol, limoneno,  $\alpha$ -farneseno e os compostos não identificados 1, 2 e 3 não apresentaram diferença significativa na concentração emitida em cada tratamento e não apresentaram grande influência do gráfico do PCA, devido ao fato de encontrarem-se próximos à zero.

O composto (Z)-3-hexenol pode afetar diretamente a fisiologia e comportamento dos insetos herbívoros, tanto positivamente quanto negativamente. Alguns estudos com eletroantenografia (EAG) já demonstraram que os insetos apresentam diferentes respostas ao composto em questão (BRUCE; WADHAMS; WOODCOCK, 2005). Deste modo, acredita-se que o composto (Z)-3-hexenol pode influenciar no comportamento de oviposição de *P. xylostella*, uma vez que não foi observado concentrações desse composto durante a noite, sendo assim sua presença no perfil de voláteis pode agir negativamente no comportamento de oviposição do inseto. Contudo, testes com o composto em eletroantenografia ainda devem ser realizados para comprovar tal hipótese. Quanto ao composto 2-ethyl-1-decanol, sugere-se que a emissão desse composto pode ser influenciada pela presença de *B. subtilis* (GB03), uma vez que sua emissão já foi detectada por cromatografia gasosa no perfil de voláteis de outros microrganismos como o fungo *Trichoderma harzianum* FA1132 (SIDDIQUEE et al., 2012).

O limoneno encontrado em concentrações similares em todas os tratamentos analisados, é um metabólito secundário emitido pelas plantas e possui efeito inseticida já comprovado, podendo ser utilizado no controle de pragas na agricultura orgânica. A concentração interna de limoneno nas plantas pode acarretar efeitos significativos no comportamento e consumo alimentar de insetos herbívoros (IBRAHIM; KAINULAINEN; AFLATUNI, 2008). O  $\alpha$ -farneseno é um hidrocarboneto poliinsaturado que está presente em diversas espécies de plantas, alguns trabalhos realizados utilizando esse composto observaram

alterações no comportamento e atratividade de insetos (HERN; DORN, 1999; SUTHERLAND; HUTCHINS, 1972), deste modo, pode-se utilizá-lo em estudos posteriores para verificação dos seus efeitos isoladamente sobre *P. xylostella*. Constatou-se ainda a emissão do composto 2-ethyl-1-hexanol em todas os tratamentos analisados de forma similar. Em estudos realizados com plantas de trigo também foi demonstrado que tais plantas emitiram 2-ethyl-1-hexanol em altas concentrações durante o seu período vegetativo, sendo observada uma queda na emissão dos níveis do composto durante a floração e enchimento de grãos (BATTEN; STTUTE; WHELLER, 1995). Esses fatos sugerem que 2-ethyl-1-hexanol é um composto ligado ao desenvolvimento vegetativo das plantas, desempenhando papel importante no período de crescimento.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostrou que a inoculação de plantas de rúcula com *B. subtilis* (GB03) promoveu melhor desenvolvimento nas plantas, proporcionando maior área foliar e maior peso seco de plantas em relação às plantas não inoculadas. A presença da rizobactéria também proporcionou defesas do tipo antixenose contra o ataque de *P. xylostella*, o que fez com que o inseto se alimentasse menos de plantas inoculadas com *B. subtilis* (GB03) em relação às não inoculadas, no entanto, defesas do tipo antibiose não foram observadas, não diferindo no peso dos grupos de lagartas submetidos a ambos tratamentos. Notou-se que a simbiose da planta com a PGPR teve influência sobre o comportamento de oviposição do inseto ao serem submetidos a pistas visuais e olfativas. No entanto, ao serem submetidas apenas a pistas olfativas no olfatômetro em “Y”, as fêmeas adultas de *P. xylostella* não distinguiram entre os odores dos tratamentos. Não foi observada diferença significativa entre a quantidade total de voláteis emitidos pelos tratamentos, entretanto, o perfil de voláteis variou qualitativamente, onde três compostos apresentaram diferença significativa na sua concentração nos diferentes tratamentos testados: (Z)-3-hexanol, 2-ethyl-1-decanol e composto não identificado 4. A identificação de todos os compostos ainda deve ser realizada, assim como testes individuais em eletroantenografia com os compostos encontrados para comprovar a influência exercida sobre o comportamento do inseto.



