



LARA SALES

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E
SUBSTÂNCIAS HÚMICAS COMO INDUTORAS DE DEFESAS
DIRETAS E INDIRETAS DO CAFEIEIRO À COCHONILHA
Planococcus minor (MASKELL) (HEMIPTERA:
PSEUDOCOCCIDAE)**

**LAVRAS-MG
2023**

LARA SALES

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E SUBSTÂNCIAS HÚMICAS
COMO INDUTORAS DE DEFESAS DIRETAS E INDIRETAS DO CAFEIEIRO À
COCHONILHA *Planococcus minor* (MASKELL) (HEMIPTERA:
PSEUDOCOCCIDAE)**

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^a. Dr^a. Maria Fernanda Gomes Villalba Peñaflo
Orientadora

Dr^a. Lenira Viana Costa Santa-Cecília
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2023**

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

Sales, Lara.

Bactérias promotoras de crescimento e substâncias húmicas
como indutoras de defesas diretas e indiretas do cafeeiro à
cochonilha *Planococcus minor* (Maskell) (Hemiptera:
Pseudococcidae) / Lara Sales. - 2023.

66 p. : il.

Orientador(a): Maria Fernanda Gomes Villalba Peñafior.

Coorientador(a): Lenira Viana Costa Santa-Cecília.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Atratividade. 2. Bioestimulantes. 3. Resistência de plantas. I.
Peñafior, Maria Fernanda Gomes Villalba. II. Santa-Cecília, Lenira
Viana Costa. III. Título.

LARA SALES

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E SUBSTÂNCIAS HÚMICAS
COMO INDUTORAS DE DEFESAS DIRETAS E INDIRETAS DO CAFEIEIRO À
COCHONILHA *Planococcus minor* (MASKELL) (HEMIPTERA:
PSEUDOCOCCIDAE)**

**GROWTH-PROMOTING BACTERIA AND HUMIC SUBSTANCES AS ELICITORS
OF DIRECT AND INDIRECT DEFENSES OF COFFEE PLANT TO MEALYBUG
Planococcus minor (MASKELL) (HEMIPTERA: PSEUDOCOCCIDAE)**

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 16 de março de 2023.

Dr ^a . Maria Fernanda Gomes Villalba Peñaflor	UFLA
Dr. Ernesto Javier Prado Cordero	CONSULTOR PRIVADO
Dr. Rogério Antônio Silva	EPAMIG
Dr ^a . Amanda Maria Nascimento	AGROTESTE
Dr ^a . Elisângela Ferreira Furtado Paiva	ANGI CONSULTORIA EM CAFÉS

Prof^a. Dra. Maria Fernanda Gomes Villalba Peñaflor
Orientadora

Dr^a. Lenira Viana Costa Santa-Cecília
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por permitir a realização de um sonho e por cuidar de mim com tanto carinho durante toda essa caminhada acadêmica.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Entomologia (DEN), pela oportunidade e por contribuir em mais uma etapa da minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto “Bactérias endofíticas como indutoras de resistência e tolerância a estresses bióticos e abióticos em mudas de *Coffea arabica* L.”.

À Empresa Solohumics Fertilizantes (Alcobaça, BA, Brasil) por contribuir com o fornecimento do produto Solohumics-solo®.

Às minhas orientadoras, professora Dra. Maria Fernanda Peñafior, não tenho palavras para agradecer seu cuidado, incentivo, apoio, amizade e por todo ensinamento e paciência, e à Dra. Lenira Santa-Cecília, por sua disposição, amizade e por ter sido a base na minha formação.

Aos doutores Paulo Andrade e Paulo Lacava do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade de São Carlos (UFSCar) por terem fornecido o inóculo utilizado nos experimentos.

Aos professores, Dra. Joyce Dória, Dr. Mario Lúcio Resende, Dra. Heloísa Santos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao professor Dr. José Mauricio Simões Bento e a Dra. Arodí Favaris do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos da Universidade de São Paulo (USP/ESALQ) pela colaboração, apoio técnico e por disponibilizarem o laboratório para realização de experimentos.

Aos pesquisadores, Dr. Nilton Fritzens Sanches e Dr. Ernesto Prado, pela contribuição dos insetos utilizados no trabalho. Ao Dr. Paulo Pompeu, Dr. Felipe Rodrigues, Dra. Tharin, e aos doutorandos Victor Buttrós e Pedro Cvasin pela assistência técnica e apoio nos experimentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Ecologia Química das Interações Inseto-Planta (LEQIIP) e do departamento, pela amizade, ajuda nos experimentos, pelos momentos de alegria e as horas alegres compartilhadas. Em especial à Livia Souza, Marvin Pec e Fernanda Andrade pela amizade que contruímos e por sempre estarem disponíveis e prontos para ajuda no que for preciso.

Aos professores e técnicos do Departamento de Entomologia por ajudarem e contribuírem na minha formação.

Ao Núcleo de Estudos de Entomologia (NEENTO) e à professora Dra. Rosangela Marucci, que participaram grandemente do meu crescimento acadêmico e profissional. Serei sempre grata pela oportunidade que me deram, mesmo diante das minhas limitações.

Aos meus pais e toda minha família a minha eterna gratidão por acreditarem e investirem no meu futuro. Obrigada por todo apoio, orações e contribuições, serei sempre grata a todos.

Ao meu esposo Felipe, por tanto companheirismo, pela leveza e paciência, por me dar forças e paz nos momentos mais difíceis e por ser sempre meu apoio. Te amo incondicionalmente e serei eternamente grata há tudo que você faz por mim.

Aos meus amigos, em especial a Livia, Daiani e Ricardo, sou muito grata por ter encontrado a verdadeira amizade em vocês!

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram com a minha formação.

*“Rendei graças ao Senhor, porque Ele é bom, porque a Sua misericórdia dura para sempre.”
Salmos 136:1*

RESUMO GERAL

Os bioestimulantes tem como função primária crescimento vegetal, mas também podem induzir resistência direta ou indireta à planta, tornando-se uma alternativa sustentável. O objetivo dessa tese foi avaliar os efeitos das substâncias húmicas (SH) e da bactéria promotora de crescimento de plantas (BPCP), *Enterobacter tabaci*, combinadas e isoladas, sobre as defesas químicas do cafeeiro *Coffea arabica* (Rubiaceae) contra a infestação pela cochonilha *Planococcus minor* (Hemiptera: Pseudococcidae). Verificamos que BPCP e SH levaram ao crescimento da raiz e da parte aérea do café, entretanto o uso combinado estimulou o crescimento de mais características vegetais do que quando usados separadamente. Na seleção hospedeira, todos bioestimulantes diminuíram a colonização de cochonilhas em cafeeiros, sendo SH o menos preferido. Os tratamentos SH e SH+BPCP foram os piores hospedeiros, além de estimular o aumento da atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD). O tratamento com apenas SH estimulou a atividade da catalase (CAT). Todos os tratamentos com bioestimulantes aumentaram os teores de fenóis de plantas não infestadas, no entanto, após a infestação, apenas as plantas com BPCP e SH+BPCP apresentaram maiores teores em relação ao controle. Avaliamos a atratividade do predador *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae). Quando contrastamos plantas induzidas pela cochonilha frente ao controle, tratadas com BPCP ou SH+BPCP, elas foram atraídas para plantas induzidas. Somente SH infestada *versus* SH não infestada não foi discriminada. Nos tratamentos infestados pela cochonilha contrastados com o controle também infestado, a joaninha orientou-se pelos voláteis dos bioestimulantes. Quando exposto aos voláteis induzidos de SH *versus* SH+BPCP, *C. montrouzieri* não diferenciou os tratamentos. Já na combinação BPCP e SH+BPCP, ambos infestados, ela teve preferência pelas plantas tratadas com os dois bioestimulantes. Ao analisar enzimas de plantas induzidas, APX foi maior no tratamento BPCP do que SH, mas os dois não diferiram do controle e de SH+BPCP. SOD foi maior nos tratamentos SH e no uso combinado dos dois bioestimulantes. Já a CAT foi reduzida pelo SH, já que SH e SH+BPCP tiveram menor atividade em relação ao controle e BPCP. Também quantificamos os fitohormônios ácido salicílico (AS) e jasmônico (AJ), onde a infestação pela *P. minor* aumentou 2 vezes os níveis de AS nas plantas em relação às não infestadas. Porém, nenhum dos tratamentos com bioestimulantes influenciou o nível de AS na planta. A infestação da cochonilha não modificou os níveis de AJ em relação a plantas não infestadas, porém o tratamento SH+BPCP levou ao seu aumento em relação ao tratamento com SH ou BPCP. Embora o uso combinado de SH e BPCP tenha promovido maior crescimento das plantas que o uso isolado dos bioestimulantes, ele não apresentou efeito sinérgico sobre as defesas diretas ou indiretas do cafeeiro contra a cochonilha, sendo SH isoladamente o melhor tratamento para o aumento das defesas da planta. Os tratamentos com SH e BPCP em geral promoveram o aumento dos fenóis e melhoraram a capacidade de sinalização das vias de defesa, porém não foi possível determinar o mecanismo pelo qual o SH tornou a planta mais resistente às cochonilhas.

Palavras-chave: Atratividade. Bioestimulantes. *Coffea arabica*. Inimigo natural. Resistência de plantas.

ABSTRACT

Biostimulants have the primary function of providing plant growth, they can also induce direct or indirect resistance to the plant, making them an alternative for sustainable. This thesis aimed to evaluate the effects of humic substances (HS) and the plant growth-promoting bacteria (PGPB), *Enterobacter tabaci*, combined and isolated, on chemical defenses of the coffee plant *Coffea arabica* (Rubiaceae) against infestation by the mealybug *Planococcus minor* (Hemiptera: Pseudococcidae). We verified that PGPB and HS acted as biostimulants in the growth of the root and aerial part of coffee plants, however, their combined use stimulated the growth of more plant characteristics than when used separately. In the host selection, all treatments with biostimulants reduced the colonization of mealybugs in coffee plants, with the HS treatment being the least preferred by them. On the other hand, HS and HS + PGPB treatments were not good hosts for pseudococcids, in addition to stimulating increased activity of the enzymes of oxidative metabolism ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD). Treatment with only HS stimulated catalase activity (CAT). All treatments with biostimulants increased the levels of phenolic compounds in non-infested plants, however, after infestation, only plants treated with PGPB and HS+PGPB showed higher levels of these compounds compared to control plants. We evaluated the attractiveness of the *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae). When contrasting *P. minor*-infested plants against control plants, treated with PGPB or HS+PGPB, *C. montrouzieri* were attracted to infested plants. Only HS-infested versus HS non-infested was not discriminated. The ladybug was preferentially guided by the volatiles emitted by the mealybug-infested plants with biostimulants than those emitted by mealybug-infested plants without biostimulants (control). However, when exposed to induced volatiles emitted by HS-treated plants versus HS+PGPB-treated plants, *C. montrouzieri* did not differentiate between treatments. Furthermore, between PGPB and HS+PGPB, both infested, the natural enemy showed a preference for infested plants treated with both biostimulants. When analyzing induced plant enzymes, we observed that APX was higher in the PGPB treatment than in the HS treatment, but the two treatments did not differ from the control. SOD was higher in HS and in HS+PGPB treatment. On the other hand, CAT was reduced by HS application, since HS and HS+PGPB treatments had less activity compared to control and PGPB. We also quantified the amounts of phytohormones salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA). The infestation by *P. minor* increased the levels of SA in the coffee plants 2 times compared to the non-infested ones. However, none of the treatments with biostimulants influenced the accumulation of SA in the plant. In contrast, *P. minor* infestation did not modify JA levels in relation to non-infested plants, however, the HS+PGPB treatment showed higher levels of JA compared to HS or PGPB treatments. Thus, the combined use of biostimulants, HS + PGPB, promoted greater plant growth than the isolated use, however, the combined use did not have a synergistic effect on the direct or indirect defenses of the coffee plant against the mealybug. Furthermore, HS used isolated was the best treatment to increase coffee plant defenses. Although HS and PGPB treatments promoted an increase in phenolic compounds and improved the signaling capacity of the plant's defense pathways, it is not possible to determine the mechanism by which the treatment with HS made the plant more resistant to the white mealybug.

Keywords: Attractiveness. Biostimulants. *Coffea arabica*. Natural enemy. Plant resistance.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	99
INTRODUÇÃO GERAL	99
REFERÊNCIAS	13
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	20
Abstract.....	22
1. Introduction	22
2. Materials and methods	24
3. Results	28
4. Discussion	30
Acknowledgements	34
References	34
Supplementary Material	43
ARTIGO 2	44
RESUMO	45
INTRODUÇÃO.....	46
MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
RESULTADOS	52
DISCUSSÃO	55
AGRADECIMENTOS	58
REFERÊNCIAS	58
MATERIAL SUPLEMENTAR	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Uma das alternativas que vem trazendo nova perspectiva para agricultura moderna é o uso de bioestimulantes. A função primária desses compostos é melhorar processos fisiológicos da planta, a absorção de nutrientes e o aumento da produtividade, entretanto, tem-se observado que eles também podem induzir resistência a estresses bióticos e abióticos (CALVO et al., 2014; CANELLAS et al., 2015; YAKHIN et al., 2017). Nos processos fisiológicos da planta e nos seus níveis hormonais (BROWN; SAA, 2015), os bioestimulantes atuam, principalmente, ativando os mecanismos de resistência sistêmica adquirida (RSA, ou *systemic acquired resistance*), que induz e/ou fortalece as defesas das plantas mais rapidamente após o dano ou infecção (JUNG et al., 2009; MHATRE et al., 2019). Alguns trabalhos apontam que o uso de bioestimulantes pode aumentar a defesa das plantas contra o estresse através do aumento da sua atividade antioxidante (HAMZA; SUGGARS, 2001; ZHANG; SCHMIDT, 2000), mitigando os efeitos da herbivoria mais eficientemente (DORTA et al., 2020; RASHID et al., 2017). Apesar da importância e da crescente utilização dos bioestimulantes pouco se sabe sobre os mecanismos de ação desses compostos nas plantas (WILSON; XU; TAYLOR, 2015).

Existe uma subdivisão entre os grupos de bioestimulantes de acordo com a substância ou organismo utilizado, no qual os mais promissores são as substâncias húmicas (SH) e as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). As SH são constituídas de ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina. São constituintes naturais da matéria orgânica, micróbios e raízes das plantas (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014; DU JARDIN, 2015; SCHIAVON et al., 2010), podendo posteriormente serem extraídas de várias fontes, como solos, produtos de compostagem, de leonardita, carvões e turfas (DU JARDIN, 2015; PASSOS et al., 2007; ROSE et al., 2014). Seu uso em pesquisas na fisiologia vegetal demonstra sua eficiência na aceleração do crescimento e desenvolvimento vegetal, alongamento radicular, aumento da germinação e da biomassa (CHEN; MAGEN; CLAPP, 2001). Além disso, há evidências de que as SH alteram o perfil de metabólitos de defesas das plantas (CANELLAS et al., 2015; YAKHIN et al., 2017) auxiliando na resistência contra insetos herbívoros mastigadores (YARDIM et al., 2006) e sugadores de seiva (RAZMJOU et al., 2011).

As BPCP são microrganismos capazes de colonizar a planta sem manifestar ação patogênica ou causar danos a ela (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER; BENHAMOU, 1997), pelo contrário, afetam de forma positiva, auxiliando no crescimento e desenvolvimento vegetal,

além de desempenhar múltiplas funções no solo (BULGARELLI et al., 2013). Elas podem ser tanto endofíticas quanto da rizosfera (ARTURSSON; FINLAY; JANSSON, 2006), e se associam às plantas proporcionando diversos benefícios, sendo a resistência a pragas e doenças e a promoção de crescimento vegetal, os mais estudados (DOBBELAERE et al., 2002). Elas tornam as plantas mais nutridas, sendo capazes de promover o aumento na fixação de nitrogênio e a produção de fitohormônios (BULGARELLI et al., 2013). Além disso, esses microrganismos podem estimular a planta a produzir compostos químicos que atuam na defesa contra o ataque de insetos herbívoros (KERRY, 2000; PING; BOLAND, 2004; RYU et al., 2004; SCHMIDT et al, 2015; STURZ; CHRISTIE, 2003). Alguns trabalhos relatam que o uso combinado dos bioestimulantes SH e BPCP podem apresentar melhores resultados no crescimento e desenvolvimento da planta, que quando aplicados separadamente (AGUIAR et al., 2015; BALDOTTO et al., 2010; OLIVARES et al., 2015). Entretanto, embora esse sinergismo possa ser benéfico para seu crescimento, também pode torna-la mais atrativa para algumas pragas devido a maior quantidade de tecido vegetal e qualidade nutricional, sendo necessário mais estudos antes de sua implantação no campo (PEREIRA et al., 2021).

Apesar dos danos ocasionados pelas pragas, as plantas apresentam mecanismos de defesa para enfrentar os ataques dos herbívoros (AARTSMA et al., 2017; CHAUDHARY et al., 2018). Os compostos fenólicos, por exemplo, são substâncias do metabolismo secundário das plantas que estão envolvidas na defesa contra insetos (BERBEHENN; MARTIN, 1994; DELVAS et al., 2011). O metabolismo secundário, juntamente com o primário, é ativado quando as plantas respondem aos estresses, sendo a comunicação por meio de compostos químicos fundamental para a resistência das plantas, podendo ser expresso de forma constitutiva e/ou induzida (BEZEMER; VAN DAM, 2005; DICKE, 2009; ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009). As defesas constitutivas são aquelas que estão sempre presentes no tecido das plantas, já as induzidas são acionadas pelas plantas após serem atacadas por um herbívoro (AGRAWAL; KARBAN, 1999; ARIMURA; KOST; BOLAND, 2005). Os compostos não voláteis ou voláteis sintetizados pela planta danificada podem atuar como defesas diretas por influenciarem a fisiologia e/ou comportamento dos herbívoros (DUDAREVA et al., 2013; PARÉ; TUMLINSON, 1999); ou indiretas, por meio da emissão de compostos voláteis emitidos após a herbivoria (ou *herbivore-induced plant volatiles*, HIPVs) que servem como pistas químicas para os inimigos naturais encontrarem suas presas/hospedeiros (AARTSMA et al., 2017; DICKE; VAN LOON, 2000; PRICE et al., 1980; TURLINGS; TUMLINSON, 1992).

Os inimigos naturais são capazes de perceber de forma específica os compostos emitidos pelas plantas em resposta ao ataque dos herbívoros (GISH; DE MORAES; MESCHER, 2015; HAN; CHEN, 2002). Esse reconhecimento da planta sobre a presença do herbívoro ocorre por meio do dano físico das células aliado ao contato com a saliva, que desencadeiam a sinalização bioquímica para expressão da defesa induzida (HEIL, 2014). A planta regula a resposta induzida de acordo com a identidade ou guilda alimentar do inseto herbívoro por meio da modulação de três fitohormônios principais: ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS) e etileno (ET) (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013). Os artrópodes mastigadores, de maneira geral, acionam a rota de defesa do AJ, enquanto os sugadores de floema acionam a rota de defesa mediada pelo AS (DICKE; VAN LOON; SOLER, 2009; KEMPEMA et al., 2007; PINTO-ZEVALLOS et al., 2013; ZARATE; KEMPEMA; WALLING, 2007). A defesa induzida da planta contra herbívoros em geral depende, do aumento do nível de AJ nos tecidos. Entretanto, em muitas plantas, os fitohormônios AJ e AS interagem de forma antagônica, de modo que a elevação dos níveis de AJ promovem a supressão da rota do AS, e vice-versa (*cross-talk* negativo) (DICKE; VAN LOON; SOLER, 2009; OLIVEIRA; PAREJA, 2014). Os insetos sugadores frequentemente manipulam as defesas da planta por meio do *cross-talk* negativo resultante da ativação da rota modulada pelo AS (HEIL, 2014; ZHANG et al., 2011, 2015).

O cafeeiro *Coffea* spp. (Rubiaceae) é uma das culturas de maior interesse de estudos devido sua relevância para o agronegócio mundial. Dentre as 124 espécies, apenas duas são usadas para produção comercial da bebida, o arábica *Coffea arabica* L. e o robusta *Coffea canephora* Pierre (DAVIS et al., 2011). A estimativa para a produção mundial de café, na temporada 2022/23, é de 175 milhões de sacas, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2022), agregando para expansão do comércio mundial e perdurando como *commodity* fundamental para a balança comercial do país (MEDEIROS; RODRIGUES, 2017). Entretanto, apesar do sucesso na sua produção, o cafeeiro ainda é negativamente afetado por fatores abióticos como mudanças climáticas (OVALLE-RIVERA et al., 2015) e bióticos como presença de patógenos (AVELINO et al., 2007) e pragas (ARISTIZABAL; GOMEZ; CARDONA, 2015; PANTOJA-GOMEZ et al., 2019).

