

**KÁRENN CHRISTINY PEREIRA SANTOS**

**EFEITO DE *Pochonia chlamydosporia* EM PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) NO COMPORTAMENTO DE OVIPOSIÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima

Coorientador: Manuel Alejandro Ix Balam

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S237e  
2021 Santos, Kárenn Christiny Pereira, 1996-  
Efeito de *Pochonia chlamydosporia* em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) no comportamento de oviposição e desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) / Kárenn Christiny Pereira Santos. – Viçosa, MG, 2021.  
I dissertação eletrônica (25 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 23-25.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.154>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Fungos endofíticos. 2. Traça-do-tomateiro. 3. Relação inseto-planta. 4. Relação planta-fungo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.4

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

**KÁRENN CHRISTINY PEREIRA SANTOS**

**EFEITO DE *Pochonia chlamydosporia* EM PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) NO COMPORTAMENTO DE OVIPOSIÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)**

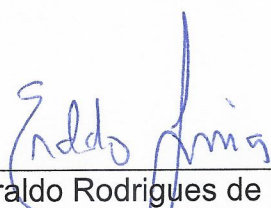
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho 2021.

Assentimento:



Kárenn Christiny Pereira Santos  
Autora



Eraldo Rodrigues de Lima  
Orientador

*Dedico este trabalho à toda minha família.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia pela oportunidade de realização do mestrado.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À minha mãe Edna, por sempre me apoiar, acreditar em mim e me ensinar que nunca podemos desistir daquilo que almejamos, e por ser meu maior exemplo de determinação.

A meu pai Wellington pelo amor, apoio e suporte.

Aos meus irmãos Kátia, Luiz e Fellipe por todo amor e apoio em todos os momentos.

À toda minha família por todo apoio e amor, independente da distância física.

Aos meus amigos Douglas, Wallyson, Carol, Luana, Elisa, Nathane, Willian, Kely, Tainá, Maria Helena, Andressa, Camila, Thereza, Luana, Paula e Pérola, por sempre me mostrarem a leveza da vida e ensinar que os momentos de dificuldade, são só momentos.

Ao professor Eraldo por todos os ensinamentos, amizade, orientação e por confiar em mim para realização desse projeto de mestrado.

A todos os professores do departamento por compartilharem grandiosamente seus ensinamentos.

À Angélica e aos professores Leandro e Humberto Ramos, pela parceria e suporte neste projeto.

À Natália, Carlos e Suelen, por todos os momentos de ajuda, suporte técnico e emocional, em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos, Carlos, Giovana, Manuel, Natália, Sofia, Suelen, Pedro e Wellington, pelos bons momentos.

A todos do Grupo de Estudos em Entomologia INSECTUM por toda amizade e ensinamentos compartilhados.

*“...a tribulação produz a paciência,  
E a paciência a experiência, e a experiência a esperança.  
E a esperança não traz confusão.” Romanos 5:3-5*

## RESUMO

SANTOS, Kárenn Christiny Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Efeito de *Pochonia chlamydosporia* em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) no comportamento de oviposição e desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae).** Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima. Coorientador: Manuel Alejandro Ix Balam.

*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), é uma das principais pragas do tomateiro a nível mundial. Dentre os sistemas disponíveis para o manejo sustentável de pragas agrícolas, tem-se a utilização de antagonistas como agentes de controle biológico e/ou endófitos. As interações endófito-planta-herbívoro podem influenciar a preferência e o desempenho de insetos herbívoros. *Pochonia chlamydosporia* é um fungo endofítico de raízes de plantas que promove o crescimento vegetal sem causar lesões na planta hospedeira. É possível que a interação de *P. chlamydosporia* com as raízes de plantas de tomate possa afetar o perfil metabólico da planta e alterar o comportamento de oviposição das fêmeas de *T. absoluta*, bem como o desenvolvimento da fase jovem. Assim, o objetivo do presente trabalho foi determinar o efeito da presença do fungo endofítico *P. chlamydosporia* nas raízes de plantas de tomate, no comportamento de oviposição e desenvolvimento de indivíduos de *T. absoluta*. Uma planta inoculada e uma planta controle, separadas diagonalmente 15 cm, foram colocadas numa gaiola de madeira, coberta com organza, onde 4 fêmeas acasaladas de *T. absoluta* foram liberadas na gaiola e o número de ovos em cada planta foi contado após 12h. Os estágios de desenvolvimento foram também monitorados, e o perfil metabólico dos tratamentos foi feito. Observamos que fêmeas de *T. absoluta* colocaram uma maior proporção de ovos em plantas controle (55,75%) do que em plantas inoculadas com *P. chlamydosporia* (44,25%). Ademais, não foi observado alterações no desenvolvimento das larvas. Foram identificados fito-hormônios, flavonóides e fenólicos encontrados na folha das plantas inoculadas e controle, embora sem diferença significativa entre os grupos. Portanto, a presença do fungo, *P. chlamydosporia* pode afetar a escolha do hospedeiro pelas fêmeas de *T. absoluta* mesmo sem haver um efeito no desenvolvimento da prole, e mudanças nos metabólitos secundários.