## REFERÊNCIAS

- ADLER, L.S.; SCHMITT, J.; BOWERS, M. Genetic variation in defensive chemistry in *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) and its effect on the specialist herbivore *Junonia coenia* (Nymphalidae). **Oecologia**, Providence, v. 101, n. 1, p. 75-85, 1995.
- AGRAWAL, A.A.; KURASHIGE, N.S. A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. **Journal of Chemical Ecology**, Toronto, v. 29, p. 1403–1415, 2003.
- ANKERSMIT, G.W. DDT resistance in *Plutella maculipennis* (Curt.) (Lepidoptera) in Java. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 44, n. 3, p. 421–425, 1953.
- BACKMAN, P.A.; BRANNEN, P.M.; MAHAFEE, W.F. Plant response and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria**. Adelaide, p. 3-8, 1994.
- BATTEN, J.H.; STUTTE, G.W.; WHEELER, R.M. Effect of crop development on biogenic emissions from plant populations grown in closed plant growth chambers. **Phytochemistry**, Kennedy, v. 39, n. 6, p. 1351-1357, 1995.
- BERENBAUM, M.R.; ZANGERL, A.R.; LEE, K. Chemical barriers to adaptation by a specialist herbivore. **Oecologia**, Goodwin, v. 80, n. 4, p. 501-506, 1989.
- BEZEMER, T.M.; VAN DAM, N.M. Linking above-ground and below ground interactions via induced plant defenses. **Trends in Ecology Evolution**, Amsterdam, v. 20, p. 617–624, 2005.
- BONDAR, G. Aleyrodídeos do Brasil: 2ª contribuição. **Boletim do Laboratório de Patologia**, Salvador, v. 5, n. 2, p. 1-37, 1928.
- BRUCE, T.J.A.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M. Insect host location: a volatile situation. **Trends Plant Science**, Harpenden, v. 10, p. 269–274, 2005.
- CAPINERA, J.L. **Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Insecta: Lepidoptera: Plutellidae)**. University of Florida, 2015. Disponível em: <<https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN27600.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2015.
- CARTEA, M.E.; LEMA, M.; FRANCISCO, M.; VELASCO, P.M. Basic information on vegetable *Brassica* crops. In: SADOWSKI, J.; KOLE, C. (Ed.). **Genetics, genomics and breeding of vegetable brassicas**. Enfield: Science Publ., 2011. p. 1-33.
- CASTELO BRANCO, M. Avaliação da eficiência de formulação de *Bacillus thuringiensis* para o controle de traça-das-crucíferas em repolho no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 237-240, 1999.
- CASTELO BRANCO, M.; GATEHOUSE, A. Survey of insecticide susceptibility in *Plutella xylostella* (L) (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brasil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 327-332, 2001.



CASTELO BRANCO, M.; MEDEIROS, M.A. Impacto de inseticidas sobre parasitoides da traça-das-crucíferas em repolho no Distrito Federal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 7-13, 2001.

CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F.H.; VILLAS BOAS, G.L. Traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* – Artrópodes de importância econômica. **Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças**, Brasília, n. 4, p.1-3, 1997.

CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F.H.; MEDEIROS, M.A.; LEAL, J.G.T. Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 60-63, 2001.

CHAPMAN, J.W.; REYNOLDS, D.R.; SMITH, A.D.; RILEY, J.R.; PEDGLEY, D.E.; WOIWOD, I.P. High altitude migration of the diamondback moth *Plutella xylostella* to the UK: a study using radar, aerial netting, and ground trapping. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 27, p. 641-650, 2002.

CHOI, S.K.; JEONG, H.; KLOEPPER, J.W.; RYU, C.M. Genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* GB03, an active ingredient of the first commercial biological control product. **Genome announcements**, Daejeon, v. 2, e01092-14, 2014.

CHOU, M.Y. **Soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) augments plant growth and volatile emissions in *Eruca sativa* (Arugula)**. 2013. 43 p. Thesis (Master in Chemistry) -Texas Tech University, Lubbock, 2013.

CORNELL, H.; HAWKINS, B. Herbivore responses to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory. **American Naturalist**, Newark, v. 161, p. 507–522, 2003.

CZEPAK, C; FERNANDES, P.M.; SANTANA, H.G.; TAKATSUKA, F.S.; ROCHA, C.L. Eficiência de inseticidas para o controle de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) na cultura do repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 2, p. 129-131, 2005.

DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V.R.; JANDER, G.; DICKE, M.; PIETERSE, C.M. Plants under attack: multiple interactions with insects and microbes. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 2, p. 527–529, 2007.