Dentre os artrópodes-pragas que afetam a cafeeiro, destaca-se a cochonilha *Planococcus minor* (Maskell) (Hemiptera: Pseudococcidae) (REIS et al., 2010; SANTA-CECÍLIA; SOUZA, 2014). Esse pseudococcídeo, atualmente praga primária do cafeeiro, é também conhecido como “cochonilha-das-rosetas” ou “cochonilha-branca”, por apresentarem tegumento mole e serem revestidos por uma secreção branca pulverulenta (SANTA-CECÍLIA; SILVA, 2020). Eles são

sugadores da seiva da planta, e habitam tanto na parte aérea quanto radicular, podendo causar secamento das rosetas e queda dos frutos (SANTA-CECÍLIA; SOUZA, 2014). Há registros desses insetos em diversas regiões produtoras no Brasil, tanto em cultivos de cafés conillon, quanto em arábica, o que tem gerado alerta devido aos surtos esporádicos que atingem elevados níveis populacionais (SANTA-CECÍLIA; SOUZA, 2014). Quando medidas de controles não são tomadas, a infestação pela cochonilha-branca pode resultar na queda de até 100% de flores e frutos e/ou seca das rosetas em plantas extremamente infestadas (FORNAZIER; SANTA-CECÍLIA; MARTINS, 2009; SANTA-CECÍLIA; SOUZA, 2014; SANTA-CECÍLIA; SILVA, 2020).

A utilização de inimigos naturais no controle de pragas, tem sido bastante promissora por ser uma tática menos agressiva ao meio ambiente e à saúde humana (WRIGHT, 2014). O coleóptero *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), conhecido como joaninha “superpredadora” e “destruidora” de cochonilhas (MANI; KRISHNAMOORTHY, 2008), é capaz de se alimentar da cochonilha em todas as fases do seu desenvolvimento, entretanto, os adultos possuem grande habilidade de percepção da presa e são capazes de localizá-la por meio de estímulos químicos e visuais, tornando-os altamente eficazes (HEIDARI; COPLAND, 1992). O fato de ser um predador voraz, eficaz e especializado em cochonilhas, fez com que esse coleóptero se tornasse de grande interesse em vários lugares do mundo para o controle dos pseudococcídeos (CHONG; ARISTIZÁBAL; ARTHURS, 2015; CULIK et al., 2013; KAIRO et al., 2013), sendo criado em massa e comercializado em mais de 40 países (ROY; MIGEON, 2010), o que conseqüentemente promove a redução do uso de produtos fitossanitários.

Nesse contexto, a identificação e manipulação de sinais químicos nas diferentes interações biológicas fornecem numerosas possibilidades para o desenvolvimento de táticas para um controle de pragas mais sustentáveis (PICKETT; KHAN, 2016). Com os recentes estudos mostrando a eficiência dos bioestimulantes usados de forma isolada e o possível efeito sinérgico na qualidade da planta quando utilizado de forma combinada (AGUIAR et al., 2018), o objetivo geral dessa tese foi investigar o efeito do uso de substâncias húmicas e/ou bactéria promotora do crescimento de plantas *Enterobacter tabaci* YIM Hb-3T, nas características agrônômicas e seu potencial como indutores de resistência direta e indireta em cafeeiros contra infestação pela cochonilha branca *P. minor*.

REFERÊNCIAS

- AARTSMA, Y. et al. Herbivore-induced plant volatiles and tritrophic interactions across spatial scales. **New Phytologist**, v. 216, n. 4, p. 1054-1063, 2017.
<https://doi.org/10.1111/nph.14475>
- AGRAWAL, A. A.; KARBAN, R. **The ecology and evolution of inducible defenses**. Quarterly Review of Biology, v. 65, n. 2, p. 323-340, 1999.
- AGUIAR, D. M. et al. Avaliação do desenvolvimento e produtividade *Phaseolus vulgaris* L. submetido à aplicação foliar do regulador vegetal Stimulate® e do nutriente foliar Hold®. **Revista Eletrônica Thesis**, São Paulo, n. 23, p. 89-112, 2015.
- AGUIAR, N. O. et al. Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by endophytic diazotrophic bacteria and humic acids. **PeerJ**, v. 6, p. e5445, 2018
<https://doi.org/10.7717/peerj.5445>
- ARIMURA, G.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1734, n. 2, p. 91-111, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.03.001>
- ARISTIZÁBAL, M. V.; GÓMEZ P. A.; CARDONA A. C. A. Biorefineries based on coffee cut-stems and sugarcane bagasse: furan-based compounds and alkanes as interesting products. **Bioresour Technol**, v. 196, n. 2, p. 480–489, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.057>
- ARTURSSON, V.; FINLAY, R. D.; JANSSON, J. K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2006.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x>
- AVELINO, J. et al. Topography and crop management are key factors for the development of American leaf spot epidemics on coffee in Costa Rica. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1532-1542, 2007. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-12-1532>
- BALDOTTO, L. E. B. et al. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 1, p. 349-360, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000200008>
- BALDOTTO, L. E. B; BALDOTTO, M. A. Adventitious rooting on the Brazilian red-cloak and sanchezia after application of indole-butyric and humic acids. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 434-439, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620140000400010>

- BERBEHENN, R. V.; MARTIN, M. M. The sensitivity in larvae of *Malacosoma disstria* (Lepidoptera): roles of the peritrophic envelope and midgut oxidation. **J Chem Ecol**, v. 20, n. 8, p. 1985–2001, 1994. <https://doi.org/10.1007/BF02066238>
- BEZEMER, T. M.; VAN DAM, N. M. Linking aboveground and belowground interactions via induced plant defenses. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 20, n. 11, p. 617–624, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.08.006>
- BROWN, P.; SAA, S. Biostimulants in agriculture. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 671, 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00671>
- BULGARELLI, D. et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 807-838, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
- CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and soil**, v. 383, n. 1-2, p. 3-41, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- CANELLAS, L. P. et al. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture, **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 15-27, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>
- CHAUDHARY, A. et al. Plant defenses against herbivorous insects: A Review. **IJCS**, v. 6, n. 5, p. 681-688, 2018.
- CHEN, Y.; MAGEN, H.; CLAPP, C. E. **The effect of humic substances on plant growth and their impact on organic agriculture**. Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, Resumos de palestras e trabalhos apresentados, UFV, Departamento de Solos, p. 36-37, 2001.
- CHONG, J. H.; ARISTIZÁBAL, L. F.; ARTHURS, S. P. Biology and management of *Maconellicoccus hirsutus* (Hemiptera: Pseudococcidae) on ornamental plants. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 6, n. 1, p. 5, 2015. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmv004>
- CULIK, M. P. et al. The invasive hibiscus mealybug *Maconellicoccus hirsutus* (Hemiptera: Pseudococcidae) and its recent range expansion in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 2, p. 638-640, 2013. <https://doi.org/10.1653/024.096.0234>
- DAVIS, A. P. et al. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, n. 4, p. 357-377, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x>

DELVAS, N. et al. Phenolic compounds that confer resistance to spruce budworm. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 141, n. 1, p. 35-44, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01161.x>

DICKE, M. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. **Plant Cell Environ**, v. 32, n. 4, p. 654–665, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01913.x>

DICKE, M.; VAN LOON, J. J. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 97, n. 3, p. 237-249, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2000.00736.x>

DICKE, M.; VAN LOON, J. J.; SOLER, R. T. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 317-324, 2009. <https://doi.org/10.1038/nchembio.169>

DOBBELAERE et al. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p. 284-297, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0534-9>

DORTA, D., et al. Bactérias Isoladas de Sedimento de Manguezal com potencial de biorremediação de contaminações causadas por produtos derivados de petróleo. **Enciclopedia Biosfera**, v. 17, n. 34, 2020. https://doi.org/10.18677/EnciBio_2020D6

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3-14, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>

DUDAREVA, N. et al. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v. 198, n. 1, p. 16-32, 2013. <https://doi.org/10.1111/nph.12145>

FORNAZIER, M. J.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; MARTINS, D. S. **Cochonilhas-farinhas associadas ao Café Conilon**. Tecnologias para produção do café conilon, 2009. 360 p.

GISH, M.; DE MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Herbivore-induced plant volatiles in natural and agricultural ecosystems: open questions and future prospects. **Current Opinion in Insect Science**, v. 9, p. 1-6, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.001>

HAMZA, B.; SUGGARS, A. **Biostimulants: myths and realities**. TurfGrass Trends, v. 8, p. 6-10, 2001.

HAN B. Y.; CHEN, Z. M. Behavioral and electrophysiological responses of natural enemies to synomones from tea shoots and kairomones from tea aphids, *Toxoptera aurantii*. **J Chem Ecol**, v. 28, p. 2203–2219, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1021045231501>

HEIDARI, M.; COPLAND, M. J. W. Host finding by *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) a predator of mealybugs (Homoptera: Pseudococcidae). **Entomophaga**, v. 37, n. 4, p. 621-625, 1992. <https://doi.org/10.1007/BF02372333>

HEIL, M. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, p. 41-61, 2008.

JUNG, H. W. et al. Priming na imunidade sistêmica de plantas. **Ciência**, v. 324, n. 5923, p. 89-91, 2008. <https://doi.org/10.1126/science.1170025>

KAIRO, M. T. K. et al. *Cryptolaemus montrouzieri* (Mulsant) (Coccinellidae: Scymninae): a review of biology, ecology, and use in biological control with particular reference to potential impact on non-target organisms. **CAB Rev**, v. 8, n. 5, p. 1-20, 2013. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR2013800>

KEMPEMA, L. A. et al. *Arabidopsis transcriptome* changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. **Plant Physiology**, v. 143, n. 2, p. 849-865, 2007. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090662>

KERRY, B. R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual review of phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 423-441, 2000. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.423>

MANI, M. et al. Biological suppression of the mealybugs *Planococcus citri* (Risso), *Ferrisia virgata* (Cockerell) and *Nipaecoccus viridis* (Newstead) on pummelo with *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant in India. **Journal of Biological Control**, v. 22, n. 1, p. 169-172, 2008. <https://doi.org/10.18311/jbc/2008/3815>

MEDEIROS, R. V. V.; RODRIGUES, P. M. A. A economia cafeeira no Brasil e a importância das inovações para essa cadeia. **Economia em Revista-AERE**, v. 25, n. 1, p. 1-12, 2017. <https://doi.org/10.4025/aere.v25i1.35511>

MHATRE, P. H. et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes bio-control. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 17, p. 119-128, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.009>

OLIVARES, F. L. et al. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. **Scientia Horticulturae**, v. 183, p. 100-108, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.012>

OLIVEIRA, M. S.; PAREJA, M. Attraction of a ladybird to sweet pepper damaged by two aphid species simultaneously or sequentially. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 8, p. 547-555, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11829-014-9336-x>

OVALLE-RIVERA, O. et al. Projected shifts in *Coffea arabica* suitability among major global producing regions due to climate change. **PLoS one**, v. 10, n. 4, p. e0124155, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124155>

PANTOJA-GOMEZ, L. M. et al. Common origin of Brazilian and Colombian populations of the neotropical coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Journal of economic entomology**, v. 112, n. 2, p. 924-931, 2019. <https://doi.org/10.1093/jee/toy416>

PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant physiology**, v. 121, n. 2, p. 325-332, 1999. <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.325>

PASSOS, R. R. et al. Substâncias húmicas, atividade microbiana e carbono orgânico lábil em agregados de um Latossolo Vermelho distrófico sob duas coberturas vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 31, p. 1119-1129, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832007000500027>

PEREIRA, R. V. et al. The Effects of Biostimulants on Induced Plant Defense. **Frontiers in Agronomy**, v. 3, p. 630596, 2021. <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.630596>

PICKETT, J. A. et al. Plant volatiles yielding new ways to exploit plant defence. **Chemical ecology**, p. 161-173, 2006.

PING, L.; BOLAND, W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Trends in plant science**, v. 9, n. 6, p. 263-266, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.04.008>

PINTO-ZEVALLOS, D. M. et al. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 1395-1405, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000900021>

PRICE, P. W. et al. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 11, p. 41-65, 1980. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.11.110180.000353>

QUADT-HALLMANN, A.; KLOPPER, J. W.; BENHAMOU, N. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian journal of microbiology**, v. 43, n. 6, p. 577-582, 1997. <https://doi.org/10.1139/m97-08>

- RASHID, M. et al. Induction of systemic resistance against aphids by endophytic *Bacillus velezensis* YC7010 via expressing phytoalexin deficient4 in arabidopsis. **Front. Plant Sci.**, n. 8, p. 211, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00211>
- RAZMJOU, J.; MOHAMMADI, M.; HASSANPOUR, M. Effect of vermicompost and cucumber cultivar on population growth attributes of the melon aphid (hemiptera: Aphididae). **J. Econ. Entomol.**, n. 104, p. 1379-1383, 2011. <https://doi.org/10.1603/EC10120>
- REIS, P. R. et al. **Manejo Integrado das pragas do cafeeiro**. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. I. (Ed.). **Café arábica: do plantio à colheita**. Lavras: EPAMIG, 2010. Cap. 10. p. 573-688.
- ROSE, M. T. et al. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. **Advances in agronomy**, v. 124, p. 37-89, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800138-7.00002-4>
- ROY, H.; MIGEON, A. **Ladybeetles (Coccinellidae)**. *BioRisk*, v. 4, p. 293, 2010.
- RYU, C. M. et al. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 134, n. 3, p. 1017-1026, 2004. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>
- SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; SILVA, K. H. Interaction between mealybugs (Pseudococcidae) and coffee plants. **Coffee Science**, v. 15, p. e151695, 2020. <https://doi.org/10.25186/v15i.1695>.
- SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, B. **Cochonilhas-farinentas de maior ocorrência em cafeeiros no Brasil**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 35, n. 280, p. 45-54, 2014
- SCHIAVON M. et al. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 6, p. 662-669, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9790-6>
- STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. **Soil and Tillage Research**, v. 72, n. 2, p. 107-123, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(03\)00082-5](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(03)00082-5)
- TURLINGS, T. C.; TUMLINSON, J. H. Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 17, p. 8399-8402, 1992. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8399>

USDA. **USDA Agricultural Projections to 2031**. Disponível em:

<https://www.usda.gov/sites/default/files/documents/USDA-AgriculturalProjections-to-2031.pdf> >. Acesso em: junho 2022.

WILSON, H. T.; XU, K.; TAYLOR, A. G. Transcriptome analysis of gelatin seed treatment as a biostimulant of cucumber plant growth. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/391234>

WRIGHT, M. G. Biological control of invasive insect pests. In: Integrated pest management. **Academic Press**, p. 267-281, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00015-4>

YAKHIN, O. I. et al. Bioestimulants in plant science: a global perspective. **Frontiers in plant science**, n. 7, p. 2049, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>

YARDIM, E. N. et al., Suppression of tomato hornworm (*Manduca quinquemaculata*) and cucumber beetles (*Acalymma vittatum* and *Diabotrica undecimpunctata*) populations and damage by vermicomposts. **Pedobiologia**, v. 50, n. 1, p. 23-29, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2005.09.001>

ZARATE, S. I.; KEMPEMA, L. A.; WALLING, L. L. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. **Plant Physiology**, v. 143, n. 2, p. 866-875, 2007. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090035>

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Insect pheromones: technology and challenges for a competitive agriculture in Brazil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300016>

ZHANG, P. J. et al. Suppression of jasmonic acid-dependent defense in cotton plant by the mealybug *Phenacoccus solenopsis*. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. 372-378, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022378>

ZHANG, P. J. et al. The mealybug *Phenacoccus solenopsis* suppresses plant defense responses by manipulating JA-SA crosstalk. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep09354>

ZHANG, X.; SCHMIDT, R. E. Hormone-containing products' impact on antioxidant status of tall fescue and creeping bentgrass subjected to drought. **Crop science**, v. 40, n. 5, p. 1344-1349, 2000. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4051344x>

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

COMBINED USE OF HUMIC SUBSTANCES AND PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA AS A TOOL TO REDUCE MEALYBUG INFESTATION IN COFFEE PLANTS

(Manuscript written *Journal of Applied Entomology*' guidelines)

Lara Sales¹, Livia A. Souza¹, Marvin M. Pec², Victor H. Buttrós³, Pedro Y. Cavasin⁴, Paulo H. M Andrade⁵, Mario Lúcio V. Resende⁶, Paulo T Lacava⁵, Joyce Dória⁴, Heloísa O. Santos⁴, Lenira V. C. Santa-Cecília⁷ & Maria Fernanda G. V. Peñaflo^r*¹

¹ Department of Entomology, Lavras Federal University (UFLA), 37200-900, Lavras, MG, Brazil

² Department of Entomology, Luiz de Queiroz College of Agriculture (ESALQ), São Paulo University (USP), 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil

³ Agricultural Microbiology Sector, Lavras Federal University (UFLA), 37200-900, Lavras, MG, Brazil

⁴ Department of Agriculture Lavras Federal University (UFLA), 37200-900, Lavras, MG, Brazil

⁵ Department of Morphology and Pathology, Federal University of São Carlos (UFSCar), 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

⁶ Department of Phytopathology, Lavras Federal University (UFLA), 37200-900, Lavras, MG, Brazil

⁷ Former researcher IMA/EPAMIG Sul, 37200-900, Lavras, MG, Brazil

***Corresponding author:** Maria Fernanda G. V. Peñaflo^r. Department of Entomology, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brazil, PO Box 3037, CEP 37200-900, Telephone (35) 3829 – 1287, E-mail: fernanda.penaflor@gmail.com

1 **Abstract**

2 Biostimulants promote plant growth and can induce resistance of plants through a variety of
3 mechanisms, becoming a promising alternative to more sustainable agriculture. However, so
4 far, few studies have addressed whether the combined use of biostimulants can yield synergistic
5 effects on plant growth and resistance. Thus, our objective was to evaluate the effects of
6 *Enterobacter tabaci*, a plant growth-promoting bacteria (PGPB), and humic substances (HS),
7 separately or in combination, on the resistance of *Coffea arabica* L. coffee plants. (Rubiaceae)
8 against the white mealybug *Planococcus minor* (Maskell) (Hemiptera: Pseudococcidae). We
9 first confirmed that PGPB and HS acted as biostimulants of root or shoot growth in coffee. The
10 treatment HS+ PGPB stimulated the growth of more plant traits than the biostimulants
11 separately. In host selection tests, we found that treatment with any of the biostimulants reduced
12 colonization in coffee plants by the mealybug, but HS-treated plants were the least preferred
13 hosts among all treatments. Treatments with HS, either alone or in combination with PGPB,
14 were poor hosts for the mealybug as their colonies were smaller compared to control plants. On
15 the contrary, PGPB alone did not influence mealybug performance. Treatment with HS alone
16 or in combination stimulated the activity of ascorbate peroxidase and superoxide dismutase, but
17 only HS alone stimulated catalase activity. Biostimulant treatments led to higher content of
18 phenolic compounds in coffee plants, however after mealybug infestation only PGPB and
19 HS+PGPB-treated plants had higher content relative to control plants. Our study shows that the
20 combined use of HS and PGPB promoted greater plant growth, but did not yield greater
21 resistance of coffee plants to mealybugs being HS alone the best treatment to confer resistance
22 to them.

23

24 **Keywords:** Biostimulants. Defense. Resistance. *Coffea Arabica*. *Planococcus minor*.

1. Introduction

The use of plant biostimulants in crops to increase productivity has provided a new perspective to sustainable and modern agriculture. The primary role of these compounds is to improve plant growth and productivity; however, they can also alleviate biotic stresses in plants (Calvo et al., 2014; Canellas et al., 2015; Yakhin et al., 2017). Humic substances (HS) and plant growth-promoting bacteria (PGPB) are among the most promising biostimulants. While HS are components extracted from various sources, such as soils, compost products, coals and peat (Du Jardin, 2015; Passos et al., 2007; Rose et al., 2014), PGPB are beneficial microorganisms that colonize plants, increasing their growth and accelerating development, in addition to improving several soil properties (Bulgarelli et al., 2013; Quadt-Hallmann, Kloepper & Benhamou, 1997).