**Palavras-chave:** Fungo endofítico. Traça-do-tomateiro. Interação planta-inseto-microrganismo.

## ABSTRACT

SANTOS, Kárenn Christiny Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Effect of *Pochonia chlamydosporia* on tomato plants (*Solanum lycopersicum*) on oviposition behavior and development of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae).** Adviser: Eraldo Rodrigues de Lima. Co-adviser: Manuel Alejandro Ix Balam.

*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) is one of the leading worldwide tomato pests. Among available systems for the sustainable management of agricultural pests, antagonists are used as biological control agents or endophytes. The endophyte-plant-herbivore interactions can influence the preference and performance of herbivorous insects. *Pochonia chlamydosporia* is an endophytic plant root fungus that promotes plant growth without causing damage to the host plant. It is possible that the interaction of *P. chlamydosporia* with the roots of tomato plants may affect the metabolic profile of the plant and alter the oviposition behavior of the females of *T. absoluta*, as well as the development of the young phase. Thus, our goal was to determine the effect of an endophytic fungus *P. chlamydosporia* in the root of tomato plants on oviposition behavior and development of *T. absoluta* individuals. An inoculated plant and a control plant, separated diagonally 15 cm, were placed in a wooden cage, covered with organza, where 4 females mated with *T. absoluta* were released into the cage and the number of eggs in each plant was counted after 12h. The stages of development were also monitored, and the metabolic profile of the treatments was made. We observed that *T. absoluta* females laid a higher proportion of eggs on control plants (55.75%) than on plants inoculated with *P. chlamydosporia* (44.25%). Furthermore, it was not found alterations in the development of *T. absoluta*. Phytohormones, flavonoids and phenolics found in the leaf of inoculated and control plants were identified, although there was no significant difference between the groups. Therefore, the presence of the fungus, *P. chlamydosporia* can affect the choice of host by the females of *T. absoluta* even without an effect on the development of offspring, and changes in secondary metabolites.

**Keywords:** Endophytic fungus. Tomato moth. Plant-insect-microorganism interaction.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
2.1 Criação de <i>Tuta absoluta</i> .....	12
2.2 Padronização do peso dos indivíduos de <i>T. absoluta</i> e obtenção de fêmeas acasaladas.....	12
2.3 Plantas de tomate .....	12
2.4. Obtenção de clamidósporos de <i>Pochonia chlamydosporia</i> .....	14
2.5. Plaqueamento do solo com <i>P. chlamydosporia</i> .....	14
2.6. Preferência de oviposição de <i>T. absoluta</i> .....	14
2.7. Desenvolvimento de <i>T. absoluta</i> .....	14
2.8. Quantificação de fito-hormônios, flavonóides e fenólicos .....	15
2.9. Análise de dados.....	16
3. RESULTADOS .....	17
4. DISCUSSÃO .....	21
REFERÊNCIAS .....	23

## 1. INTRODUÇÃO

*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), é uma das principais pragas do tomateiro a nível mundial, sendo relatada em 50 países ao longo da América, África, Europa e Ásia (Urbaneja *et al.* 2009; EPPO, 2017; Santana *et al.* 2019). As larvas de *T. absoluta* minam principalmente as folhas das plantas, podendo causar perdas de até 100% de produção (Biondi *et al.* 2018; Desneux *et al.* 2010; Desneux *et al.* 2011). O controle químico é o principal método de controle de *T. absoluta*, porém o uso indiscriminado de inseticidas tem ocasionado resistência na praga e danos ao meio ambiente (Guedes, 2017).

Dentre os sistemas disponíveis para o manejo sustentável de pragas agrícolas, tem-se a utilização de antagonistas como agentes de controle biológico e/ou endófitos (Tolba *et al.* 2021). No Manejo Integrado de Pragas (MIP), o controle biológico com microrganismos é uma alternativa ao uso de produtos químicos (Montesinos, 2003; Kumar *et al.* 2008). Microrganismos contrariam a ação de patógenos ou insetos, podendo apresentar atividade pesticida (Kumar *et al.* 2008), com potencial para serem utilizados no MIP. Por exemplo, fungos endofíticos produzem metabólitos secundários, como alcaloides, com atividade inseticida que ajudam na resistência da planta hospedeira a seus insetos herbívoros (Kumar & Kaushik, 2013). As interações endófito-planta-herbívoro podem influenciar a preferência e performance de insetos herbívoros (Oki *et al.* 2009).