DIAS, D.G.S.; SOARES, C.M.S.; MONNERAT, R.G. Avaliação de larvicidas de origem microbiana no controle da traça-das- crucíferas em couve-flor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 553-556, 2004.

DICKE, M.; VAN LOON, J.J.A.; SOLER, R. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, p. 317–324, 2009.

DICKSON, M.H.; SHELTON, A.M.; EIGENBRODE, S.D.; VAMOSY, M.L.; MORA, M. Selection for resistance to diamondback moth (*Plutella xylostella*) in cabbage. **Hortscience**, Alexandria, v. 25, n. 12, p. 1643-1646, 1990.

DIXON, G.R. **Vegetable brassicas and related crucifers**. Oxfordshire: CABI Publ., 2007. 327 p.

EIGENBRODE, S.D.; SHELTON, A.M.; DICKSON, M.H. Two types of resistance to the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in cabbage. **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, n. 4, p. 1086-1090, 1990.

ERB, M.; LENK, C.; DEGENHARDT, J.; TURLINGS, T.C. The underestimated role of roots in defense against leaf attackers. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 14, p. 653–659, 2009.

ERIKSSON, L.; JOHANSSON, E.; KETTANEH-WOLD, N.; WOLD, S. **Multi-and megavariate data analysis: principles and applications**. Umea: Umetrics Academy, 2001. 426 p.

FARAG, M.A.; RYU, C.M.; SUMNER, L.W.; PARÉ, P.W. GC–MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. **Phytochemistry**, Lubbock, v. 67, n. 20, p. 2262-2268, 2006.

FERRÉ, J.; REAL, M.D.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 5119–5123, 1991.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. 412 p.

\_\_\_\_\_. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. 421 p.

FRANÇA, F.H.; CORDEIRO, C.M.T.; GIORDANO, L.B.; RESENDE, A.M. Controle da traça das crucíferas em repolho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 3, p. 47-53, 1985.

FRANSZ, P.; ARMSTRONG, S.; ALONSO-BLANCO, C.; FISCHER, T. C.; TORRES-RUIZ, R. A.; JONES, G. Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.13, n.6, p.867-876. 1998.

FREITAS, M.A.; MEDEIROS, F.H.; CARVALHO, S.P.; GUILHERME, L.R.; TEIXEIRA, W.D.; ZHANG, H.; PARÉ, P.W. Augmenting iron accumulation in cassava by the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GBO3). **Frontiers in Plant Science**, Lavras, v. 6, p. 1-7, 2015.

GEORGHIOU, G.; LAGUNES-TEJADA, A. **The occurrence of resistance to pesticides in arthropods: an index of cases reported through 1989**. Rome: FAO, 1991. 318 p.

GUIMARÃES, J.A.; MICHEREFF FILHO, M.; SETTI DE LIZ, R. **Manejo de pragas em campos de produção de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2011. 21 p.

HERN, A.; DORN, S. Sexual dimorphism in the olfactory orientation of adult *Cydia pomonella* in response to  $\alpha$ -farnesene. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Zürich, v. 92, n. 1, p. 63-72, 1999.

HONG, C.P.; KWON, S.J.; KIM, J.S.; YANG, T.J.; PARK, B.S.; LIM, Y.P. Progress in understanding and sequencing the genome of *Brassica rapa*. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 2008, p. 1-9, 2008.

HOWE, G.A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 41–66, 2008.

IBRAHIM, M.A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural and Food Science**, Kuopio, v. 10, n. 3, p. 243-259, 2008.

IMENES, S.D.L.; CAMPOS, T.B. de; RODRIGUES NETTO, S.M.; BERGMANN, E.C. Avaliação da atratividade de feromônio sexual sintético da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), em cultivo orgânico de repolho. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 81-84, 2002.

JAVIER, E. Q. Foward. In: TALEKAR, N. S.; SALINAS P. J.; AGAMALIAN, H. S. **Diamondback moth and other crucifer pests; proceedings**. Asian Vegetable Research and Development Center, Taipei, Taiwan, v. 9, n.3, p.271-282, 1992.

KAPLAN, I.; DENNO, R.F. Interspecific interactions in phytophagous insects revisited: a quantitative assessment of competition theory. **Ecology Letters**, College Park, v. 10, p. 977–994, 2007.