Both HS and PGPB act on the physiological processes of the plant and on its hormone levels (Brown & Saa, 2015), mainly stimulating the mechanisms of systemic acquired resistance (SAR), which induces and/or strengthens plant defenses (Jung et al., 2009; Mhatre et al., 2019). Some studies indicate that the use of biostimulants increases the defense of plants against stress by increasing their antioxidant activity (Hamza & Suggars, 2001; Zhang & Schmidt, 2000). The use of these inputs, in addition to increasing plant productivity and mitigating the limiting effects caused by abiotic stresses (Yakhin et al., 2017), can make plants less attractive and palatable to insect pests (Dorta et al., 2020; Rashid et al., 2017). The literature points out that they can affect the development, survival, and fecundity of lepidopteran pests and aphids (Jafary-Jahed et al., 2020; Mohamadi et al., 2017; Nasab, Yali & Bozorg-Amirkalaei, 2019). However, little refers to changes in plant characteristics that impair herbivore performance and the contained mechanisms charged with increasing pest resistance.

Some studies have shown that combined use of these two biostimulants may yield better results than when applied separately (Aguilar et al., 2015; Baldotto et al., 2010; Olivares et al., 2015). In the work by Song et al. (2015), in tomatoes and spinach, the treatments in which only PGPB were used, there was no effect on productivity and plant quality, however, when using PGPB combined with HS, there was a positive effect. This fact may have occurred because HS stimulates the production of root hairs, which help in the adhesion of microorganisms, increasing the synergistic potential of biostimulants. According to Pereira et al. (2021), while this synergistic effect can be beneficial for plant growth, it can also become more attractive to some pests, requiring further studies before its implementation in the field.

57 The coffee plant *Coffea* spp. (Rubiaceae) is one of the most cultivated crops in the world.
58 The species *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* Pierre account for practically 100% of all
59 coffee traded, with arabica accounting for around 70% of global production and canephora
60 30%. According to the International Coffee Organization (ICO, 2023), the estimated total
61 production of the crop for the year 2021/2022 is 167.2 million bags and world consumption is
62 expected to increase by around 3.3% compared to the previous year. Thus, coffee contributes
63 to world trade and is the main commodity for trade balance, making it suitable to invest in
64 culture and innovate in production technology (Medeiros & Rodrigues, 2017). However, the
65 production of this crop is negatively affected by biotic stresses, such as pests and diseases
66 (Aristizabal, Gomez & Cardona, 2015; Avelino et al., 2007; Pantoja-Gomez et al., 2019),
67 limiting productivity and causing losses to the producer.

68 Among the most critical biotic stresses of coffee plantations, there are insect pests. The
69 infestation by white mealybugs (*Planococcus* spp.) in coffee, for example, is unpredictable and
70 causes significant losses in the yield of coffee. The white mealybug or the rosette mealybug
71 *Planococcus minor* (Maskell) (Hemiptera: Pseudococcidae) is a sap-sucking insect that feeds
72 on the sap of the shoots, causing the drying of the rosettes and up to 100% of the flowers and
73 fruits fall in periods of high infestations (Fornazier, Santa-Cecília & Martins, 2009; Santa-
74 Cecília & Silva, 2020; Santa-Cecília & Souza, 2014).

75 The plant's ability to tolerate these stresses depends on different processes. In general,
76 they are related to the potential to maintain cell structure and active plant metabolism, so that
77 the plant has enough energy to maintain its primary and secondary metabolism functioning,
78 promoting plant growth, development, at the same time as tolerating stresses (Basu et al., 2016;
79 Dias et al., 2018; Kalaji et al., 2018). To deal with the effects of herbivory, plants have
80 developed several morphological, biochemical, and molecular adaptations (Dicke, 2009; War
81 et al., 2012), which can occur constitutively or are induced by herbivory (Bezemer & Van Dam,
82 2005). Constitutive defenses are displayed continuously in the plant (Schoonhoven, Van Loon
83 & Dicke, 2005), while herbivore induced defenses are triggered after the plant is attacked by
84 herbivores (Karban & Baldwin, 1997). Phenolic compounds are a group of secondary plant
85 metabolites that act as defenses against pathogen and insects (Berbehenn & Martin, 1994;
86 Delvas et al., 2011). Knowledge about chemically-mediated interactions involving plants and
87 herbivores is important to develop novel and alternative pest management tactics that are less
88 aggressive to the environment, and can help to reduce the dependence on chemical
89 phytosanitary products.

90 In this work, we investigate the potential that the combined use of HS and an isolate of
91 a PGPB promotes coffee growth (Andrade, 2019), to increase resistance in coffee plants against
92 the infestation by the white mealybug *P. minor*. We specifically address the following
93 questions: (I) Does treatment with HS and/or PGPB increase the growth of coffee seedlings?
94 (II) Does treatment with HS and/or PGPB increase resistance of coffee seedlings to *P. minor*?
95 (III) Does treatment with HS and/or PGPB increase the activity of antioxidant enzymes? (IV)
96 Does treatment with HS and/or PGPB increase the phenolic content? In this work, we used
97 growth, chlorophyll, and carotenoid production as criteria for evaluating primary metabolism.
98 In addition, we also evaluated antioxidant enzymes, considered parameters of great importance
99 in determining the tolerance of plants to stress associated with the production of reactive oxygen
100 species (ROS) (Demidchik et al., 2014), which are important components of plant defense
101 responses against pathogens and herbivores (He et al., 2011).

102

103 2. Materials and methods

104 *Plants and biostimulants.* Coffee seeds *C. arabica* cv. Mundo Novo IAC 376/4 were
105 grown in greenhouses under natural oscillations of temperature and light between July and
106 November 2019 and 2020 (Lavras, MG, Brazil, 21°13'35.0" S 44°58'29.3" W). Two seeds were
107 placed in a perforated polyethylene bag (10 cm x 20 cm), containing soil (dark red latosol),
108 substrate (Carolina Soil®, Carolina Soil Company, Brazil) and sand (2:1:1 ratio, respectively).
109 After emergence, only one seedling per bag was left. Only 6- to 7-month-old coffee seedlings
110 or 6- to 8 pairs of leaves were used in the experiments.

111 The YIM Hb-3^T isolate of *E. tabaci* was obtained from roots of organic coffee
112 plantations in Fazenda Monte Alto (Dourado, São Paulo Brazil, 22°42'30" S 47°30'00"W).
113 Previous results showed that inoculation of coffee (*C. arabica*) with the isolate promoted plant
114 growth (Andrade, 2019). To produce the PGPB inoculant, a pure inoculum of *E. tabaci*,
115 previously stored at -80 °C, was added to tryptone soy broth culture medium (TSB) at 28 °C
116 until approximately 1×10^9 CFU.mL⁻¹ (CFU = colony formation units). CFU was calculated
117 based on the growth curve that compares the optical density (OD) of the suspension at 520 nm
118 with the number of cells in suspension, where OD = 0.5 is equivalent to approximately 10^9
119 CFU.mL⁻¹. Subsequently, cells were centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes and washed twice
120 in PBS (phosphate buffer saline, pH = 7.0) followed by further centrifugation to remove
121 residues of the culture medium. The precipitate was suspended again in PBS buffer until the
122 OD was equal to 0.5 to obtain the bacterial suspension to inoculate plants.

123 The source of HS was the commercial formulation Solohumics-solo® (Solohumics
124 Fertilizantes, Alcobaça, BA, Brazil), which has 1.5% total nitrogen, 1.5% water-soluble
125 potassium, 46% total organic carbon, 25% humic extract, 5% fulvic extract, diluted at a
126 concentration of 2.5% (25 ml / L of distilled water).

127

128 *Insects.* The colony of white mealybug *P. minor* was established from thousands of individuals
129 collected from cocoa plants *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) in Lavras, MG, Brazil. The
130 identity of the mealybugs was confirmed by Dr. Ernesto Prado. The laboratory colony was kept
131 on *Cucurbita maxima* L. cv. pumpkin fruits Cabotchá (Cucurbitaceae) under controlled
132 conditions ($25 \pm 2^\circ\text{C}$; $70 \pm 10\%$ of UR; 12 h photophase). The fruits were first washed with a
133 10% sodium hypochlorite solution and offered to mealybugs in cages (60cm x 40cm x 30cm)
134 covered with black fabric to avoid possible phototropic effects (Santa-Cecília et al., 2009;
135 Santa-Cecília, Prado & OLIVEIRA, 2013). When the pumpkins were senescent, they were
136 replaced by clean and uninfested ones.

137

138 *Treatments.* Coffee seedlings were treated with biostimulants to obtain HS-treated, PGPB-
139 treated, or HS+PGPB-treated coffee plants. First, the volume of biostimulants was determined
140 on the basis of the field capacity of the soil of coffee plants. Young coffee seedlings (30-45
141 days after planting) were treated with a single application of 6 mL of HS solution directly on
142 the soil. Treatment with PGPB consisted of applications of 6 mL of the bacterial suspension
143 directly to the soil of coffee seedlings (15 days after planting) every 15 days until they had 1
144 pair of fully expanded leaves (i.e., 45-60 days after planting), and every 30 days until the
145 beginning of experiments, totaling 6 applications of PGPB inoculant. HS+PGPB-treated coffee
146 plants received similar treatments as those described for HS-treated and PGPB-treated coffee
147 plants, however, a 7-day interval was given between the HS application and the second
148 application of PGPB (30-45 days after planting). Control coffee plants and HS-treated coffee
149 received 6 mL of sterile PBS using the same method and at the same intervals as those of PGPB-
150 treated coffee plants. The volume of 6 mL for the application was determined in preliminary
151 tests, in which this volume was enough.

152

153 *Plant Growth.* The shoots and roots of 10 control, HS-, PGPB- and HS+PGPB-treated coffee
154 plants were measured to assess the promotion of plant growth by the biostimulant treatments.
155 The shoots and roots were cut, washed with tap water to remove the soil, left to dry in room

156 conditions for 12 h and placed in paper bags (24 cm x 13 cm). The plant material was then
157 baked at 40 ° C for 48 h. The dry main root, secondary roots, and shoot were weighted separately
158 in an analytical balance (Marte AY220, Marte Balanças e Equipamentos de Precisão Ltda.
159 Santa Rita do Sapucaí, Brazil), and the lengths of the stem and main roots were measured with
160 a tape measure.

161

162 *Chlorophyll and carotenoid content.* The effect of HS, PGPB and HS+PGPB treatments on the
163 chlorophyll and carotenoid content of coffee plants was assessed to identify the growth
164 potential. Two discs (1.0 cm in diameter) from the youngest expanded leaves of each control,
165 HS-, PGPB- and HS+PGPB-treated coffee plant were cut and inserted into a tube containing
166 10 mL of 80% acetone to extract the leaf pigments. The tubes were covered with aluminum foil
167 to prevent light exposure, which can degrade the material. After 24 h at 4°C, each sample was
168 placed in triplicate (200 µL each) in a microtiter plate. The absorbance of the samples was
169 evaluated in a spectrophotometer at wavelengths of 470, 645, 652 and 663 nm according to the
170 method of Scopel, Barbosa and Vieira (2011). The method to calculate the total chlorophyll,
171 chlorophyll *a* and *b*, is described in Li, Tang and Xu (2013).

172

173 *Resistance to insects.* The effect of HS, PGPB and HS+PGPB treatments on coffee resistance
174 against the white mealybug was assessed using host preference and performance bioassays in
175 the greenhouse. The host preference assay consisted of a choice assay, in which mealybugs
176 were simultaneously exposed to control, HS-, PGPB- and HS+PGPB-treated coffee plants. The
177 experimental unit consisted of a cage (50 cm x 50 cm), where four coffee plants (one per
178 treatment) were placed in the corners and equidistantly distributed. The plants were connected
179 with 4-cm-wide stripes made of black cardboard and 60 third-instar *P. minor* nymphs were
180 released in the centre (Supplementary Material 1). The countings of mealybugs on each plant
181 were performed at 24, 48 and 72 h after the release of the nymphs. The performance of *P. minor*
182 mealybugs in control, HS-, PGPB- and HS+PGPB-treated coffee plants was assessed in terms
183 of colony size, as described by Peñaflor et al. (2019). Each plant received 50 first-instar nymphs
184 and was individually caged with fine-mesh fabric to prevent insects from escaping
185 (Supplementary Material 1). Twenty days later, the total number of alive individuals, including
186 mealybug nymphs and adults, on each plant was registered. For both experiments, 15 replicates
187 were performed.

188

189 *Antioxidant metabolism enzymes.* The effect of HS, PGPB and HS+PGPB treatments on
190 antioxidant metabolism enzymes was assessed as potential causes of changes in plant tolerance
191 and resistance to stress. The youngest expanded leaf pair of three control, HS-, PGPB- and
192 HS+PGPB-treated coffee plants were collected, wrapped in an aluminum foil and flash frozen
193 in liquid nitrogen. Leaf samples with liquid nitrogen and polyvinylpyrrolidone (PVP) were
194 macerated in a mortar cooled in ice and stored at -86 ° C until extraction.

195 For the extraction of ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD), and
196 catalase (CAT) from plant material, 100 mg of each sample was homogenized; we then
197 followed the methodology described in Anjum et al. (2016) for APX, Del Longo et al. (1993)
198 for SOD, and Havir and McHale (1987) for CAT.

199

200 *Total phenolic content.* The effect of HS, PGPB, and HS+PGPB treatments on total phenolic
201 content was evaluated as potential causes to explain changes in plant resistance to insects. Total
202 phenolic compounds of eight treatments were evaluated for this experiment, which were:
203 undamaged and mealybug-damaged control, HS-, PGPB- and HS+PGPB-treated coffee plants.
204 To obtain mealybug-damaged coffee plants, 6-month-old plants of control, HS, PGPB and
205 HS+PGPB treatments were infested with 10 adult female mealybugs of *P. minor* carrying an
206 ovissac for 20 days before being used in the assay (Peñaflor et al., 2019). The youngest
207 expanded leaf pair of 10 plants from each treatment were removed, flash frozen in liquid
208 nitrogen, lyophilised, and ground in a mortar until a fine powder was obtained. Subsequently,
209 we followed the methodology proposed by Spanos and Wrolstad (1990).

210

211 *Statistical analysis.* Data normality was tested using the Shapiro-Wilk test. For data that met
212 these assumptions, ANOVA was performed and means were compared using Tukey's test with
213 5% probability. Otherwise, data were tested using a generalized linear model (GLM) with
214 *gamma* and *poisson* distribution for growth analysis, and *Gamma* distribution for chlorophyll
215 and carotenoid content e antioxidant system. Data of mealybug's host preference were analyzed
216 by GLM with negative binomial distribution, being the treatment as a fixed variable and time
217 as a random variable. The data of mealybug performance showed a quasibinomial distribution.
218 For the analysis of total phenolic compounds, linear mixed models (LMM) were used and then
219 the treatments were contrasted by the *Least squares Means* (LSM). In all tests, the statistical
220 software R was the main tool for analysis (University of Auckland, Auckland, New Zealand).

221

3. Results

Plant growth analysis. The use of HS or PGPB in coffee plants improved most growth traits; however, the combination of the two biostimulants did not improve any growth trait of the plant compared to the single use of biostimulants. PGPB treatment in coffee plants increased the biomass of secondary roots ($\chi^2=8.67$, $df=3$, $P<0.001$) and shoots ($\chi^2=19.89$, $df=3$, $P<0.001$), but did not alter the length of the shoot or the root compared to the control. On the other hand, HS treatment in coffee plants increased the length of both shoots ($\chi^2=31.32$, $df=3$, $P<0.001$) and roots ($\chi^2=16.43$, $df=3$, $P<0.001$), at the same time that it increased shoot biomass. No biostimulant treatment altered the biomass of the main root ($F=0.89$, $df=3$, $P=0.4571$). The combined treatment with HS and PGPB, in turn, increased all growth plant parameters compared to the control, except root length ($\chi^2=16.43$, $df=3$, $P<0.001$) and main root biomass, as mentioned above (Table 1).

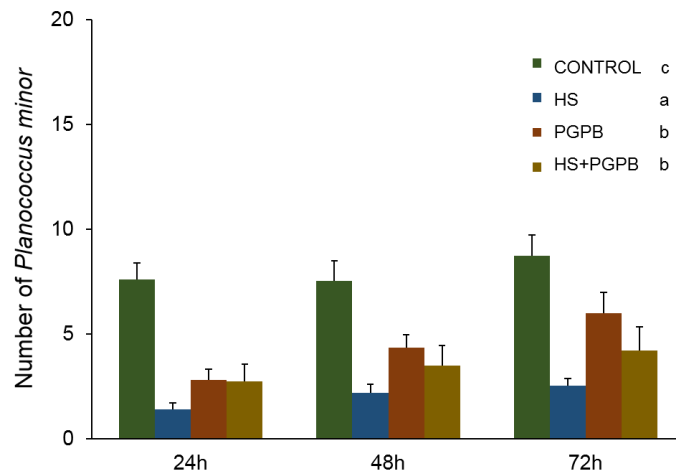
TABLE 1 Plant growth parameters (mean \pm SE) of untreated (control), humic substance-treated (HS), plant growth-promoting bacterium-treated (PGPB), or HS+PGPB-treated (HS+PGPB) coffee plants (*Coffea arabica*) (n=10)

Treatment	Weight (g)			Length (cm)	
	Main root	Secondary roots	Shoot	Main root	Shoot
Control	0.38 \pm 0.04	0.20 \pm 0.02 b	1.70 \pm 0.14 b	15.35 \pm 0.54 b	15.10 \pm 0.66 b
HS	0.43 \pm 0.04	0.31 \pm 0.06 ab	3.14 \pm 0.22 a	17.90 \pm 0.56 a	21.15 \pm 0.42 a
PGPB	0.51 \pm 0.05	0.31 \pm 0.05 a	2.77 \pm 0.22 a	14.50 \pm 0.77 b	17.45 \pm 0.89 b
HS+PGPB	0.47 \pm 0.04	0.38 \pm 0.07 a	2.95 \pm 0.21 a	16.20 \pm 0.39 ab	21.70 \pm 0.78 a
<i>p</i> -value	0,4571	< 0.1	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Values followed by different letters indicate significant differences according to Tukey's test ($p=0.05$)

Chlorophyll and carotenoid content. The use of biostimulants did not affect chlorophyll (*a*, *b* or total) nor carotenoids content (Supplementary Material 2).

Resistance to insects. Coffee plants treated with any of the biostimulant treatments were the least preferred hosts by white mealybugs during the time course (24-72h) ($\chi^2=98.961$, $df=3$, $P<0.001$) (Figure 1). Among the biostimulant treatments, HS-treated plants were the least preferred host by *P. minor* followed by PGPB- and HS+PGPB-treated plants compared to control coffee plants. PGPB- and HS+PGPB-treated plants were equally selected by white mealybugs.



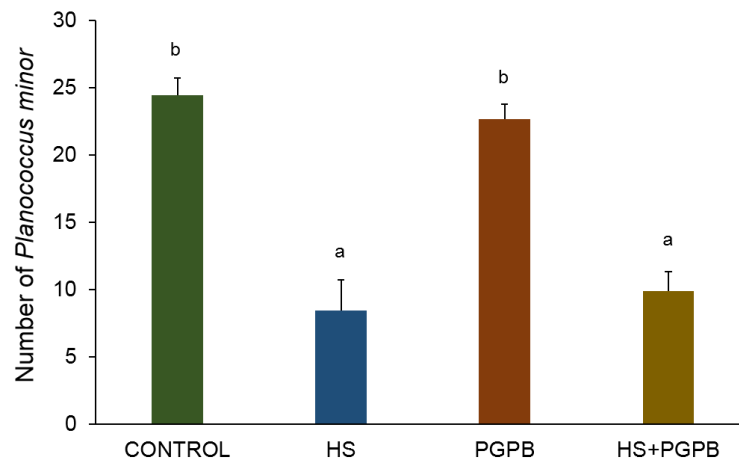
250

251 **FIGURE 1** Host preference of *Planococcus minor* third-instar nymphs to untreated (control), humic
 252 substance-treated (HS), plant growth-promoting bacterium-treated (PGPB), or HS+PGPB-treated
 253 (HS+PGPB) coffee plants (*Coffea arabica*) (n=15). Treatment name followed by different letters
 254 indicate significant differences between treatments according to Tukey's test ($p=0.05$)

255

256 HS and HS + PGPB treated coffee plants were less suitable hosts for the growth of
 257 mealybug colonies compared to PGPB treated and control plants ($\chi^2=77.322$, $df=3$, $P<0.001$)
 258 (Figure 2). PGPB-treated and control plants were equally suitable hosts for the growth of white
 259 mealybug colonies.

260



261

262 **FIGURE 2** *Planococcus minor* performance in untreated (control), humic substance-treated (HS), plant
 263 growth-promoting bacterium-treated (PGPB), or HS+PGPB-treated (HS+PGPB) coffee plants (*Coffea*
 264 *arabica*) (n=15). Bars with different letters indicate significant differences between treatments
 265 according to Tukey's test ($p=0.05$)

266

267 *Constitutive antioxidant enzymes.* HS- and HS+PGPB-treated coffee plants presented greater
 268 activity of APX and SOD enzymes compared to control and PGPB-treated plants (APX:
 269 $F=34.25$, $df=3$, $P<0.001$; SOD: $F=134.37$, $df=3$, $P<0.001$) (Table 2). The control and PGPB-

270 treated plants had similar levels of APX and SOD activities. On the other hand, PGPB-treated
 271 coffee plants showed the highest CAT activity, followed by HS-treated and HS+PGPB-treated
 272 plants. The HS+PGPB treated, and control plants presented similar levels of CAT activity
 273 ($F=183.17$, $df=3$, $P<0.001$) (Table 2).

274

275 **TABLE 2** Activity of antioxidant enzymes (mean \pm SE) of untreated (control), humic substance-treated
 276 (HS), plant growth-promoting bacterium-treated (PGPB), or HS+PGPB-treated (HS+PGPB) coffee
 277 plants (*Coffea arabica*) (n=3).

Treatment	APX Activity (mmol ASA.gFM ⁻¹ .min ⁻¹)	SOD Activity (U SOD.min ⁻¹ .gFM ⁻¹)	CAT Activity (mmol H ₂ O ₂ .min ⁻¹ .gFM ⁻¹)
Control	3.51 \pm 8.82E-07 b	94.8 \pm 0,773 b	1.37 \pm 4.93E-08 c
HS	7.00 \pm 2.46E-07 a	113.5 \pm 0,941 a	2.08 \pm 1.26E-07 b
PGPB	3.09 \pm 3.33E-07 b	90.7 \pm 1,531 b	4.91 \pm 2.81E-09 a
HS+PGPB	5.93 \pm 3.32E-07 a	109.5 \pm 2,472 a	1.33 \pm 6.74E-08 c
<i>p</i> -value	< 0.001	< 0.001	< 0.001

278 APX= Ascorbate Peroxidase; SOD= Superoxide Dismutase; CAT= Catalase; ASA= Ascorbic Acid; H₂O₂=
 279 Hydrogen Peroxide; FM= Fresh Mass. Means followed by the different letters indicate significant difference
 280 between treatments according to Tukey's test ($p=0.05$)

281

282 *Total phenolic compounds.* All biostimulant treatments resulted in higher levels of constitutive
 283 total phenolic compounds in coffee plants compared to control plants ($F=13.549$, $df=3$,
 284 $P<0.001$) (Table 3). After mealybug herbivory, only PGPB- and HS+PGPB treated plants had
 285 elevated levels of total phenolic compounds compared to control plants ($F=4.545$, $df=3$,
 286 $P=0.032$).

287

288 **TABLE 3** Levels of constitutive and herbivore-induced total phenolic compounds (mean \pm SE μ g/mg
 289 of dry plant tissue) of untreated (control), humic substance-treated (HS), plant growth-promoting
 290 bacteria-treated (PGPB), or HS+PGPB-treated (HS+PGPB) coffee plants (*Coffea arabica*) (n=10).

Treatment	Constitutive total phenolic compounds	Mealybug-damaged total phenolic compounds
Control	6.40 \pm 0.06 b	6.65 \pm 0.21 b
HS	6.92 \pm 0.08 a	7.49 \pm 0.45 ab
PGPB	6.99 \pm 0.14 a	7.09 \pm 0.18 a
HS+PGPB	7.12 \pm 0.13 a	7.29 \pm 0.13 a
<i>p</i> -value	< 0.001	0.032

291 Different letters within the column indicates significant difference between treatments according to LSM
 292 ($p=0.05$)

293

294 4. Discussion

295 The use of biostimulants is a promising approach to enhance plant productivity while
296 reducing the environmental impact caused by agriculture and climate change. Although they
297 are recommended to promote plant growth and increase plant tolerance to abiotic stresses
298 (Bektas & Eulgem, 2015; Du Jardin, 2012; Walters & Heil, 2007), biostimulants can also confer
299 resistance of plants to pathogens and pests. While the influence plant-growth promoting
300 bacteria or rhizobacteria (PGPB or PGPR) on plant resistance to insects has been well-
301 characterized, only a few studies have investigated how humic-like substances can affect plant
302 resistance to biotic stressors (Pereira et al. 2021; Silva et al. 2021). Furthermore, HS can
303 enhance colonization of bacterial inoculants through multiple mechanisms and the interaction
304 of the two biostimulants can act synergistically in plant growth promotion and tolerance to
305 abiotic stresses (Olivares et al. 2017; Silva et al. 2021). However, little is known about the
306 benefits and mechanisms of the combination of HS and PGPB in plant resistance to stresses,
307 particularly those caused by insect infestations (Pereira et al., 2021; Silva et al., 2021).

308 Here, we addressed how treatment with HS and PGPB separately or in combination
309 affects plant growth and resistance to the white mealybug in coffee plant. First, we confirmed
310 that treatment with HS or/and PGPB promoted some kind of plant growth in coffee seedlings.
311 Although all biostimulant treatments stimulated greater shoot biomass, treatment with PGPB
312 separately or in combination with HS also promoted greater secondary root biomass. Promotion
313 of shoot and root growth in coffee by *E. tabaci* appears to be not associated with stimulation of
314 oxidative metabolism, as inoculation inhibited the antioxidative enzyme CAT and did not alter
315 APX or SOD levels, but due to its ability to fix biological nitrogen, solubilize insoluble forms
316 of phosphates, and produce indol acetic acid (IAA) (Andrade, 2019), which plays an important
317 role in secondary root proliferation (Mohite, 2013).

318 Treatment with HS stimulated root elongation, but not growth of secondary root growth
319 in coffee plants, which is commonly reported effects of treatment with humic-like substances
320 (Canellas et al., 2002; Trevisan et al., 2011; Zandonadi, Canellas & Façanha, 2007). Both types
321 of root growth (lateral root and elongation) are regulated by modulation of oxidative
322 metabolism and changes in the hormonal network, but accumulation and distribution of
323 different ROS molecules in root regions (Dunand et al., 2007; Garcia et al., 2016, 2019; Ramos
324 et al., 2015). Here, we detected that HS treatment stimulated the activity of the antioxidant
325 enzymes APX, SOD, and CAT to prevent damage from ROS in HS-treated coffee plants even
326 after 5 to 6 months of HS application. Therefore, it is possible that the ongoing activity of
327 antioxidative metabolism will stimulate the development of lateral root growth and gain of root

328 dry mass later, or that the concentration of HS was not suitable to induce greater root growth
329 (Façanha et al., 2002; Muscolo et al., 2006).

330 Treatment with HS+PGPB enhanced most of the growth traits of coffee plants, expect
331 root elongation, which was exclusively observed in HS-treated coffee plants. Unlike HS-treated
332 coffee plants, HS+PGPB did not elevate the activity of the antioxidant enzyme CAT likely
333 because of the interaction with PGPB, which inhibited CAT activity. Furthermore, contrary to
334 our hypothesis, HS+PGPB did not result in a greater increase in any of the plant growth traits
335 evaluated here compared to treatment with HS or PGPB separately. Studies have shown that
336 the combined use of humic-like substances and beneficial bacteria does not often yield
337 synergistic effects on plant growth traits, which seems to vary according to the plant cultivar
338 and bacterial inoculant (Marques Júnior et al., 2008; Santos-Jiménez et al., 2022). Our results
339 suggest that HS and PGPB, when used in combination, act complementary for most of the plant
340 growth traits evaluated here, but further research may elucidate why the addition of PGPB
341 inhibited the effect of HS in root elongation of coffee plants.

342 Given that HS and PGPB enhance plant nutrition and modulate several regulatory and
343 functional processes in plants (Shah et al., 2018; Timmusk et al., 2017), their use often affects
344 the profile of secondary metabolites with potential consequences for plant-insect interactions
345 in agroecosystems (Baldotto & Baldotto, 2014; Canellas et al., 2015; Razmjou et al., 2011;
346 Schiavon et al., 2010; Wong et al., 2020). We found that treatment with any of the biostimulants
347 reduced colonization of coffee plants by the white mealybug, but HS-treated plants were the
348 least preferred hosts among all treatments. Treatments with HS, either alone or in combination
349 with PGPB, were poor hosts to the mealybug as their colonies were smaller after 20 days in
350 plants of these treatments. However, PGPB alone did not influence mealybug performance.
351 Although we expected that PGPB treatment would reduce insect performance (Dorta et al.,
352 2020; Rashid et al., 2017), it did not affect it, as shown for other study systems (Brock et al.,
353 2018; Herman et al., 2008). Therefore, HS and PGPB, alone or in combination, increased plant
354 resistance to insects, but treatment with HS alone was the best way to reduce colonization and
355 establishment of the white mealybug.

356 It is known that HS or PGPB can increase the synthesis of phenolic compounds in plants,
357 but its activity has been mainly attributed to resistance to pathogens (Choudhary et al., 2016;
358 Jindo et al., 2020) even though it plays an important defensive role against a variety of insects,
359 including white mealybugs (Apriliyani et al. 2016; Chen et al. 2022; Delvas et al., 2011; Macel
360 et al., 2019; Movva & Pathipati, 2017). Here, coffee plants treated with any of the biostimulants

361 had increased levels of phenolic compounds compared to control plants, which coincided with
362 the avoidance of these treatments by white mealybugs in preference assays. These results
363 indicate that phenolic compounds likely mediate the non-preference resistance of biostimulant-
364 treated coffee plants to *P. minor*. The total content of phenolic compounds of coffee plants after
365 mealybug infestation was up-regulated as expected (Nagrare et al., 2017). However, unlike the
366 PGPB and HS+PGPB treatments that presented a higher herbivore-induced content of phenolic
367 compounds compared to the control, the HS-treated plants had induced levels of total content
368 of phenolic compounds similar to the control and other treatments. This result can be due to the
369 mealybug infestation in HS-treated plants, which was on average 65% lower compared to
370 control plants, likely reflecting a weaker induction of phenolic compounds. In contrast, HS-
371 treated plants had the highest CAT activity among treatments, which is an antioxidant enzyme
372 that can be responsible for the expression of induced defenses against sucking insects (Zhao et
373 al., 2016). Therefore, we suggest that not only are phenolic compounds involved in the
374 resistance of coffee to white mealybug, but also increased activity of antioxidant enzymes.

375 Maintaining active antioxidant enzymes, such as APX, SOD, and CAT, is an important
376 factor for plants to mitigate oxidative stress and avoid cell damage by ROS (Cadenas, 1989;
377 Fridovich, 1978; Nascimento & Barrigossi, 2014; Schaich & Borg, 1988). Herbivory causes
378 ROS accumulation in plants, and the balance between ROS generation and scavenging by
379 antioxidant enzymes plays an important role in the induction of plant defense responses (Erb &
380 Reymond, 2019; Kerchev et al., 2012). In our study, HS applied separately or in combination
381 with PGPB increased antioxidant metabolism, likely contributing to a faster defense response
382 against insect herbivory (Akladios & Mohamed, 2018; Hamza & Suggars, 2001; Schiavon et
383 al., 2010; Zhang & Schmidt, 2000). On the contrary, PGPB-treated plants, which were less
384 resistant than those treated with HS, had inhibited CAT activity compared to control plants.
385 This effect in CAT activity is known for plants infected with pathogenic bacteria (Hendges,
386 2015; Resende, Salgado & Chaves, 2003), but it has also been detected in healthy plants
387 colonized by non-pathogenic bacteria, such as PGPB (Fatnassi et al., 2015). Inhibition of CAT
388 activity leads to elevated levels of H₂O₂, which are important signals for SAR activation (Chen,
389 Silva & Klessig, 1993), a defense-priming process that improves plant defense against
390 pathogens but can eventually confer resistance against insects (Conrath et al., 2015; Rostás &
391 Turlings, 2008).

392 In summary, HS applied separately or in combination with PGPB not only promoted the
393 growth of coffee shoots and roots but also conferred resistance to the mealybug pest *P. minor*.

394 In turn, PGPB treatment promoted only root growth in coffee plants and a lower level of
 395 resistance to *P. minor* than when associated with HS. Our results do not support the hypothesis
 396 that a combination of HS with PGPB would produce a synergistic effect on plant growth and
 397 resistance. HS, when applied in combination with PGPB, appears to play a dominant role in the
 398 effect on insect performance and antioxidant enzyme activity. In addition to the greater
 399 accumulation of phenolic compounds accompanied by increased levels of antioxidant enzymes
 400 in HS-treated coffee plants, HS can also interact positively with the JA signaling pathway
 401 (Canellas et al., 2020; De Hita et al., 2020), which is another layer of regulation of induced
 402 plant defense against insects and has yet to be investigated. Our study contributes to filling an
 403 important knowledge gap on the underlying mechanisms by which humic-like substances
 404 enhance plant resistance against insect pests, as highlighted in the meta-analysis by Silva and
 405 Canellas (2022).

406

407 **Acknowledgements**

408 We thank Dr. Paulo Santos Pompeu, Dr. Felipe Rodrigues and Dra. Tharin for technical
 409 assistance and support in the experiments. To Ernesto Prado for identifying one of the
 410 specimens used. To the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
 411 (CNPq) for funding the research project “Bactérias endofíticas como indutoras de resistência e
 412 tolerância a estresses bióticos e abióticos em mudas de *Coffea arabica* L.” No. 28/2018. To the
 413 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Financing Code
 414 001 for granting the scholarship. And to the Empresa Solohumics Fertilizantes (Alcobaça, BA,
 415 Brazil) for contributing with the supply of the product Solohumics-solo®.

416

417 **References**

418 Aguiar, NO et al. (2018). Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by
 419 endophytic diazotrophic bacteria and humic acids. *PeerJ*, 6, e5445.
 420 <https://doi.org/10.7717/peerj.5445>

421

422 Akladios, SA & Mohamed, HI (2018). Ameliorative effects of calcium nitrate and humic
 423 acid on the growth, yield component and biochemical attribute of pepper (*Capsicum annuum*)
 424 plants grown under salt stress. *Scientia Horticulturae*, 236, 244-250.
 425 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.047>

426

427 Andrade, PHM (2019). *Análise da diversidade genética e potencial biotecnológico da*
 428 *comunidade bacteriana associada ao Coffea arabica L. de cultivo convencional e orgânico.*
 429 Tese: Universidade Federal de São Carlos, 187 p.

430

- 431 Anjum, NA et al. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase representative H₂O₂-detoxifying
432 heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 19002-19029.
433 <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>
- 434 Apriliyani, A., Nukmal, N. & Rosa, E (2016). Development of botanical insecticide from
435 flavonoid of compound leaf extract *gliricidia maculate* to control coffee mealybug
436 *Planococcus citri*. *Institute Research and Community Service the University of Lampung*,
437 197-204.
438
- 439 Aristizábal, MV, Gómez PÁ & Cardona ACA (2015). Biorefineries based on coffee cut-stems
440 and sugarcane bagasse: furan-based compounds and alkanes as interesting products.
441 *Bioresour Technol*, 196, 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.057>
442
- 443 Avelino, J et al. (2007). Topography and crop management are key factors for the
444 development of American leaf spot epidemics on coffee in Costa Rica. *Phytopathology*,
445 97:12, 1532-1542. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-12-1532>
446
- 447 Baldotto, LEB et al. (2010). Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro
448 cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34, 349-360.
449 <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000200008>
450
- 451 Baldotto, LEB & Baldotto, MA (2014). Adventitious rooting on the Brazilian red-cloak and
452 *sanchezia* after application of indole-butyric and humic acids. *Horticultura Brasileira*, 32:4,
453 434-439. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620140000400010>
454
- 455 Basu, S et al. (2016). Plant adaptation to drought stress. *Research*, 5.
456 <https://doi.org/10.12688/f1000research.7678.1>
457
- 458 Bektas, Y & Eulgem, T (2015). Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in plant science*, 5,
459 804. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00804>
460
- 461 Berbehenn RV & Martin MM (1994). Tannin sensitivity in larvae of *Malacosoma*
462 *disstria* (Lepidoptera): roles of the peritrophic envelope and midgut oxidation. *J Chem Ecol*
463 20:8, 1985–2001 <https://doi.org/10.1007/BF02066238>
464
- 465 Bezemer, TM & Van Dam, NM (2005) Linking aboveground and belowground interactions
466 via induced plant defenses. *Trends in Ecology & Evolution*, 20:11, 617–624.
467 <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.08.006>
468
- 469 Brock, DA et al. (2018). Diversity of free-living environmental bacteria and their interactions
470 with a bacterivorous amoeba. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 411.
471 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00411>
472
- 473 Brown, P & Saa, S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Frontiers in plant science*, 6, 671.
474 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00411>
475
- 476 Bulgarelli, D et al. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of
477 plants. *Annual review of plant biology*, 64, 807-838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
478
479

- 480 Cadenas, E (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry*, 58:1, 79-
481 110. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.000455>
482
- 483 Calvo, P., Nelson, L. & Kloepper, JW (2014) Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant*
484 *and soil*, 383:2, 3-41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
485
- 486 Canellas, LP & Olivares, FL (2014). Physiological responses to humic
487 substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in*
488 *Agriculture*, 1, 1–11. <https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>
489
- 490 Canellas, LP et al. (2002). Humic acids isolated from earthworm compost enhance root
491 elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots.
492 *Plant Physiol.*, 130, 1951-1957. <https://doi.org/10.1104/pp.007088>
493
- 494 Canellas, LP et al. (2015). Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture, *Scientia*
495 *Hosticulturae*, 196, 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>
496
- 497 Canellas, LP et al. (2020). Plant chemical priming by humic acids. *Chem. Biol. Technol.*
498 *Agric.*, 7, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00178-4>
499
- 500 Chen, Q et al. (2022). Resistant cassava cultivars inhibit the papaya mealybug *Paracoccus*
501 *marginatus* population based on their interaction: from physiological and biochemical
502 perspectives. *Journal of Pest Science*, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s10340-022-01550-z>
503
- 504 Chen, Z., Silva, H., & Klessig, DF (1993). Active oxygen species in the induction of plant
505 systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262:5141, 1883-1886.
506 <https://doi.org/10.1126/science.8266079>
507
- 508 Choudhary, DK et al. (2016). Bacterial-mediated tolerance and resistance to plants under
509 abiotic and biotic stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35:1, 276-300.
510 <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9521-x>
511
- 512 Conrath, U et al. (2015). Priming for enhanced defense. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 53, 97–119.
513 <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>
514
- 515 De Hita, D et al. (2020). Discriminating the short-term action of root and foliar application of
516 humic acids on plant growth: emerging role of jasmonic acid. *Front. Plant Sci.*, 11, 493.
517 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00493>
518
- 519 Del Longo, OT et al. (1993). Antioxidant Defences under Hyperoxygenic and Hyperosmotic
520 Conditions in Leaves of Two Lines of Maize with Differential Sensitivity to Drought. *Plant*
521 *and Cell Physiology*, 34, 1023-1028. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078515%J>.
522
- 523 Delvas, N et al. (2011). Phenolic compounds that confer resistance to spruce
524 budworm. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 141:1, 35-44.
525 <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01161.x>
526
- 527 Demidchik, V et al. (2014). Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable
528 channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of*
529 *experimental botany*, 65:5, 1259-1270. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru004>