KEHR, J.; BUHTZ, A. *Brassica* proteomics and metabolomics. In: EDWARDS, D.; BATLEY, J.; PARKIN, I.; KOLE, C. (Ed.). **Genetics, genomics and breeding of oilseed brassicas**. Enfield: Science Publ., 2011. p. 174-193.

KIRSCH, K.; SCHMUTLERER, H. Low efficacy of a *Bacillus thuringiensis* (Berl.) formulation in controlling the diamondback moth *Plutella xylostella* (L.), in the Philippines. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 105, n. 1/5, p. 249-255, 1988.

KLOPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, London, v. 286, n. 5776, p. 885-886, 1980.

KOCH, M.; HAUBOLD, B.; MITCHELL-OLDS, T. Molecular systematics of the Brassicaceae: evidence from coding plastidic *matK* and nuclear *Chs* sequences. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, n. 3, p. 534-544, 2001.

MEDEIROS, R. S.; RAMALHO, F. S.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Temperature influence on the reproduction of *Podisus nigrispinus*, a predator of the noctuid larva *Alabama argillacea*. **BioControl**, Dordrecht, v.48, n.6, p.695-704. 2003.

MEINKE, D. W.; CHERRY, J. M.; DEAN, C.; ROUNSLEY, S. D.; KOORNNEEF, M. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. **Science**, v.282, n.5389, p.662-682, 1998.

METCALF, R.L. Changing role of insecticides in crop protection. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 25, p. 219-256, 1981.

MEYEROWITZ, E. M.; SOMERVILLE, C. R. *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, 1300 p.

MONNERAT, R.G.; BORDAT, D.; CASTELO BRANCO, M.; FRANCA, F.H. Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner e inseticidas químicos sobre a traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) e seus parasitoides. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Londrina**, v. 29, n. 4, p. 723-730, 2000.

MORATÓ, M.G. Plagas y enfermedad del cultivo de coliflor: descripción e control. **Vida Rural**, Aguadulce, v. 8, p. 1-5, 2000.

MORISHITA, M.; AZUMA, K.; YANO, S. Changes in insecticide susceptibility of the diamondback moth in Wakayama. **JARQ-Japan Agricultural Research Quarterly**, Tokyo, v. 26, p. 139–143, 1992.

MOURA, K.K.C.F.; BEZERRA NETO, F.; PONTES, F.S.T.; LIMA, J.S.S. de; MOURA, K.H.S. Avaliação econômica de rúcula sob diferentes espaçamentos de plantio. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, p. 113-118, 2008.

OLIVEIRA, R.C.S. **Deteção de adulteração de café torrado e moído com cevada pelo perfil cromatográfico de voláteis**. 2007. 196 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, Liege, v. 9, p. 1084–1090, 2007.

PANGESTI, N.; PINEDA, A.; PIETERSE, C.M.; DICKE, M.; VAN LOON, J.J. Two-way plant-mediated interactions between root-associated microbes and insects: from ecology to mechanisms. **Plant Science**, Chicago, v. 4, p. 1-11, 2013.

PIETERSE, C.M.J.; DICKE, M. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. **Trends Plant Sci**. Utrecht, v. 12, p. 564–569, 2007.

PINEDA, A.; DICKE, M.; PIETERSE, C.M.J.; POZO, M.J. Beneficial microbes in a changing environment: are they always helping plants to deal with insects? **Functional Ecology**, Wageningen, v. 27, p. 574-586, 2013.

PINEDA, A.; ZHENG, S.J.; VAN LOON, J.J.; PIETERSE, C.M.; DICKE, M. Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 15, p. 507–514, 2010.

PINEDA, A.; SOLER, R.; WELDEGERGIS, B.T.; SHIMWELA, M.M.; VAN LOON, J.J.; DICKE, M. Non-pathogenic rhizobacteria interfere with the attraction of parasitoids to aphid-induced plant volatiles via jasmonic acid signaling. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 36, p. 393–404, 2012.

PIVNICK, K.A.; JARVIS, B.J.; GILLOTT, C.; SLATER, G.P.; UNDERHILL, E.W. Daily patterns of reproductive activity and the influence of adult density and exposure to host plants on reproduction in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Environmental Entomology**, Saskatoon, v. 19, n. 3, p. 587-593, 1990.

POELKING, A. Diamondback moth in the Philippines, and its control with *Diadegma semiclausum*. In: TALEKAR, N.S. (Ed.). **Diamondback Moth and other crucifer pests. Proceeding of the second International workshop**. Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center, 1992. p. 271-278.