- 530
531 Dias, AS (2018). Trocas gasosas e eficiência fotoquímica do gergelim sob estresse salino e
532 adubação com nitrato-amônio. *Irriga*, 23:2, 220- 234.
533 <https://doi.org/10.15809/irriga.2018v23n2p220-234>
534
- 535 Dicke, M (2009). Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant*
536 *Cell Environ*, 32:4, 654–665. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01913.x>
537
- 538 Dorta, D et al. (2020). Bactérias isoladas de sedimento de manguezal om potencial de
539 biorremediação de contaminações causadas por produtos derivados de petróleo. *Enciclopedia*
540 *Biosfera*, 17, 34. https://doi.org/10.18677/EnciBio_2020D6
541
- 542 Du Jardin, P (2012). The Science of Plant Biostimulants—A bibliographic analysis, *Ad hoc*
543 *study report.*, 12-29.
544
- 545 Du Jardin, P (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation.
546 *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
547
- 548 Dunand, C., Crèvecoeur, M. & Penel, C (2007). Distribution of superoxide and hydrogen
549 peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction
550 with peroxidases. *New Phytologist*, 174:2, 332-341. [https://doi.org/10.1111/j.1469-](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01995.x)
551 [8137.2007.01995.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01995.x)
552
- 553 Erb, M. & Reymond, P (2019). Molecular interactions between plants and insect
554 herbivores. *Annual review of plant biology*, 70, 527-557. [https://doi.org/10.1146/annurev-](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095910)
555 [arplant-050718-095910](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095910)
556
- 557 Façanha, AR et al. (2002). Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento
558 radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária*
559 *Brasileira*, 37, 1301-1310. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2002000900014>
560
- 561 Fatnassi, IC (2015). Impact of dual inoculation with Rhizobium and PGPR on growth and
562 antioxidant status of *Vicia faba* L. under copper stress. *Comptes rendus biologies*, 338:4, 241-
563 254. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2015.02.001>
564
- 565 Fornazier, MJ., Santa-Cecília, LVC & Martins, DS (2009). *Cochonilhas-farinhentas*
566 *associadas ao Café Conilon*. Tecnologias para produção do café conilon.
567
- 568 Fridovich, I (1978). The biology of oxygen radicals: the superoxide radical is an agent of
569 oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense. *Science*, 201:4359,
570 875-880. <https://doi.org/10.1126/science.210504>
571
- 572 Garcia, AC et al. (2016) Involvement of Hormone- and ROS-Signaling Pathways in the
573 Beneficial Action of Humic Substances on Plants Growing under Normal and Stressing
574 Conditions", *BioMed Research International*, 374:71, 13-18.
575 <https://doi.org/10.1155/2016/3747501>
576

- 577 García, AC et al. (2019). Structure–property–function relationship of humic substances in
 578 modulating the root growth of plants: A review. *Journal of Environmental Quality*, 48:6,
 579 1622-1632. <https://doi.org/10.2134/jeq2019.01.0027>
 580
- 581 Hamza, B & Suggars, A. (2001). Biostimulants: myths and realities. *TurfGrass Trends*, 8, 6-
 582 10.
 583
- 584 Havir, EA & McHale, NA (1987). Biochemical and developmental characterization of
 585 multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84:2, 450–455.
 586 <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
 587
- 588 He, J et al. (2011). Chrysanthemum leaf epidermal surface morphology and antioxidant and
 589 defense enzyme activity in response to aphid infestation. *Journal of plant physiology*, 168:7,
 590 687-693. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.10.009>
 591
- 592 Hendges, FB (2015). *Efeito antioxidante da bactéria Herbaspirillum seropedicae associada a*
 593 *genótipo de trigo submetido ao déficit hídrico e fertilização nitrogenada*. Dissertação
 594 (Mestrado em Agronomia): Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 63p.
 595
- 596 Herman, M., Nault, B & Smart, C (2008). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on
 597 bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Protect.* 27,
 598 996–1002. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.12.004>
 599
- 600 ICO- International Coffee Organization (2022). Retrieved from:
 601 <<https://www.ico.org/documents/cy2022-23/cmr-1222-p.pdf>>. Access at: 20 december 2022.
 602
- 603 Jary-Jahed, M et al. (2020). Bottom-up effects of organic fertilizers on *Plutella xylostella* (l)
 604 with selected cruciferous crop plants. *The Journal of the Lepidopterists' Society*, 74:1, 7-17.
 605 <https://doi.org/10.18473/lepi.74i1.a2>
 606
- 607 Jindo, K et al. (2020). From lab to field: Role of humic substances under open-field and
 608 greenhouse conditions as biostimulant and biocontrol agent. *Frontiers in Plant Science*, 11:1,
 609 11-27. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00426>
 610
- 611 Jung, HW et al. (2009). Priming na imunidade sistêmica de plantas. *Ciência*, 324:5923, 89-
 612 91. <https://doi.org/10.1126/science.1170025>
 613
- 614 Kalaji, HM et al. (2018). Prompt chlorophyll fluorescence as a tool for crop phenotyping: an
 615 example of barley landraces exposed to various abiotic stress factors. *Photosynthetica*, 56:3,
 616 953-961. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0766-z>
 617
- 618 Karban, R et al. (2000). Communication between plants: induced resistance in wild tobacco
 619 plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia*, 125, 66-71.
 620 <https://doi.org/10.1007/PL00008892>
 621
- 622 Kerchev, PI (2012). Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis,
 623 reactive oxygen species and hormonal signalling pathways. *Plant, cell & environment*, 35:2,
 624 441-453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02399.x>
 625

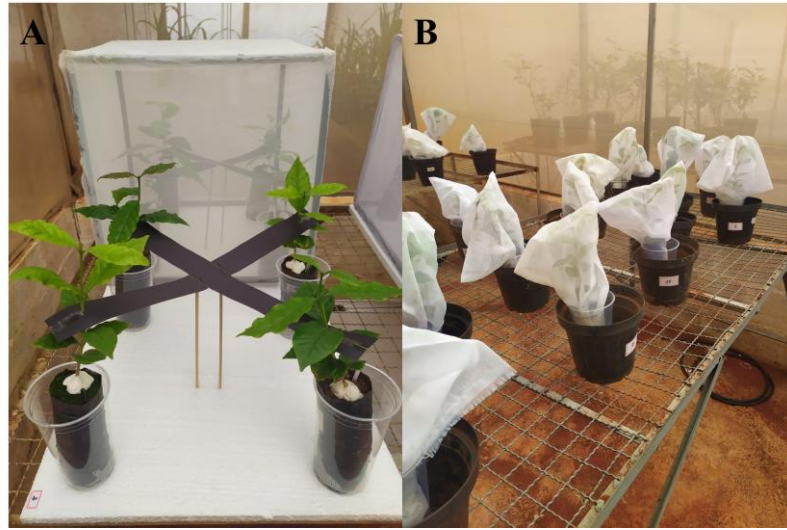
- 626 Li, H., Tang, C & Xu, Z (2013). The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica*
627 *napus* L.) plantlet growth and morphogenesis in vitro. *Scientia Horticulturae*, 150, 117-124.
628 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.10.009>
629
- 630 Macel, M et al. (2019). Metabolomics of thrips resistance in pepper (*Capsicum* spp.) reveals
631 monomer and dimer acyclic diterpene glycosides as potential chemical defenses. *Journal of*
632 *Chemical Ecology*, 45, 490-501. <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01074-4>
633
- 634 Marques Júnior, RB et al. (2008). Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-
635 açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Revista*
636 *Brasileira de Ciência do Solo*, 32, 1121-1128. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000300020)
637 [06832008000300020](https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000300020)
638
- 639 Medeiros, RVV & Rodrigues, PMA (2017) A economia cafeeira no Brasil e a importância das
640 inovações para essa cadeia. *A Economia em Revista-AERE*, 25: 1, 1-12.
641 <https://doi.org/10.4025/aere.v25i1.35511>
642
- 643 Mhatre, PH et al. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential
644 alternative tool for nematodes biocontrol. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 17,
645 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.009>
646
- 647 Mohamadi, P et al. (2017). Population growth parameters of *Tuta absoluta* (Lepidoptera:
648 Gelechiidae) on tomato plant using organic substrate and biofertilizers. *Journal of Insect*
649 *Science*, 17:2, 29-36. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iex011>
650
- 651 Mohite, B (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing
652 bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of soil science and*
653 *plant nutrition*, 13:3, 638-649. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>
654
- 655 Movva, V & Pathipati, UR (2017). Feeding-induced phenol production in *Capsicum annum*
656 L. influences *Spodoptera litura* F. larval growth and physiology. *Archives of Insect*
657 *Biochemistry and Physiology*, 95:1, e21387. <https://doi.org/10.1002/arch.21387>
658
- 659 Muscolo, A et al. (2007). The auxin-like activity of humic substances is related to membrane
660 interactions in carrot cell cultures. *Journal of Chemical Ecology*, 33:1, 115-129.
661 <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9206-9>
662
- 663 Nagrare, VS (2017). Biochemical changes in cotton plants due to infestation by cotton
664 mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Applied*
665 *and Natural Science*, 9:1, 382-388. <https://doi.org/10.31018/jans.v9i1.1200>
666
- 667 Nasab, R (2019). Effects of humic acid and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on
668 induced resistance of canola to *Brevicoryne brassicae* L. *Bulletin of entomological research*,
669 109:4, 479-489. <https://doi.org/10.1017/S0007485318000779>
670
- 671 Nascimento, J & Barrigossi, JA (2014). O papel das enzimas antioxidantes na defesa das
672 plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. *Agrarian Academy*, 12:1, 235-251.
673

- 674 Olivares, FL et al. (2017). Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop
675 promotion and mechanisms of action. *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 4, 30-39.
676 <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0112-x>
677
- 678 Olivares, FL et al. (2015). Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant
679 growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic
680 tomatoes. *Scientia Horticulturae*, 183, p. 100-108.
681 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.012>
682
- 683 Pantoja-Gomez, LM et al. (2019). Common origin of Brazilian and Colombian populations of
684 the neotropical coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Journal of*
685 *economic entomology*, 112:2, 924-931. <https://doi.org/10.1093/jee/toy416>
686
- 687 Passos, RR et al. (2007). Substâncias húmicas, atividade microbiana e carbono orgânico lábil
688 em agregados de um Latossolo Vermelho distrófico sob duas coberturas vegetais. *Revista*
689 *Brasileira de Ciência do solo*, 31, 1119-1129. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-06832007000500027)
690 [06832007000500027](https://doi.org/10.1590/S0100-06832007000500027)
691
- 692 Penaflor, MFGV et al. (2019). Interactions between white mealybugs and red spider mites
693 sequentially colonizing coffee plants. *Journal of Applied Entomology*, 143:9, 957-963.
694 <https://doi.org/10.1111/jen.12683>
695
- 696 Pereira, RV (2021). The Effects of Biostimulants on Induced Plant Defense. *Frontiers in*
697 *Agronomy*, 3, 630596. <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.630596>
698
- 699 Quadt-Hallmann, A., Kloepper, JW & Benhamou, N. (1997). Bacterial endophytes in cotton:
700 mechanisms of entering the plant. *Canadian journal of microbiology*, 43:6, 577-582.
701 <https://doi.org/10.1139/m97-08>
702
- 703 R Core Team (2023). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation
704 for Statistical Computing, University of Auckland, Auckland, Nova Zelândia.
705
- 706 Ramos, AC et al. (2015). Humic matter elicits proton and calcium fluxes and signaling
707 dependent on Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) at early stages of lateral plant root
708 development. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2:1, 1-12.
709 <https://doi.org/10.1186/s40538-014-0030-0>
710
- 711 Rashid, M et al. (2017). Induction of systemic resistance against aphids by endophytic
712 *Bacillus velezensis* YC7010 via expressing phytoalexin deficient4 in arabidopsis. *Front. Plant*
713 *Sci.* 8:211, 14-32. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00211>
714
- 715 Razmjou, J., Mohammadi, M & Hassanpour, M (2011). Effect of vermicompost and
716 cucumber cultivar on population growth attributes of the *Melon aphid* (Hemiptera:
717 *Aphididae*). *J. Econ. Entomol.*, 104, 1379-1383. <https://doi.org/10.1603/EC10120>
718
- 719 Resende, MLV, Salgado, SML & Chaves, ZM (2003). Espécies ativas de oxigênio na resposta
720 de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, 28:2, 123-130.
721 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582003000200001>
722

- 723 Rodrigues, LFOS et al. (2014). Características agronômicas do trigo em função de
724 *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. *Revista*
725 *Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 18:1, 21-37. [https://doi.org/10.1590/S1415-](https://doi.org/10.1590/S1415-43662014000100005)
726 43662014000100005
727
- 728 Rose, MT et al. (2014). A meta-analysis and review of plant-growth response to humic
729 substances: practical implications for agriculture. *Advances in agronomy*, 124, 37-89.
730 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800138-7.00002-4>
731
- 732 Rostás, M & Turlings, TC (2008). Induction of systemic acquired resistance in *Zea mays* also
733 enhances the plant's attractiveness to parasitoids. *Biological Control*, 46:2, 178-186.
734 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.04.012>
735
- 736 Santa-Cecília, LVC et al. (2009). Desenvolvimento de *Planococcus citri* (Risso, 1813)
737 (Hemiptera: Pseudococcidae) em cafeeiros. *Acta Scientiarum*, 31:1, 13-15.
738 <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v31i1.6603>
739
- 740 Santa-Cecília, LVC & Silva, KH (2020). Interaction between mealybugs (Pseudococcidae)
741 and coffee plants. *Coffee Science*, 15, e151695. <https://doi.org/10.25186/.v15i.1695>
742
- 743 Santa-Cecília, LVC., Prado, E & Oliveira, MS (2013). Sobre o condicionamento alimentar na
744 cochonilha-branca, *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae). *Revista*
745 *Brasileira de Fruticultura*, 35:1, 86-92. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000100011>
746
- 747 Santa-Cecília, LVC & Souza, B (2014). Cochonilhas-farinhentas de maior ocorrência em
748 cafeeiros no Brasil. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, 35:280, 45-54.
749
- 750 Santos-Jiménez, JL et al. (2022). Passion fruit plants treated with biostimulants induce
751 defense-related and phytohormone-associated genes. *Plant Gene*, 30, 100357.
752 <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2022.100357>
753
- 754 Schaich, KM & Borg, DC (1988). Fenton reactions in lipid phases. *Lipids*, 23:6, 570-579.
755 <https://doi.org/10.1007/BF02535600>
756
- 757 Schiavon M et al. (2010). High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid
758 metabolism in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 36:6, 662-669.
759 <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9790-6>
760
- 761 Schoohoven, LM., Van Loon, JJA & Dicke, M (2005). *Insect-plant biology*. Oxford:
762 University Press on Demand, 421 p.
763
- 764 Scopel, W., Barbosa, JZ & Vieira, ML (2011). Extração de pigmentos foliares em plantas de
765 canola. *Unoesc & Ciência-ACET*, 2:1, 87-94.
766
- 767 Shah, ZH et al. (2018). Humic substances: Determining potential molecular regulatory
768 processes in plants. *Frontiers in plant science*, 9, 263. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00263>
769
- 770 Silva, RM & Canellas, LP (2022). Organic matter in the pest and plant disease control: a
771 meta-analysis. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 9:1, 70-79.
772 <https://doi.org/10.1186/s40538-022-00332-0>

- 773
774 Silva, MSRDA et al. (2021). Humic Substances in Combination with Plant Growth-
775 Promoting Bacteria as an Alternative for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*,
776 18, 3025. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.719653>
777
- 778 Song, X et al. (2015). Interaction matters synergy between vermicompost and PGPR agents
779 improves soil quality, crop quality and crop yield in the field. *Appl. Soil Ecol.*, 89, 25-34.
780 <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.01.005>
781
- 782 Spanos, GA & Wrolstad, RE (1990). Influence of processing and storage on the phenolic
783 composition of thompson seedless grape juice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*,
784 38, 1565–1571. <https://doi.org/10.1021/jf00097a030>
785
- 786 Timmusk, S et al. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop
787 improvement. *Frontiers in plant science*, 8, 49-64. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>
788
- 789 Trevisan, S et al. (2011). Humic substances affect *Arabidopsis* physiology by altering the
790 expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environ. Exp.*
791 *Bot.*, 74, 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.04.017>
792
- 793 Walters, D & Heil, M (2007). Costs and trade-offs associated with induced resistance.
794 *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 71, 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.09.008>
795
- 796 War, AR et al. (2012). Behavior mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant*
797 *Signaling & Behavior*, 7:10, 1306–1320. <https://doi.org/10.4161/psb.21663>
798
- 799 Wong, WS et al. (2020). Plant biostimulants in vermicomposts: characteristics and plausible
800 mechanisms *The Chemical Biology of Plant Biostimulants*, 12, 155-180.
801 <https://doi.org/10.1002/9781119357254.ch6>
802
- 803 Yakhin, OI et al. (2017). Bioestimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in*
804 *plant science*, 7, 2049. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>
805
- 806 Zandonadi, DB., Canellas, LP & Façanha, AR (2007). Indolacetic and humic acids induce
807 lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps
808 activation. *Planta*, 225, 1583-1595. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0454-2>
809
- 810 Zhang, X & Schmidt, RE (2000). Hormone-containing products' impact on antioxidant status
811 of tall fescue and creeping bentgrass subjected to drought. *Crop science*, 40:5, 1344-1349.
812 <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4051344x>
813
- 814 Zhao, H et al. (2016). Antioxidant enzyme responses induced by whiteflies in tobacco plants
815 in defense against aphids: catalase may play a dominant role. *PLoS One*, 11:10, e0165454.
816 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165454>
817

818 **Supplementary Material**



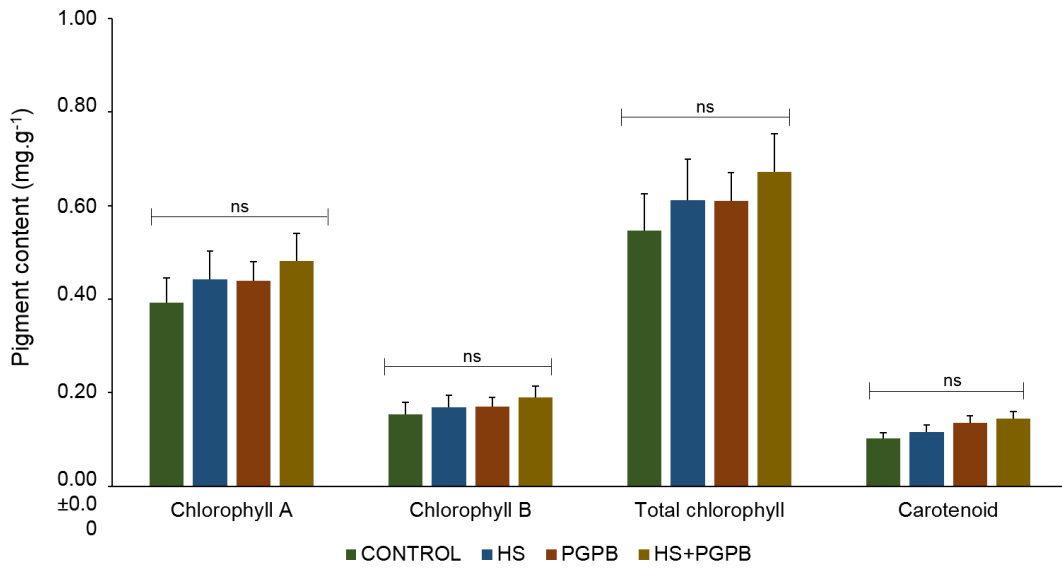
819

820 **Supplementary Material 1** Resistance bioassays against the mealybug *Planococcus minor* (A) Arena
 821 used in the host choice test. In each corner, a plant of a given treatment was placed, connected with a
 822 black paper 4 cm wide. In the center, the mealybugs were released; (B) Performance test of *P. minor*.
 823 The nymphs were released on each plant and then wrapped in voile fabric.

824

825

826



827

828 **Supplementary Material 2** Chlorophylls a, b, total and the carotenoid content in *Coffea arabica* plants
 829 control and treated with humic substances (HS), plant growth promoting bacteria (PGPB) and humic
 830 substances + plant growth promoting bacteria (HS+PGPB) (n=6). Tukey's test ($p = 0.05$)

ARTIGO 2

BIOESTIMULANTES NAS DEFESAS INDUZIDAS DE PLANTAS DE CAFÉ CONTRA A COCHONILHA *Planococcus minor* (MASKELL) (HEMIPTERA: PSEUDOCOCCIDAE)

(Artigo redigido nas normas do *Journal of Chemical Ecology*)

Lara Sales¹, Arodí P. Favaris², Livia A. Souza¹, Carla A. C. Antônio¹, Victor H. Buttrós³,
Fernanda M. Andrade¹, Marvin M. Pec², Lenira V. C. Santa-Cecília⁴, José M. S. Bento², Joyce
Dória⁵ & Maria Fernanda G. V. Peñaflo^{*1}

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), 37200-900, Lavras, MG, Brasil

²Departamento de Entomologia, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

³Setor de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras (UFLA), 37200-900, Lavras, MG, Brasil

⁴Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (IMA/EPAMIG Sul), 37200-900, Lavras, MG, Brasil

⁵Department de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA), 37200-900, Lavras, MG, Brasil

***Autora correspondente:** Maria Fernanda G. V. Peñaflo. Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil, Caixa postal 3037, CEP 37200-900, Telefone (35) 3829 – 1287, E-mail: fernanda.penaflor@gmail.com

RESUMO

O cafeeiro *Coffea* spp. (Rubiaceae) é um dos produtos de maior importância para a economia mundial, entretanto, este ainda é ocasionado pela presença de pragas, como as cochonilhas *Planococcus minor* (Hemiptera: Pseudococcidae). Uma alternativa é o uso de bioestimulantes, que são responsáveis primeiramente por promover crescimento vegetal, entretanto, podem levar ao aumento da resistência de plantas contra pragas e doenças. Dessa forma, nosso objetivo foi avaliar os efeitos das substâncias húmicas (SH) e da bactéria promotora de crescimento (BPCP), *Enterobacter tabaci*, combinadas e isoladas, sobre as defesas indiretas do cafeeiro contra a infestação pela *P. minor*. Avaliamos a influência de plantas de café, infestadas e não infestadas com cochonilhas e tratadas com bioestimulantes sobre a atratividade da joaninha predadora *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae). Quando contrastado plantas induzidas pela *P. minor* frente aos voláteis constitutivos de plantas controle, tratadas com BPCP ou SH+BPCP, elas foram atraídas para os voláteis induzidos. Somente SH infestada versus SH não infestada não foi discriminada. Nos tratamentos infestados pela cochonilha contrastados com o controle também infestado, a joaninha orientou-se preferencialmente pelos voláteis dos bioestimulantes. Quando exposto aos voláteis induzidos de plantas tratadas pelos bioestimulantes SH versus SH+BPCP, *C. montrouzieri* não diferenciou os tratamentos. Já na combinação BPCP e SH+BPCP, ambos infestados, o inimigo natural teve preferência pelas plantas tratadas com os dois bioestimulantes. Ao observar as atividades das enzimas, o ascorbato peroxidase foi maior no tratamento BPCP do que no tratamento SH, mas os dois tratamentos não diferiram do controle ou de SH+BPCP. A superóxido desmutase foi influenciada positivamente pelo tratamento com SH, pois SH e SH+BPCP apresentaram maior atividade da enzima que o controle e BPCP. Já a catalase foi reduzida pelo SH, já que os tratamentos SH e SH+BPCP tiveram menor atividade dessa enzima em relação ao controle e BPCP. O uso combinado dos dois bioestimulantes reduziu ainda mais a atividade da catalase em relação ao tratamento somente com SH. Observamos que a infestação pela *P. minor* aumentou em 2 vezes os níveis de ácido salicílico (AS) nas plantas em relação às plantas não infestadas. Entretanto, o tratamento com bioestimulantes não influenciou o nível de AS na planta. Em contraste, a infestação da cochonilha não alterou os níveis de ácido jasmônico (AJ), enquanto o tratamento SH+BPCP promoveu aumento do AJ em relação ao tratamento com SH ou BPCP. Dessa forma, o tratamento com SH, a bactéria *E. tabaci* e o uso combinado em plantas de cafeeiro alteram as atividades de enzimas do metabolismo oxidativo, que devem estar provavelmente relacionadas à melhoria das defesas induzidas indiretas contra *P. minor*, que incluem o aumento da atratividade da planta infestada ao seu inimigo natural.

Palavras-chave: Bactéria promotora de crescimento de plantas, *Cryptolaemus montrouzieri*, Pseudococcídeo, Resistência de plantas, Substâncias húmicas.

INTRODUÇÃO

O cafeeiro *Coffea* spp. (Rubiaceae) é um dos maiores impulsionadores da economia. No mercado agrícola mundial, das 124 espécies de cafeeiro, apenas duas são usadas para produção comercial da bebida, o arábica *C. arabica* L. e robusta *C. canephora* Pierre (Davis et al. 2011). Entretanto, apesar do grande sucesso da cultura em solos nacionais, a produção ainda tem seu desempenho afetado por diversos fatores, entre os quais, pode-se citar a ocorrência de pragas (Aristizabal et al. 2015; Pantoja-Gomez et al. 2019). Dentre os artrópodes de maior importância, podemos destacar as cochonilhas, sendo *Planococcus* spp. (Hemiptera: Pseudococcidae) um dos gêneros de maior incidência (Reis et al. 2010; Santa-Cecília e Souza 2014).

Uma das espécies de pseudococcídeos importantes da cultura do café é a *Planococcus minor* (Maskell) (Hemiptera: Pseudococcidae), conhecida também como “cochonilhas-das-rosetas” ou “cochonilhas-brancas” (Santa-Cecília et al. 2007). Essas cochonilhas ocorrem em ramos, folhas, flores e frutos do cafeeiro, e causam prejuízos devido à sucção contínua de seiva. Como consequência da infestação, pode haver a queda de flores e frutos e definhamento da planta, podendo ocasionalmente levar à sua morte (Santa-Cecília e Souza 2014; Santa-Cecília e SILVA 2020). Em razão dos potenciais prejuízos, os produtores fazem uso sucessivo de defensivos para controle desses insetos (Green et al. 2015). Segundo a Agrofitec (2022), já foram registrados 14 produtos químicos para essa espécie de cochonilha, todavia, o interesse crescente do Brasil, principalmente dos consumidores, por produtos orgânicos, tem passado a priorizar uma produção menos contaminada e agressiva ao ambiente.

A utilização dos inimigos naturais tem sido uma valiosa alternativa para o controle de pragas para evitar o uso abusivo de agrotóxicos. Dentre os inimigos naturais associados à cochonilha *P. minor*, destaca-se os coccinélídeos (Coleoptera: Coccinellidae). Pertencente a esta ordem, a espécie *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), popularmente conhecida como “mealybug destroyer”, é conhecida pela eficiência no manejo dessas pragas. Além disso, essas joaninhas vêm sendo comercializadas em todo o mundo como estratégia para o controle biológico de cochonilhas e outros insetos (Marques et al. 2015).

A identificação de compostos químicos moduladores das interações entre plantas, insetos pragas e inimigos naturais pode ser explorada como uma ferramenta alternativa para otimizar o controle biológico (Peñaflor e Bento 2013). Muitos metabólitos secundários das plantas atuam como compostos defensivos contra a herbivoria de insetos. Eles agem como defesas constitutivas ou induzidas das plantas (Bezemer e Van Dam 2005). As defesas constitutivas estão sempre presentes nos tecidos vegetais, agindo de forma contínua (Agrawal

35 e Karban 1999; Schoonhoven et al. 2005). Já as induzidas são sintetizadas pela planta após
36 sofrerem alguma injúria dos insetos (Karban e Baldwin 1997), sendo reguladas por
37 fitohormônios sinalizadores (War et al. 2012). Geralmente, os insetos herbívoros mastigadores
38 acionam a rota de síntese de defesa modulada pelo ácido jasmônico (AJ), enquanto a herbivoria
39 por insetos sugadores de floema são moduladas pelo ácido salicílico (AS) (Dicke et al. 2009;
40 Pinto-Zevallos et al. 2013).

41 Ao sofrer essas injúrias, as plantas podem se defender de forma direta, quando
42 compostos não voláteis ou voláteis afetam diretamente o comportamento ou fisiologia dos
43 herbívoros (Dudareva et al. 2013; Paré e Tumlinson 1999); ou indireta, por meio da emissão de
44 voláteis de plantas induzidos pela herbivoria (*herbivore-induced plant volatiles* HIPVs) que
45 recrutam os inimigos naturais (Dicke e Van Loon 2000; Heil 2008; Price et al. 1980; Turlings
46 e Tumlinson 1992).

47 Outra alternativa que tem contribuído e acrescentado ao controle biológico é o uso de
48 bioestimulantes. Eles promovem o crescimento das plantas e, como efeito secundário, podem
49 induzir sua resistência sistêmica e estimular o estado metabólico da planta, tornando-as mais
50 resistentes a estresses bióticos e abióticos (Bulgari et al. 2015; Olaetxea et al. 2015; Van Oosten
51 et al. 2017; Yakhin et al. 2017). Dessa forma, o seu uso também pode potencializar as defesas
52 indiretas da planta através da emissão rápida e intensa de HIPVs, servindo de pistas químicas
53 para os inimigos naturais encontrarem suas presas ou hospedeiros (Aguiar et al. 2018).

54 As substâncias húmicas (SH) e as bactérias promotoras de crescimento de plantas
55 (BPCP) são bioestimulantes comercializados, orgânicos e limpos (Halpern et al. 2015). As SH
56 são componentes provindos da matéria orgânica do solo, da transformação e decomposição de
57 resíduos vegetais e animais (Du Jardin 2015), podendo ser extraídos de turfas, compostos e
58 resíduos orgânicos crus (Rose et al. 2014). Elas podem modificar o perfil metabólico de defesa
59 das plantas, levando a resistência contra artrópodes (Razmjou et al. 2011; Schiavon et al. 2010),
60 através da regulação de vários genes sensíveis ao AJ, AS e etileno (ET) (Canellas et al. 2020).
61 Assim como as BPCP, que são empregadas para o crescimento das plantas (Adesemoye et al.
62 2009), e podem influenciar nas respostas das plantas à diferentes estresses, pois modulam as
63 vias de sinalização de defesa que culminam na produção de metabólitos secundários, ativando
64 seu *priming* de defesa (Backer et al. 2018; Bhattacharyya e Jha 2012; Bulgarelli et al. 2013;
65 Pieterse et al. 2014). Apesar disso, até hoje, pouco sabe sobre o efeito desses bioestimulantes
66 nas defesas indiretas da planta.

67 Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos das SH e de um isolado
68 de BPCP, a *Enterobacter tabaci*, combinadas e isoladas, sobre as defesas indiretas do cafeeiro

69 contra a infestação pela cochonilha-branca *P. minor*. Para tanto, avaliou-se a influência do
70 tratamento com bioestimulantes sobre a atratividade dos voláteis das plantas de café *C. arabica*
71 para a joaninha *C. montrouzieri*, as principais enzimas do metabolismo oxidativo e dos
72 fitohormônios AJ e AS.

73

74

MATERIAIS E MÉTODOS

75

76 *Plantas e Bioestimulantes*. Foram realizados o plantio de sementes de café *C. arabica* cv.
77 Mundo Novo IAC 376/4 em julho e novembro/2021. Os endocarpos das sementes foram
78 retirados manualmente, para antecipar a germinação e emergência das plântulas (Coelho 2014).
79 Foram semeadas duas sementes por saquinho de polietileno perfurado (10 cm x 20 cm) com
80 duas medidas de solo (latossolo vermelho escuro), uma de substrato (Carolina Soil®, Carolina
81 Soil Company, Brasil) e uma de areia. Após germinar, foi feito o desbaste deixando uma
82 plântula por saquinho e mantidas em casa de vegetação (Lavras, MG, Brasil, 21°13'35.0" S
83 44°58'29.3" O) até completarem entre 6 e 7 meses ou 6 a 8 pares de folhas.

84 O isolado YIM Hb-3T de *E. tabaci* foi obtido de raízes de cafezais orgânicos na Fazenda
85 Monte Alto (Dourado, São Paulo, Brasil, 22°42'30" S 47°30'00" O). Segundo Andrade (2019),
86 esse inóculo, provindo de raízes de cafeeiro, apresentou as melhores características referentes
87 ao seu potencial como promotora de crescimento vegetal. Um inóculo de *E. tabaci* foi
88 reativado, armazenado a -80°C em meio de cultura de caldo triptona de soja (TSB) à 28°C até
89 atingir a concentração aproximada de 1×10^9 UFC.mL⁻¹ (UFC = unidades formadoras de
90 colônias). Foi estabelecida a contagem e determinação de UFC com base na curva de
91 crescimento que relaciona densidade óptica (OD) da suspensão a 520 nm com o número de
92 células em suspensão, onde a OD=0.5 equivale a aproximadamente 10^9 UFC.mL⁻¹.

93 Após esse procedimento, foi realizada a centrifugação das células a 5000 rpm durante
94 10 minutos e lavadas duas vezes em tampão fosfato salino (PBS) pH=7,0, seguido de nova
95 centrifugação para remover resíduos presentes no meio de cultura. Para a aplicação dos
96 microrganismos, o precipitado obtido na centrifugação das células bacterianas foi suspenso em
97 tampão PBS até OD=0,5.

98 A fonte de SH foi a formulação comercial Solohumics-solo® (Solohumics Fertilizantes,
99 Alcobaça, BA, Brasil), que possui 1,5% de nitrogênio total, 1,5% de potássio solúvel em água,
100 46% de carbono orgânico total, 25% de húmico extrato, 5% extrato fúlvico, diluído na
101 concentração de 2,5% (25 mL/L de água destilada).

102

103 *Insetos.* As cochonilhas *P. minor* foram coletadas de frutos de cacau (*Theobroma cacao* L.) em
104 Lavras-MG, Brasil, identificadas (Dr. Ernesto Prado) e multiplicadas em laboratório em frutos
105 de abóboras (*Cucurbita maxima* L. cv. Cabotchá). As abóboras foram higienizadas em solução
106 contendo 10% de hipoclorito de sódio e inseridas em gaiolas de madeira (60cm x 40cm x 30cm)
107 cobertas com tecido preto, em escotofase total para evitar eventuais efeitos fototrópicos (Santa-
108 Cecília et al. 2009). As abóboras eram sempre renovadas quando entravam no período de
109 senescência (Santa-Cecília et al. 2013).

110 Já a criação das joaninhas *C. montrouzieri*, foi fornecida pelo Laboratório de Entomologia
111 da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas-BA, coordenada pelo Dr. Nilton
112 Fritzons Sanches. Os insetos eram mantidos por 12h de fotofase em gaiolas de madeira (60 cm
113 x 40 cm x 30 cm) contendo abóboras infestadas com cochonilhas *P. minor* oriundas da criação
114 em laboratório. O fruto era trocado após sua deterioração e para controle da umidade do
115 ambiente, foram inseridas uma pequena quantidade de algodão hidrófilo umedecido com água.
116 Além disso, foram colocados potes plásticos com massas contendo centenas de indivíduos de
117 *P. minor* para alimentação e deposição dos ovos do predador.

118

119 *Tratamentos.* Mudanças de café foram tratadas com os bioestimulantes SH, BPCP ou SH+BPCP.
120 O volume de bioestimulantes foi determinado com base na capacidade de campo do solo do
121 cafeeiro. Mudanças jovens de café (~30 dias após o plantio) foram tratadas com uma única
122 aplicação de 6 mL de solução SH diretamente no solo para a obtenção do tratamento SH. O
123 tratamento com BPCP consistiu em aplicações de 6 mL da suspensão bacteriana diretamente
124 no solo a cada 15 dias até que tivessem 1 par de folhas totalmente expandidas (~60 dias após o
125 plantio), quando passou a ser aplicado a cada 30 dias até o início dos experimentos, totalizando
126 6 aplicações do inoculante BPCP. Os cafeeiros tratados com SH+BPCP receberam tratamentos
127 semelhantes aos descritos para os cafeeiros tratados com SH e tratados com BPCP, porém, foi
128 dado um intervalo de 7 dias entre a aplicação de SH e a segunda aplicação de BPCP (~30 dias
129 após o plantio). Plantas de café não tratadas (controle) e tratadas com SH receberam 6 mL de
130 PBS estéril usando o mesmo método descrito e nos mesmos intervalos que as plantas de café
131 tratadas com BPCP.

132

133 *Comportamento Olfativo.* Para realização do ensaio de resposta olfativa de adultos da joaninha
134 *C. montrouzieri*, foram utilizadas plantas controle e tratadas com SH, BPCP, SH + BPCP, na
135 presença ou ausência da cochonilha *P. minor*. Os experimentos foram realizados no laboratório,
136 sob condições controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ de UR) entre 8:00 e 18:00 h, visto que essas

137 joaninhas possuem maior atividade no período diurno (Rafael et al. 2012). Para as avaliações,
138 um olfatômetro em ‘Y’ de vidro (15 cm de cada braço e 4 cm de diâmetro) foi disposto dentro
139 de uma caixa (Figura Suplementar), para evitar a influência de pistas visuais do ambiente, e
140 colocado verticalmente à superfície da bancada, devido ao comportamento de geotropismo
141 negativo do predador (Chapman 1998).

142 As plantas foram acondicionadas em sacos de poliestireno (41 cm x 33 cm) com duas
143 pequenas aberturas nas laterais para entrada das mangueiras de silicone que conecta os
144 tratamentos aos braços do olfatômetro. Além disso, esses sacos foram cobertos com papel
145 branco para evitar possíveis estímulos visuais das plantas para as joaninhas. Uma bomba
146 compressora, com fluxo de ar calibrado em 4,5 L/min por meio de um fluxômetro, levou o ar
147 para o sistema, sendo filtrado por um filtro de carvão ativado, e umidificado devido à presença
148 do umidificador, em seguida o ar foi conduzido até as plantas ensacadas contendo os diferentes
149 tratamentos e posteriormente para os braços laterais do olfatômetro.

150 Fêmeas de joaninhas foram individualizadas em tubos de ensaios e ficaram em jejum por
151 24 horas. Em cada bioensaio, foram usados 5 pares de planta e 50 adultos de joaninhas (10
152 indivíduos/par de plantas). Os adultos foram liberados no braço central do olfatômetro e
153 observados por 5 minutos, no máximo, ou até ultrapassarem a linha no terço distal de um dos
154 braços laterais do olfatômetro. Nos casos em que o inseto não escolheu nenhum dos braços no
155 tempo proposto, foi contabilizado como ‘sem resposta’.

156 No sistema de olfatometria, os coccinelídeos foram expostas aos voláteis emitidos pelas
157 próprias plantas, nas combinações (i) Controle com cochonilha vs. Controle, (ii) SH com
158 cochonilha vs. SH, (iii) BPCP com cochonilha vs. BPCP, (iv) SH+BPCP com cochonilha vs.
159 SH+BPCP, (v) SH com cochonilha vs. Controle com cochonilha, (vi) BPCP com cochonilha vs.
160 Controle com cochonilha, (vii) SH+BPCP com cochonilha vs. Controle com cochonilha, (viii)
161 SH com cochonilha vs. SH+BPCP com cochonilha e (ix) BPCP com cochonilha vs. SH+BPCP
162 com cochonilha

163 Após cada repetição, o inseto foi descartado e trocadas as posições dos tratamentos no
164 olfatômetro para evitar tendências de lado na escolha. Após 10 repetições, o olfatômetro foi
165 lavado com detergente neutro e enxaguado com água, acetato de etila (Acetato de Etila P.A.
166 ACS., Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil) e álcool 70% (Start, Lima &
167 Pergher, São Paulo, SP, Brasil) e, posteriormente, seco em estufa a 100°C.

168

169 *Enzimas Antioxidantes Induzidas.* Os níveis de ascorbato peroxidase (APX), superóxido
170 dismutase (SOD) e catalase (CAT) de plantas de café não tratadas (controle), SH, BPCP e

171 SH+BPCP após a infestação pela cochonilha por 20 dias foram mensurados. Foram coletadas
172 quatro folhas de cada tratamento e armazenadas em envelope de papel alumínio e
173 posteriormente congeladas em nitrogênio líquido. As folhas foram maceradas em cadinho de
174 porcelana sobre gelo, na presença de nitrogênio líquido e polivinilpirrolidona (PVP) e
175 armazenadas em -86 °C.

176 Para a extração de ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e catalase
177 (CAT) do material vegetal, homogeneizou-se 100 mg de cada amostra, seguindo a metodologia
178 proposta por Anjum et al. (2016) para APX, Del Longo et al. (1993) para SOD e Havir e McHale
179 (1987) para CAT.

180

181 *Mensuração dos Níveis de Fitohormônios.* A mensuração dos níveis dos principais
182 fitohormônios foi realizada no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos
183 da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP) (Piracicaba, SP, Brasil).
184 Para extração e detecção dos níveis de AS e AJ dos tratamentos controle e sob tratamento com
185 bioestimulantes com e sem infestação pela cochonilha *P. minor*, foi utilizado o método
186 desenvolvido por Schmelz et al. (2003). A mensuração foi realizada nos tratamentos controle,
187 plantas tratadas com SH, BPCP, SH + BPCP, na presença ou ausência da cochonilha *P. minor*,
188 com oito repetições cada.

189 Foram separados e pesados cerca de 200 mg de folhas de cafeeiro e posteriormente
190 congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C para conservar a amostra até sua
191 preparação. Foram adicionados 10 µL de solução comportando os padrões ácido salicílico
192 isótopo marcado (salicylicacid -13C₆, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, EUA) e o di-hidro ácido
193 jasmônico (dihydrojasmonicacid, TCI, Portland, OR, USA) a 10 ng/µL, ao material congelado.
194 Para isolar os fitohormônios, foram adicionados diclorometano e transferidos para frascos para
195 derivatizados a partir de ácidos carboxílicos em ésteres metílicos utilizando
196 trimetilsilildiazometano (Sigma-Aldrich). Um fluxo de ar foi utilizado para evaporação do
197 solvente e o frasco aquecido até atingir 200°C por 2 minutos para assim liberar os voláteis, que
198 foram coletados em filtros contendo o polímero Haysep-Q® conectados a uma bomba a vácuo
199 (1L/min).