POELMAN, E.H.; BROEKGAARDEN, C.; VAN LOON, J.J.A.; DICKE, M. Early season herbivore differentially affects plant defense responses to subsequently colonizing herbivores and their abundance in the field. **Molecular Ecology**, Wageningen, v. 17, p. 3352–3365, 2008.

RYU, C.M.; FARAG, M.A.; PARÉ, P.W.; KLOEPPER, J.W. Invisible signals from the underground: bacterial volatiles elicit plant growth promotion and induce systemic resistance. **Plant Pathology Journal**, Lubbock, v. 21, p. 7-12, 2005.

RYU, C.M.; FARAG, M.A.; HU, C.H.; REDDY, M.S.; KLOEPPER, J.W.; PARÉ, P.W. Bacterial volatiles trigger induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Lubbock, v. 134, p. 1017-1026, 2004.

RYU, C.M., FARAG, M.A., HU, C.H., REDDY, M.S., WEI, H.X., PARÉ, P.W., KLOEPPER, J.W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Lubbock, v. 100, n. 8, p. 4927-4932, 2003.

SANTOS, F.; PEÑAFLORES, P.W.; SANCHES, P.A.; KAMIYA, A.C.; TONELLI, M.; NARDI, C.; BENTO, J.M. A Novel interaction between plant-beneficial Rhizobacteria and roots: colonization induces corn resistance against the root herbivore *Diabrotica speciosa*. **PLOS one**, San Francisco, v. 9, p. 1-6, 2014.

SAYYED, A.H.; OMAR, D.; WRIGHT, D.J. Genetics of spinosad resistance in a multi-resistant field-selected population of *Plutella xylostella*. **Pest Management Science**, Ascot, v. 60, n. 8, p. 827-832, 2004.

SCHOONHOVEN, L.M.; VAN LOON, J.J.A.; DICKE, M. **Insect-plant biology**. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Oxford University Press, 2005, 424p.

SHELTON, A.M.; NAULT, B.A. Dead-end trap cropping: a technique to improve management of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Crop Protection**, Guildford, v. 23, n. 6, p. 497-503, 2004.

SHELTON, A.M.; ROBERTSON, J.L.; TANG, J.D.; PÉREZ, C.; EIGENBRODE, S.D.; PREISLER, H.K.; WILSEY, W.T.; COOLEY, R.J. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae) to *Bacillus Thuringiensis* subspecies in the field. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 86, p. 697–705, 1993.

SIDDIQUEE, S.; CHEONG, B.E.; TASLIMA, K.; KAUSAR, H.; HASAN, M.M. Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. **Journal of Chromatographic Science**, Kota Kinabalu, v. 50, n. 4, p. 358-367, 2012.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Fribourg, v. 35, p. 235-270, 1997.

SUTHERLAND, O.R.W.; HUTCHINS, R.F.N.  $\alpha$ -Farnesene, a natural attractant for codling moth larvae. **Nature**, London, v. 239, p. 170, 1972.

TABASHNIK, B.E. Deterrence of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) oviposition by plant compounds. **Environmental Entomology**, Honolulu, v. 14, n. 5, p. 575-578, 1985.

TABASHNIK, B.E.; CUSHING, N.L.; FINSON, N.; JOHNSON, M.W. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 8, p. 1671-1676, 1990.

TALEKAR, N.S.; SHELTON, A.M. Biology, ecology and management of the diamondback moth. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 38, p. 275-301, 1993.

THULER, R.T. *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae): táticas para o manejo integrado em brássicas. 2006. 79 p. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2006.

\_\_\_\_\_. Criação de *Plutella xylostella*. In: DE BORTOLI, S. A. (Ed.). **Criação de insetos: da base à biofábrica**. Jaboticabal: O Autor, 2009, p. 58-68.

TRANI, P.E.; PASSOS, F.A. Rúcula (pinchão). In: FAHL, J.I.; CAMARGO, M.B.P.; PIZINATTO, M.A.; BETTI, J.A.; MELO, A.M.T.; DE MARIA, I.C.; FURLANI, A.M.C. (Ed.) **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. Campinas: IAC, 1998. p. 241-242. (IAC. Boletim, 200).

TOOKER, J.F.; DE MORAES, C.M. Feeding by Hessian fly *Mayetiola destructor* (Say) larvae does not induce plant indirect defenses. **Ecological Entomology**, Malden, v. 32, p. 153-161, 2007.

TORRES, J.B.; ZANUNCIO, J.C. Effects of sequential mating by males on reproductive output of the stinkbug predator, *Podisus nigrispinus*. **BioControl**, Helsinki, v. 46, n. 4, p. 469-480, 2001.

TURLINGS, T.C.J.; LENGWILER, U.B.; BERNASCINI, M.L.; WECHSLER, D. Timing of induced volatiles emissions in maize seedlings. **Planta**, Berlin, v. 207, p. 146-152, 1998.

TURNER, J.T.; BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, Auburn, v. 75, p. 347-353, 1991.

ULMER, B.; GILLOTT, C.; WOODS, D.; ERLANDSON, M. Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), feeding and oviposition preferences on glossy and waxy *Brassica rapa* (L.) lines. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, p. 327-331, 2002.

VACARI, A.M. **Caracterização biológico-comportamental de *Podisus nigrispinus* (DALLAS, 1851) predando *Plutella xylostella* (L., 1758)**. 2009. 102 p. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

VALENZUELA-SOTO, J.H.; ESTRADA-HERNÁNDEZ, M.G.; IBARRA-LACLETTE, E; DÉLANO-FRIER, J.P. Inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with growth-promoting *Bacillus subtilis* retards whitefly *Bemisia tabaci* development. **Planta**, Berlin, v. 231, p. 397-410, 2010.

VAN DER PUTTEN, W.H.; VET, L.E.M.; HARVEY, J.A.; WACKERS, F.L. Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 16, p. 547-554, 2001.

VANNETTE, R.L.; HUNTER, M.D. Mycorrhizal fungi as mediators of defense against insect pests in agricultural systems. **Agricultural and Forest Entomology**, Oxford, v. 11, p. 351-358, 2009.

VAN OOSTEN, V.R.; BODENHAUSEN, N.; REYMOND, P.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C.; DICKE, M.; PIETERSE, C.M. Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 21, p. 919-930, 2008.

VASQUEZ, B.L. Resistance to most insecticides. In: WALKER, T.J. (Ed.). **University of Florida of insect records**. Gainesville: University of Florida, Department of Entomology and Nematology, 1995. chap. 15, p. 34-36.

WEI, G.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Alabama, v. 81, p. 1508-1512, 1991.

WEYENS, N.; VAN DER LELIE, D.; TAGHAVI, S.; NEWMAN, L.; VANGRONSVELD, J. , Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. **Trends Biotechnology**, Diepenbeek, v. 27, p. 591-598, 2009.

YANG, J.; KLOEPPER, J.W.; RYU, C.M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends Plant Science**, Daejeon, v. 14, p. 1-4, 2009.

ZALUCKI, M.P.; BROWER, L.P.; ALONSO-M, A. Detrimental effects of latex and cardiac glycosides on survival and growth of first-instar monarch butterfly larvae *Danaus plexippus* feeding on the sandhill milkweed *Asclepias humistrata*. **Ecological Entomology**, Baltimore, v. 26, n. 2, p. 212-224, 2001.

ZALUCKI, M. P.; SHABBIR, A.; SILVA, R.; ADAMSON, D.; SHU-SHENG, L.; FURLONG, M. J. Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string? **Journal of Economic Entomology**, v.105, n.4, p. 1115-1129, 2012.

ZARATE, S.I.; KEMPEMA, L.A.; WALLING, L.L. Silver leaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 143, p. 866–875, 2007.

ZEHNDER, G.; KLOEPPER, J.; CHANGBIN, Y.; WEI, G. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological and Microbial Control**, Nitra, v. 90, p. 391–396, 1997.

ZHANG, H.; KIM, M.S.; SUN, Y.; DOWD, S.E.; SHI, H.; PARÉ, P.W. Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Lubbock, v. 21, n. 6, p. 737-744, 2008b.

ZHANG, H.; XIE, X.; KIM, M.S.; KORNYEYEV, D.A.; HOLADAY, S.; PARÉ, P.W. Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. **The Plant Journal**, Lubbock, v. 56, n. 2, p. 264-273, 2008.

ZHENG, S.J.; VAN DIJK, J.P.; BRUINSMA, M.; DICKE, M. Sensitivity and speed of induced defense of cabbage (*Brassica oleracea* L.): dynamics of BoLOX expression. patterns during insect and pathogen attack. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 20, p. 1332–1345, 2007.