200 Posteriormente, os compostos armazenados no polímero foram eluídos usando 100 µL
201 de diclorometano e levados para a análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria
202 de massa (CG-ES), no modo de ionização química, utilizando o gás butano. A quantificação foi
203 realizada com base na área do pico dos dois fitohormônios (MeJA e MeSA) naturais da planta
204 comparada com os padrões sintéticos e corrigido através do peso seco do tecido foliar coletado.

205

206 *Análises Estatísticas.* A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para os
 207 dados que atenderam às premissas da análise paramétrica, foi realizada ANOVA e as médias
 208 comparamos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Caso contrário, os dados foram
 209 testados por meio de modelo linear generalizado (GLM) com distribuição do tipo *Gamma*. Os
 210 dados de fitohormônio foram considerados, como fatores separados, a presença ou ausência de
 211 infestação na planta e o o efeito dos bioestimulantes. Os dados de escolha olfativa da joaninha
 212 foram analisados também por GLM, porém com a distribuição *quasibinomial*. Em todas as
 213 análises utilizamos o software estatístico R (University of Auckland, Auckland, Nova
 214 Zelândia).

215

216

RESULTADOS

217

218 *Comportamento Olfativo.* Nestes ensaios, as joaninhas não foram atraídas pelos voláteis
 219 constitutivos das plantas de café sob os diferentes tratamentos. No entanto, as joaninhas foram
 220 atraídas pelos voláteis de plantas induzidas pela herbivoria da cochonilha *P. minor* frente aos
 221 voláteis constitutivos de plantas controle, tratadas com BPCP ou SH+BPCP (Controle ● vs.
 222 Controle: $F= 18,44$, $df= 1$, $P= 4,59 \times 10^{-5}$ / BPCP ● vs. BPCP: $F= 23,54$, $df= 1$, $P < 0,001$ /
 223 SH+BPCP ● vs. SH+BPCP: $F= 16,83$, $df= 1$, $P < 0,001$). Somente no ensaio entre SH infestada
 224 versus SH não infestada pela cochonilha ($F= 1,04$, $df= 1$, $P= 0,31$), *C. montrouzieri* não
 225 discriminou os odores emitidos pelos tratamentos (Fig. 1). Diante disso, testamos a preferência
 226 das joaninhas aos tratamentos infestados pela cochonilha contrastados com o controle também
 227 infestado. Em todos eles, a joaninha orientou-se preferencialmente pelos voláteis dos
 228 bioestimulantes SH ($F= 12,99$, $df= 1$, $P < 0,001$), BPCP ($F= 5,09$, $df= 1$, $P= 0,03$) e SH+BPCP
 229 ($F= 34,11$, $df= 1$, $P < 0,001$) (Fig. 1).

230

231

232

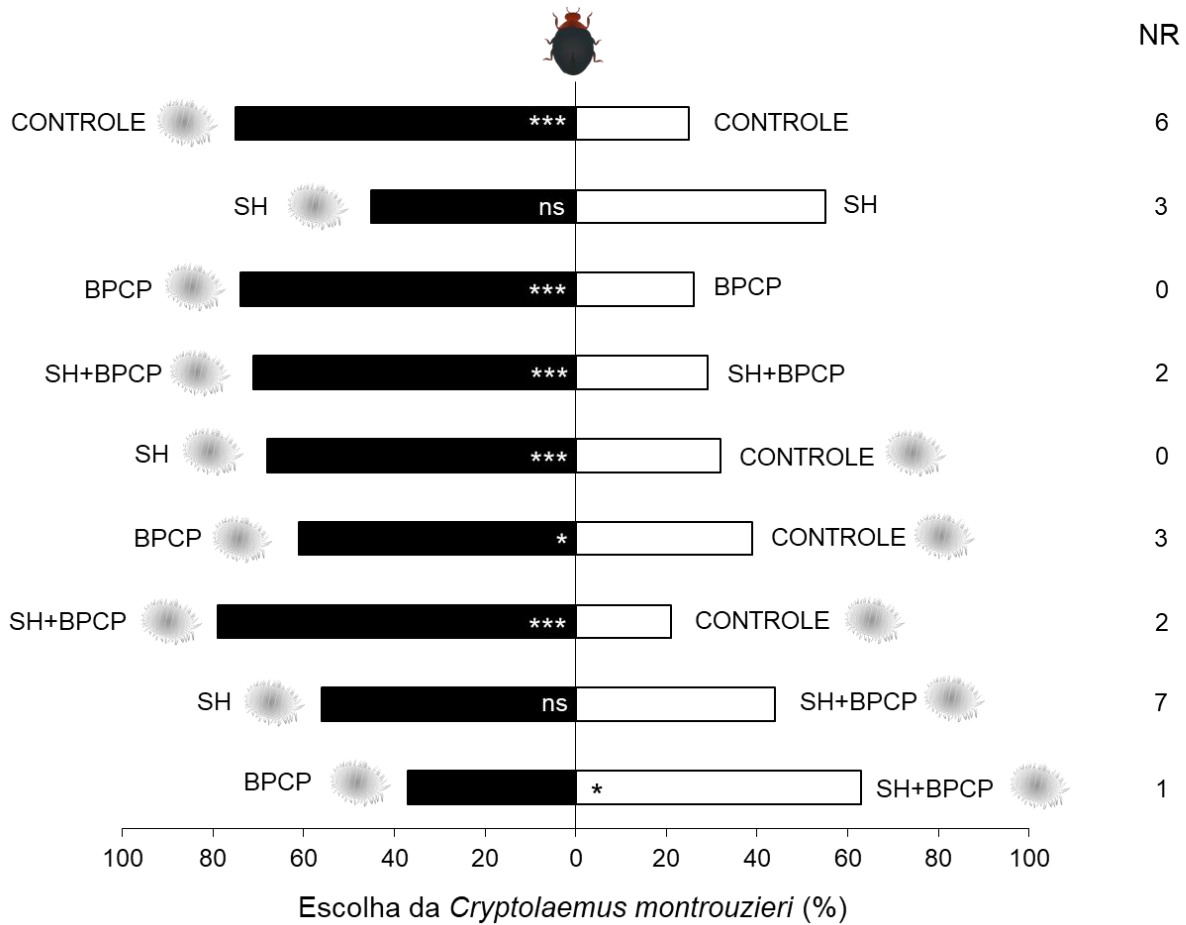
233

234

235

236

Quando o inimigo natural foi exposto aos voláteis induzidos pela infestação das
 cochonilhas de plantas tratadas pelos bioestimulantes SH versus aqueles das plantas SH+BPCP,
C. montrouzieri não diferenciou os tratamentos ($F= 1,14$, $df= 1$, $P= 0,29$). Já na combinação
 BPCP e SH+BPCP, ambos com infestação da cochonilha, o coccinelídeo teve preferência pelas
 plantas tratadas com os dois bioestimulantes ($F= 6,84$, $df= 1$, $P= 0,01$). Em todas as
 combinações, houve uma baixa proporção (entre 0 e 14%) de joaninhas que não escolheram
 nenhum dos tratamentos (Fig. 1).



237

238 **Fig. 1** Preferência olfativa de *Cryptolaemus montrouzieri* (☿) aos voláteis emitidos pelas plantas de
 239 *Coffea arabica* não tratadas (controle) e tratadas com com substâncias húmicas (SH), bactérias
 240 promotoras de crescimento vegetal (BPCP) e substâncias húmicas + bactérias promotoras do
 241 crescimento de plantas (SH+BPCP), sob infestação, ou não, pela cochonilha *Planococcus minor* (☿).
 242 Cada predador foi testado apenas uma vez, e caso não apresentasse preferência, foi considerado “não
 243 resposta” (NR), representado à direita do gráfico. ns = não houve diferença significativa, * $P < 0,05$; ***
 244 $P < 0,001$.

245

246 *Enzimas Antioxidantes Induzidas.* Para os valores relacionados às enzimas do sistema
 247 antioxidante induzidas pela cochonilha *P. minor*, a atividade de APX foi significativamente
 248 maior no tratamento BPCP do que no tratamento SH ($F = 4,16$, $df = 3$, $P = 0,05$), mas os dois
 249 tratamentos não diferiram do controle ou de SH+BPCP. A atividade do SOD foi influenciada
 250 positivamente pelo tratamento com SH, pois os tratamentos SH e SH+BPCP apresentaram
 251 maior atividade da enzima que o controle e BPCP ($F = 4,80$, $df = 3$, $P = 0,03$). Já a atividade da
 252 enzima CAT foi reduzida pelo SH, já que os tratamentos SH e SH+BPCP tiveram menor
 253 atividade de CAT em relação ao controle e BPCP. O uso combinado dos dois bioestimulantes
 254 reduziu ainda mais a atividade de CAT em relação ao tratamento somente com SH ($F = 53,47$,
 255 $df = 3$, $P < 0,001$) (Tabela 1).

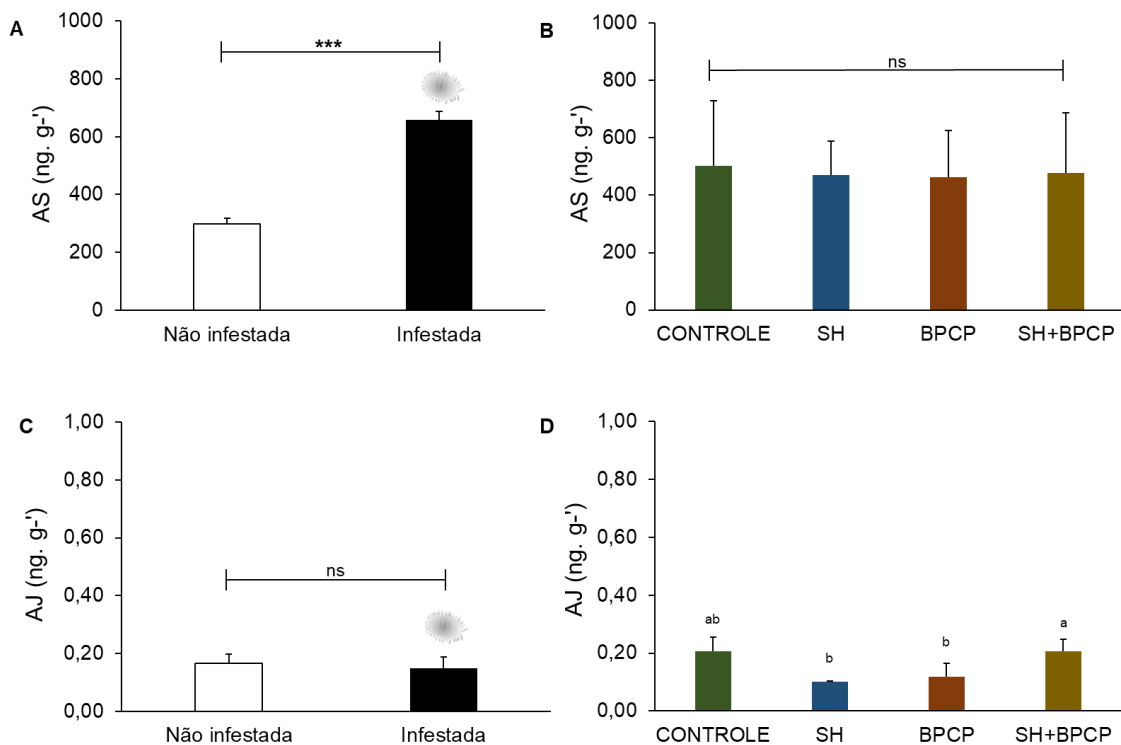
256

257 **Tabela 1** Atividade das enzimas (média \pm SE) do metabolismo oxidativo do cafeeiro *Coffea arabica*
 258 induzido pela cochonilha *Planococcus minor* não tratado (controle), tratado com substâncias húmicas
 259 (SH), bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e substâncias húmicas + bactérias
 260 promotoras de crescimento vegetal (SH+BPCP) (n=3)
 261

Tratamento	Atividade APX (mmol ASA.gFM ⁻¹ .min ⁻¹)	Atividade SOD (U SOD.min ⁻¹ .gFM ⁻¹)	Atividade CAT (mmol H ₂ O ₂ .min ⁻¹ .gFM ⁻¹)
Controle	3,03e-06 \pm 2,80e-07 ab	99,31 \pm 3,72 b	1,48e-06 \pm 6,81e-08 a
SH	2,27e-06 \pm 4,18e-07 b	110,10 \pm 3,30 a	7,94e-07 \pm 1,03e-07 b
BPCP	4,33e-06 \pm 2,70e-07 a	97,43 \pm 1,63 b	1,63e-06 \pm 8,21e-08 a
SH+BPCP	2,48e-06 \pm 4,85e-07 ab	111,44 \pm 2,20 a	2,90e-07 \pm 7,08e-08 c
Valor- p	0,05	0,03	< 0,001

262 APX=Ascorbato Peroxidase; SOD=Superóxido Dismutase; CAT=Catalase; ASA=Ácido Ascórbico;
 263 H₂O₂=Peróxido de Hidrogênio; FM=FreHS Mass. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença
 264 significativa em uma coluna; Teste de Tukey (p=0,05)
 265

266 *Mensuração dos Níveis de Fitohormônios.* A infestação pela cochonilha aumentou em 2 vezes
 267 os níveis de AS nas plantas em relação às plantas não infestadas, independentemente do
 268 tratamento com bioestimulantes ($F= 26,96$, $df = 1$, $P < 0,001$) (Fig. 2A). O tratamento com
 269 bioestimulantes, por sua vez, não influenciou o nível de AS na planta ($F= 1,23$, $df= 3$, $P= 0,75$)
 270 (Fig. 2B). Em contraste aos resultados de AS, a infestação da cochonilha não alterou os níveis
 271 de AJ ($F= 1,28$, $df= 1$, $P= 0,26$) (Fig. 2C), enquanto o tratamento SH+BPCP promoveu aumento
 272 do AJ em relação ao tratamento com SH ou BPCP ($F= 18,09$, $df= 3$, $P < 0,001$) (Fig. 2D).



273

274
 275 **Fig. 2** Níveis dos fitohormônios ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (AJ) de folhas de plantas não
 276 tratadas (controle) e tratadas com substâncias húmicas (SH), bactérias promotoras de crescimento
 277 vegetal (BPCP) e substâncias húmicas + bactérias, bactérias promotoras do crescimento de plantas
 278 (SH+BPCP), sob infestação, ou não, pela cochonilha *Planococcus minor* (●). (A) Diferença entre os
 279 níveis de AS nos tratamentos infestada e não infestada pela *P. minor*; (B) Níveis de AS de plantas sob
 280 diferentes tratamentos com bioestimulantes; (C) Diferença entre os níveis de AJ nos tratamentos
 281 infestada e não infestada pela *P. minor*; (D) Níveis de AJ de plantas sob diferentes tratamentos com
 282 bioestimulantes. As letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. ns = não houve
 283 diferença significativa, *** P<0,001.

284

285

DISCUSSÃO

286

287 As plantas desenvolveram a capacidade de reconhecer a identidade dos herbívoros e
 288 regular suas defesas moduladas por diferentes cascatas de sinalização para reduzir suas injúrias.
 289 Ao aplicar os bioestimulantes, esses podem induzir mecanismos pré-existentes latentes na
 290 planta ou *priming* de defesa para melhorar e acelerar sua resistência contra esses estresses
 291 (Bektas e Eulgem 2015). Segundo Sales et al. (Dados não publicados), o tratamento de plantas
 292 de café com SH e *E. tabaci* apresentou resultados promissores na resposta direta à cochonilha
 293 *P. minor*. Como defesa indireta, os voláteis induzidos pela herbivoria também são importantes
 294 defesas às pragas, constituindo sinais de busca pelos seus inimigos naturais (Arimura et al.
 295 2009). Nesse sentido, o presente trabalho foi avaliar o efeito dos bioestimulantes nas defesas
 296 indiretas das plantas, explorando a resposta das enzimas oxidativas na defesa das plantas
 297 induzidas, a atratividade do terceiro nível trófico aos voláteis e as rotas de defesas moduladas
 298 por moléculas sinalizadoras, como o AJ e AS.

299 A influência dos voláteis liberados pelas plantas no comportamento dos inimigos
 300 naturais é um fator relevante para a otimização do controle biológico. A capacidade dos
 301 inimigos naturais em reconhecer o odor da planta infestada pela presa é uma estratégia
 302 adaptativa que lhes permitem deslocar para essas áreas. Observamos ao testar as diferentes
 303 combinações, que houve congruência nos resultados, visto que os coccinelídeos tiveram
 304 preferência por odores emitidos por plantas induzidas pela sua presa, independente da
 305 combinação, exceto plantas SH frente a plantas SH infestada pela cochonilha, em que o
 306 predador não teve preferência pelos odores. Os bioestimulantes podem ativar a resistência
 307 sistêmica adquirida (RSA), um processo de *priming* que pode conferir resistência não só a
 308 patógenos, mas também a insetos (Rostás e Turlings 2008; Conrath et al. 2015), fazendo com
 309 que a planta responda mais rapidamente ao ataque. Dessa forma, ao ser atacada por herbívoros,
 310 a planta potencializa suas defesas indiretas ativando pistas para os inimigos naturais (Aguilar et
 311 al. 2018; Jung et al. 2009). O tratamento com SH, sem a infestação pela cochonilha,

312 provavelmente já induz a emissão de voláteis atrativos, fazendo com que esse predador não
313 diferencie entre planta infestada e não infestada pela presa. A literatura aborda a preferência de
314 parasitoides por ovos de hospedeiros alimentados em plantas tratadas com SH com relação às
315 plantas não tratadas (Mohamadi et al. 2017), entretanto ainda não há relatos sobre os
316 mecanismos da SH na ativação das defesas induzidas indiretas (Pereira et al. 2021).

317 Testamos também a influência dos bioestimulantes, que ao serem contrastados com o
318 controle, todos aumentaram as defesas induzidas indiretas. O tratamento da combinação dos
319 bioestimulantes SH+BPCP foi semelhante ao tratamento SH e superior ao tratamento BPCP na
320 emissão de voláteis induzidos à herbivoria atrativos à joaninha. Esses resultados mostram que
321 não houve efeito sinérgico no uso combinado dos bioestimulantes sobre a resistência contra
322 insetos, como outros estudos demonstram para parâmetros de crescimento e de tolerância a
323 fatores abióticos (Olivares et al. 2017). Provavelmente, a mistura e proporção de voláteis
324 emitidos por plantas tratadas por apenas SH são sinais usados pelos insetos para reconhecer seu
325 hospedeiro (Webster et al. 2008), além de seus odores sobrepor com aqueles emitidos por
326 SH+BPCP.

327 O dano físico pela herbivoria resulta na produção de espécies reativas de oxigênio
328 (ERO) na planta que são importantes na sinalização da resposta defensiva, mas ao mesmo
329 tempo podem causar estresse oxidativo às células (Kerchev et al. 2012). Assim, os ERO
330 produzidos devem eliminadas por enzimas antioxidativas, como SOD, APX e CAT (Lukasik et
331 al. 2012). Golan et al. (2013) observaram em seu trabalho que plantas de samambaia
332 *Nephrolepis biserrata* (Schott.) ao serem induzidas por cochonilhas da família Coccidae
333 elevaram os níveis da enzima CAT, sugerindo que a alteração na atividade das enzimas pode
334 ser a primeira resposta da planta ao ataque de herbívoros. Alguns trabalhos vêm mostrando que
335 a aplicação de bioestimulantes aumenta a atividade antioxidante na planta e conseqüentemente
336 melhora a sua capacidade para lidar contra estresses (Hamza e Suggars 2001; Zhang e Schmidt
337 2000). Entretanto, em nosso trabalho observamos que o tratamento com SH, em combinação
338 com BPCP ou isolado, aumenta a atividade da SOD ao mesmo tempo que reduz a CAT nas
339 plantas sob estresse da herbivoria da cochonilha, ao passo que BPCP não promove alteração de
340 nenhuma das enzimas antioxidativas avaliadas. Tanto a inibição de CAT e quanto o aumento
341 da atividade da SOD levam ao aumento dos níveis de H₂O₂ nas células, que são importantes
342 sinalizadores da RSA (Chen et al. 1993). Assim, essa regulação enzimática pode ser responsável
343 pelo melhor resultado do tratamento SH na indução das defesas indiretas da planta de café.

344 As rotas metabólicas moduladas por fitohormônios são importantes moduladores na
345 indução das defesas. As plantas reconhecem sinais de células danificadas ou de enzimas

346 salivares e passam a produzir fitohormônios, principalmente AS e AJ (War et al. 2012). No
347 entanto, a literatura retrata que os bioestimulantes também são capazes de acionar esses
348 sinalizadores de defesa. Eles modulam suas vias de sinalização levando a produção de
349 metabólitos secundários, bem como ativam os *priming* de defesa da planta (Backer et al. 2018;
350 Pieterse et al. 2014). Para isso, contrastamos os resultados constitutivos e induzidos e
351 posteriormente comparamos se houve diferença, na quantidade de AS e AJ, nos diferentes
352 bioestimulantes. A herbivoria pela cochonilha aumentou o acúmulo de AS, diferentemente do
353 nível de AJ que foi similar nos tratamentos constitutivos e induzidos. Segundo inúmeros
354 trabalhos, a presença de herbívoros sugadores de floema e xilema ativam a via do AS (Moran
355 e Thompson 2001; Kempema et al. 2007; Zarate et al. 2007). Além disso, esses insetos
356 suprimem as defesas mediadas pelo AJ (Timm e Reineke 2014; Zhang et al. 2011, 2015).
357 Interessante que ao mensurar os níveis dos fitohormônios para os diferentes bioestimulantes,
358 observamos que não houve diferença para o AS. Entretanto, para o AJ, o melhor tratamento foi
359 o uso combinado dos dois bioestimulantes, demonstrando o efeito sinérgico da SH+BPCP.
360 Segundo resultados de De Hita et al. (2020), plantas tratadas com SH induz níveis aumentados
361 de AJ, assim como as BPCP também auxilia na sua modulação (Adesemoye et al. 2009), no
362 entanto, não há trabalhos que relatem o aumento do AJ quando combinado mais de um
363 bioestimulante.

364 No geral, o tratamento com substâncias húmicas, com a bactéria *E. tabaci* e o uso
365 combinado delas em plantas de café, podem iniciar vias de defesa para melhorar a
366 resistência a estresses bióticos causados pela *P. minor* por meio do aumento da atratividade
367 para o seu inimigo natural, a joaninha *C. montrouzieri*. Acredita-se que esses bioestimulantes
368 levem ao aumento da resistência das plantas por meio da indução dos *priming* de defesa (Bektas
369 e Eulgem 2015). Dessa forma, as plantas se tornam aptas a liberar compostos que auxiliem no
370 recrutamento dos inimigos naturais, constituindo como potenciais estratégia para o manejo
371 integrado, podendo sintetizar esses compostos e aplicar no controle biológico da cochonilha em
372 café. Entretanto, esses são estudos em condições de laboratório, sendo importante frisar que
373 generalizar esses resultados para aplicabilidade dessas substâncias demanda mais estudos para
374 entender as alterações na interação da planta com herbívoros e seus inimigos naturais em
375 condições de campo (Filgueiras et al. 2019; Sobhy et al. 2012).

376

AGRADECIMENTOS

377

378 Agradecemos aos pesquisadores, Dr. Nilton Fritzens Sanches e Dr. Ernesto Prado, pela
379 doação e identificação dos insetos utilizados no trabalho. Aos doutores Paulo Andrade e Paulo
380 Lacava do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade de São Carlos (UFSCar)
381 por terem fornecido o inóculo utilizado nos experimentos. À Empresa Solohumics Fertilizantes
382 (Alcobaça, BA, Brasil) por terem fornecido o produto Solohumics-solo® utilizado em nossa
383 pesquisa. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo
384 financiamento do projeto de pesquisa “Bactérias endofíticas como indutoras de resistência e
385 tolerância a estresses bióticos e abióticos em mudas de *Coffea arabica* L.” Nº 28/2018. À
386 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de
387 Financiamento 001 pela concessão da bolsa de estudos.

388

REFERÊNCIAS

389

390

391 Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria
392 allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial ecology* 58:921-929.
393 <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9531-y>

394

395 Agrawal AA, Karban R (1999) The ecology and evolution of inducible defenses.
396 *Quarterly Review of Biology* 65:323-340.

397

398 Agrofit (2022) Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura do Governo
399 Federal. www.agricultura.gov.br. Acesso em: 10 dez. 2022.

400

401 Aguiar NO et al (2018) Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by
402 endophytic diazotrophic bacteria and humic acids. *PeerJ* 6:e5445.
403 <https://doi.org/10.7717/peerj.5445>

404

405 Anjum NA, Sharma P, Gill SS et al. (2016) Catalase and ascorbate peroxidase-representative
406 H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*
407 23:19002-19029. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>

408

409 Arimura G, Matsui K, Takabayashi J (2009) Chemical and molecular ecology of herbivore-
410 induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant and Cell*
411 *Physiology* 50:911-923. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp030>

412

413 Aristizábal MV, Gómez PÁ, Cardona ACA (2015) Biorefineries based on coffee cut-stems
414 and sugarcane bagasse: furan-based compounds and alkanes as interesting products. *Bioresour*
415 *Technol* 196:480–489. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.057>

416

- 417 Backer R et al (2018) Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action,
418 and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in*
419 *plant science* 9:1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
420
- 421 Bektas Y, Eulgem T (2015) Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in plant science* 5:804.
422 <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00804>
423
- 424 Bezemer TM, Van Dam NM (2005) Linking aboveground and belowground interactions via
425 induced plant defenses. *Trends in Ecology & Evolution* 20:617–624.
426 <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.08.006>
427
- 428 Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence
429 in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:1327-1350.
430 <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
431
- 432 Bulgarelli D et al (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual*
433 *review of plant biology* 64:807-838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
434
- 435 Bulgari D et al (2015) Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture &*
436 *Horticulture* 31:1-17. <https://doi.org/10.1080/01448765.2014.964649>
437
- 438 Canellas LP et al (2020) Plant chemical priming by humic acids. *Chem. Biol. Technol. Agric.*
439 7:1–17. <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00178-4>
440
- 441 Chapman RF (1998) *The insects: structure and function*. Cambridge University Press.
442
- 443 Chen Z, Silva H, Klessig DF (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic
444 acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262:1883-1886.
445 <https://doi.org/10.1126/science.8266079>
446
- 447 Coelho SVB (2014) Secagem e resfriamento de sementes de *Coffea arabica* L. visando o
448 armazenamento em temperaturas supra e sub zero. Dissertação, Universidade Federal de
449 Lavras.
450
- 451 Conrath U et al (2015) Priming for enhanced defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53:97–119.
452 <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>
453
- 454 Davis AP et al (2011) Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of
455 molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and
456 evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 167:357-377.
457 <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x>
458
- 459 De Hita D et al (2020). Discriminating the short-term action of root and foliar application of
460 humic acids on plant growth: emerging role of jasmonic acid. *Front. Plant Sci.* 11:493.
461 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00493>
462
- 463 Del Longo OT et al (1993) Antioxidant Defences under Hyperoxygenic and Hyperosmotic
464 Conditions in Leaves of Two Lines of Maize with Differential Sensitivity to Drought. *Plant*
465 *and Cell Physiology* 34:1023-1028. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a.078515>
466

- 467 Dicke M, Van Loon JJ (2000) Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles
468 in an evolutionary context. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97:237-249.
469 <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2000.00736.x>
470
- 471 Dicke M et al (2009) Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple
472 attack. *Nature Chemical Biology* 5:317-324. <https://doi.org/10.1038/nchembio.169>
473
- 474 Du Jardin P (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation.
475 *Scientia Horticulturae* 196:3-14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
476
- 477 Dudareva N et al (2013) Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant
478 volatile organic compounds. *New Phytologist* 198:16-32. <https://doi.org/10.1111/nph.12145>
479
- 480 Filgueiras CC et al (2019) The ecology of salicylic acid signaling: Primary, secondary and
481 tertiary effects with applications in agriculture. *International Journal of Molecular Sciences*
482 20:5851. <https://doi.org/10.3390/ijms20235851>
483
- 484 Golan K et al (2013) Physiological and biochemical responses of fern *Nephrolepis biserrata*
485 (Sw.) Schott. to *Coccus hesperidum* L. infestation. *Acta Biologica Cracoviensia. Series*
486 *Botanica* 55: 1364-1371. <https://doi.org/10.2478/abcsb-2013-0007>
487
- 488 Green PWC et al (2015) Can coffee chemical compounds and insecticidal plants be harnessed
489 for control of major coffee pests? *Journal of agricultural and food chemistry* 63:9427-9434.
490 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03914>
491
- 492 Halpern M et al (2015) The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. *Advances in*
493 *agronomy* 130:141-174. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2014.10.001>
494
- 495 Hamza B, Suggars A (2001) Biostimulants: myths and realities. *Turf Grass Trends* 8:6-10.
496
- 497 Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple
498 forms of catalase in tobacco leaves 45:1547-1551. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
499
- 500 Heil M (2008) Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* 1:41-61.
501
- 502 Jung HW et al (2008) Priming na imunidade sistêmica de plantas. *Ciência* 324:89-91.
503 <https://doi.org/10.1126/science.1170025>
504
- 505 Karban R, Baldwin IT (1997) *Induced Responses to Herbivory*. Chicago: The University of
506 Chicago Press.
507
- 508 Kempema LA et al (2007) *Arabidopsis transcriptome* changes in response to phloem-feeding
509 silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant*
510 *Physiology* 143:849-865. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090662>
511
- 512 Kerchev PI et al (2012) Plant responses to insect herbivory: interactions between
513 photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways. *Plant, cell &*
514 *environment* 35:441-453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02399.x>
515

- 516 Lukasiak I, Goławska S, Wójcicka A (2012). Effect of cereal aphid infestation on ascorbate
517 content and ascorbate peroxidase activity in triticale. Polish Journal of Environmental Studies
518 21:1937–1941.
- 519
- 520 Marques CEM et al (2015) Evaluation of *Ferrisia dasyliirii* (Cockerell) (Hemiptera:
521 Pseudococcidae) and non-prey foods on the development, reproduction, and survival of
522 *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae). The Coleopterists Bulletin,
523 69:343-348. <https://doi.org/10.1649/0010-065X-69.2.343>
- 524
- 525 Mohamadi P et al (2017) Population growth parameters of *Tuta absoluta* (Lepidoptera:
526 Gelechiidae) on tomato plant using organic substrate and biofertilizers. Journal of Insect
527 Science 17:2. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iex011>
- 528
- 529 Moran PJ, Thompson GA (2011) Molecular responses to aphid feeding in arabidopsis in
530 relation to plant defense pathways. Plant Physiology 125:1074-1085.
531 <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.1074>
- 532
- 533 Olaetxea M et al (2015) Abscisic acid regulation of root hydraulic conductivity and aquaporin
534 gene expression is crucial to the plant shoot growth enhancement caused by rhizosphere
535 humic acids. Plant Physiology 169:2587-2596. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00596>
- 536
- 537 Olivares FL et al (2017) Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop
538 promotion and mechanisms of action. Chem. Biol. Technol. Agric. 4:30.
539 <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0112-x>
- 540
- 541 Pantoja-Gomez LM. et al (2019) Common origin of Brazilian and Colombian populations of
542 the neotropical coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). Journal of
543 economic entomology 112:924-931. <https://doi.org/10.1093/jee/toy416>
- 544
- 545 Paré PW, Tumlinson JH (1999) Plant volatiles as a defense against insect
546 herbivores. Plant physiology 121:325-332. <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.325>
- 547
- 548 Penaflor MFGV, Bento JMS (2013) Herbivore-induced plant volatiles to enhance biological
549 control in agriculture. Neotropical Entomology 42:331-343. <https://doi.org/10.1007/s13744-013-0147-z>
- 550
- 551
- 552 Pereira RV (2021) The Effects of Biostimulants on Induced Plant Defense. Frontiers in
553 Agronomy 3: 630596. <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.630596>
- 554
- 555 Pieterse CMJ et al (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. Annual
556 Review of Phytopathology 52:347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- 557
- 558
- 559 Pinto-Zevallos DM et al (2013) Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas
560 contra insetos herbívoros. Química Nova 36:1395-1405. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000900021>
- 561
- 562
- 563 Price PW et al (1980) Interactions among three trophic levels: influence of plants on
564 interactions between insect herbivores and natural enemies. Annual Review of Ecology
565 and Systematics 11:41-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.11.110180.000353>

- 566
567 Rafael JA et al (2012) Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia. Holos.
568
- 569 Razmjou J et al (2011) Effect of vermicompost and cucumber cultivar on population growth
570 attributes of the *Melon aphid* (Hemiptera: Aphididae). J. Econ. Entomol. 104:1379-1383
571 <https://doi.org/10.1603/EC10120>
572
- 573 Reis PR et al (2010) Manejo Integrado das pragas do cafeeiro. Café arábica: do plantio à
574 colheita. Lavras: EPAMIG 10:573-688.
575
- 576 Rose MT et al (2014) A meta-analysis and review of plant-growth response to humic
577 substances: practical implications for agriculture. Advances in agronomy 124:37-89.
578 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800138-7.00002-4>
579
- 580 Rostás M, Turlings TC (2008) Induction of systemic acquired resistance in *Zea mays* also
581 enhances the plant's attractiveness to parasitoids. Biological Control 46:178-186.
582 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.04.012>
583
- 584 Santa-Cecília LVC et al (2007) Cochonilhas-farinhas em cafeeiros: bioecologia, danos e
585 métodos de controle. Boletim Técnico 79.
586
- 587 Santa-Cecília LVC et al (2009) Desenvolvimento de *Planococcus citri* (Risso, 1813)
588 (Hemiptera: Pseudococcidae) em cafeeiros. Acta Scientiarum 31:13-15.
589 <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v31i1.66034>
590
- 591 Santa-Cecília LVC, Silva KH (2020) Interaction between mealybugs (Pseudococcidae) and
592 coffee plants 15: e151695. <https://doi.org/10.25186/v15i.1695>
593
- 594 Santa-Cecília LVC et al (2013) Sobre o condicionamento alimentar na cochonilha-branca,
595 *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae). Revista Brasileira de Fruticultura
596 35:86-92. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000100011>
597
- 598 Santa-Cecília LVC, Souza B (2014) Cochonilhas-farinhas de maior ocorrência em
599 cafeeiros no Brasil. Informe Agropecuário, Belo Horizonte 35:45-54.
600
- 601 Shiavon M et al (2010) High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid
602 metabolism in maize (*Zea mays* L.). Journal of Chemical Ecology 36:662-669.
603 <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9790-6>
604
- 605 Shelz EA et al (2003) Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile
606 organic compounds in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences 100:10552-
607 10557. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633615100>
608
- 609 Shoohoven LM et al (2005) Insect-plant biology. Oxford: University Press on Demand 421 p.
610
- 611 Sobh IS et al (2012) Less is more: treatment with BTH and laminarin reduces herbivore-
612 induced volatile emissions in maize but increases parasitoid attraction. Journal of Chemical
613 Ecology 38:348-360. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0098-6>
614

- 615 Timm AE, Reineke A (2014) First insights into grapevine transcriptional responses as a result
616 of vine mealybug *Planococcus ficus* feeding. *Arthropod-Plant Interactions* 8:495-505.
617 <https://doi.org/10.1007/s11829-014-9340-1>
618
- 619 Turlings TC, Tumlinson JH (1992) Systemic release of chemical signals by
620 herbivore-injured corn. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the*
621 *United States of America* 89:8399-8402. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8399>
622
- 623 Van-Oosten MJ et al (2017) The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of
624 abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4:1-12.
625 <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
626
- 627 War AR et al (2012) Behavior mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant*
628 *Signaling & Behavior* 7:1306–1320. <https://doi.org/10.4161/psb.21663>
629
- 630 Webster B et al (2008) Identification of volatile compounds used in host location by the black
631 bean aphid, *Aphis fabae*. *Journal of chemical ecology* 34:1153-1161.
632 <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9510-7>
633
- 634 Yakhin OI et al (2017) Bioestimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in plant*
635 *science* 7:2049. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>
636
- 637 Zarate SI et al (2007) Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses
638 effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiology* 143:866-875.
639 <https://doi.org/10.1104/pp.106.090035>
640
- 641 Zhang PJ et al (2011) Suppression of jasmonic acid-dependent defense in cotton plant by the
642 mealybug *Phenacoccus solenopsis*. *PLoS One* 6:372-378.
643 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022378>
644
- 645 Zhang PJ et al (2015) The mealybug *Phenacoccus solenopsis* suppresses plant defense
646 responses by manipulating JA-SA crosstalk. *Scientific reports* 5:1-7.
647 <https://doi.org/10.1038/srep09354>
648
- 649 Zhang X, Shmidt RE (2000) Hormone-containing products' impact on antioxidant status of
650 tall fescue and creeping bentgrass subjected to drought. *Crop science* 40:1344-1349.
651 <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4051344x>

652

MATERIAL SUPLEMENTAR

653 **Figura Suplementar** Sistema de olfatômetro em 'Y' disposto dentro de uma caixa, para evitar
654 a influência de pistas visuais do ambiente, para bioensaio de atratividade da joaninha
655 *Cryptolaemus montrouzieri*.
656



657

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa tese explorou os efeitos das substâncias húmicas e da bactéria promotora de crescimento de plantas, *E. tabaci*, usadas de forma combinadas e isoladas, sobre as defesas químicas diretas e indiretas do cafeeiro contra a infestação pela cochonilha branca, *P. minor*. Confirmamos que ambos os bioestimulantes promoveram o crescimento das mudas de cafeeiro, das raízes e parte aérea. Observamos que todos os bioestimulantes utilizados, isolado ou combinado, promoveram redução da colonização da *P. minor* em plantas de café. Entretanto, plantas que continham substâncias húmicas foram as que apresentaram menor redução no desempenho dos insetos, além de estimular a atividade da enzima ascorbato peroxidase e superóxido dismutase. Porém, apenas a substância húmica usada sozinha estimulou a atividade da catalase. Todos os bioestimulantes também levaram ao aumento do teor de fenóis nas plantas, mas ao induzi-las com cochonilhas, apenas plantas tratadas com bactérias *E. tabaci* e o uso combinado dos dois bioestimulantes, apresentaram maior teor em relação às plantas controle.

Ao avaliar a defesa indireta, observamos a atratividade dos coccinelídeos pelos odores emitidos por plantas induzidas pela sua presa, independente da combinação, exceto plantas tratadas com substâncias húmicas frente a plantas com substâncias húmicas infestada pela cochonilha, em que o predador não discriminou os odores. Os bioestimulantes também influenciaram na escolha das joaninhas. Ao confrontar com o controle, todos bioestimulantes foram mais atrativos que ele, sendo o uso combinado deles semelhante ao tratamento com substâncias húmicas e superior ao tratamento com bactérias na emissão de voláteis induzidos pela herbivoria. Nas atividades das enzimas em plantas induzidas, o ascorbato peroxidase foi maior no tratamento tratado pela *E. tabaci* do que no tratamento com substâncias húmicas. A superóxido desmutase foi influenciada positivamente pelo tratamento com substâncias húmicas, pois o uso isolado e combinado delas apresentaram maior atividade da enzima, ao passo que, a catalase, foi reduzida por ela. Além disso, nossos resultados mostraram que a infestação pela *P. minor* aumentou em 2 vezes os níveis de ácido salicílico, entretanto, o tratamento com bioestimulantes não influenciou seu nível na planta. Em contraste, a infestação da cochonilha não alterou os níveis de ácido jasmônico, enquanto o tratamento de ambos os bioestimulantes promoveu maior aumento ao compará-los de forma isolada.

Acreditamos com nossos resultados, que possivelmente essa interação leva a indução dos *priming* de defesa, fazendo com que as plantas de cafeeiro se tornem aptas a liberar compostos que auxiliem na defesa contra a cochonilha *P. minor* e no recrutamento do seu inimigo natural, a joaninha *C. montrouzieri*. Entretanto, apesar do seu potencial na defesa direta e indireta em cafeeiro contra a cochonilha, nossos resultados apontam que não houve efeito sinérgico desses bioestimulantes nos testes realizados.

Assim, nossos estudos contribuíram para preencher uma importante lacuna não só para a literatura, como também para o avanço de técnicas de manejo sustentáveis, podendo sintetizar esses compostos e aplicar no controle biológico da cochonilha em café. No entanto, esses são estudos em ambiente controlado de laboratório e semi-campo, sendo importante destacar a importância da sua aplicação em condições de campo, previsto para estudos futuros.