*Pochonia clamydosporia* é um fungo endofítico de raiz de plantas que promove o crescimento vegetal sem causar lesões na planta hospedeira (Larriba *et al.* 2015; Escudero & Lopez-Llorca, 2012; Kozyrovska, 2013). A presença *P. clamydosporia* em raízes de plantas de tomate expressam reguladores gênicos associados à defesa da planta (Pentimone *et al.* 2018), o que poderia ser usado no controle de *T. absoluta*. O endofitismo de *P. clamydosporia* pode ativar ou inibir a expressão de genes de defesa precoce em folhas de plantas e, embora sua inoculação ocorra no solo, o fungo pode causar um efeito “*botton-up*” nas folhas, mediado por sinais bioquímicos (Tolba *et al.* 2021).

A condição fisiológica das plantas influencia na seleção da planta hospedeira por insetos herbívoros, já que as fêmeas utilizam pistas sensoriais para localizar e escolher onde ovipositar (Bernays & Chapman, 1994). A escolha da planta hospedeira é importante para as fêmeas de insetos herbívoros, pois será o recurso alimentar da

sua prole e, conseqüentemente, afetará o desenvolvimento dos indivíduos (Jaenike, 1978). Fêmeas de *T. absoluta*, por exemplo, utilizam Compostos Orgânicos Voláteis (COV) liberados pela planta de tomate para se orientar e localizar a planta na qual irão ovipositar, sendo o contato com a folha essencial para indução da oviposição (Proffit *et al.* 2011; Arce *et al.* 2017). Variações na composição dos COV das plantas de tomate podem ser detectados pelas fêmeas de *T. absoluta*, o que influencia seu comportamento de escolha da planta hospedeira para oviposição (Proffit *et al.* 2011).

A presença de microrganismos no solo pode afetar a escolha das fêmeas de *T. absoluta* pela planta hospedeira e o desenvolvimento da prole (Arce *et al.* 2017), e sabe-se que fungos endofíticos podem induzir alterações no metabolismo da planta hospedeira (Ludwig-Muller, 2015). Portanto, a interação de *P. chlamydosporia* com a raiz de plantas de tomate poderia afetar o perfil de COV liberados pela planta e, portanto, alterar o comportamento de oviposição das fêmeas de *T. absoluta*. Assim, o objetivo do presente trabalho foi determinar o efeito da presença do fungo endofítico *P. chlamydosporia* na raiz de plantas de tomate, no comportamento de oviposição e desenvolvimento de indivíduos de *T. absoluta*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Criação de *Tuta absoluta*

Indivíduos de *T. absoluta* foram criados no Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brasil. Ovos de *T. absoluta* depositados em folhas de tomate foram mantidos em gaiolas de madeira (46x46x46cm) cobertas com organza. Após a eclosão, as lagartas foram alimentadas *ad libitum* com folhas frescas de tomate até o início da fase de pupa. As pupas foram retiradas de forma manual das folhas, colocadas em placas Petri e inseridas em gaiolas de acrílico (30x30x30cm) para emergência dos adultos. Os adultos foram alimentados *ad libitum* com solução de açúcar à 10% embebida em algodão, e para as fêmeas ovipositarem folhas frescas de tomate foram inseridas nas gaiolas. A população de *T. absoluta* foi mantida numa sala de criação a  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12:12 (claro: escuro) e  $70 \pm 5\%$  de umidade relativa (U.R.) (Speridião, 2020).

### 2.2 Padronização do peso dos indivíduos de *T. absoluta* e obtenção de fêmeas acasaladas

Pupas de *T. absoluta* foram sexadas conforme a localização do poro genital (Coelho e França, 1987) e pesadas em balança analítica (Shimadzu AUW220D). O peso das pupas foi padronizado para  $1,83 \pm 0,38$  mg (média  $\pm$  desvio padrão) para machos, e  $2,2 \pm 0,51$  mg para fêmeas (Speridião, 2020), a fim de eliminar o efeito do peso nos experimentos. Cada pupa foi colocada em uma gaiola plástica de 70 mL (devidamente etiquetada), a qual uma das extremidades era coberta com organza para circulação de ar. As pupas foram mantidas em sala de criação nas mesmas condições descritas na criação de *T. absoluta*. Casais (com 2 dias de idade) foram formados, e as fêmeas acasaladas foram utilizadas nos experimentos de preferência de oviposição.

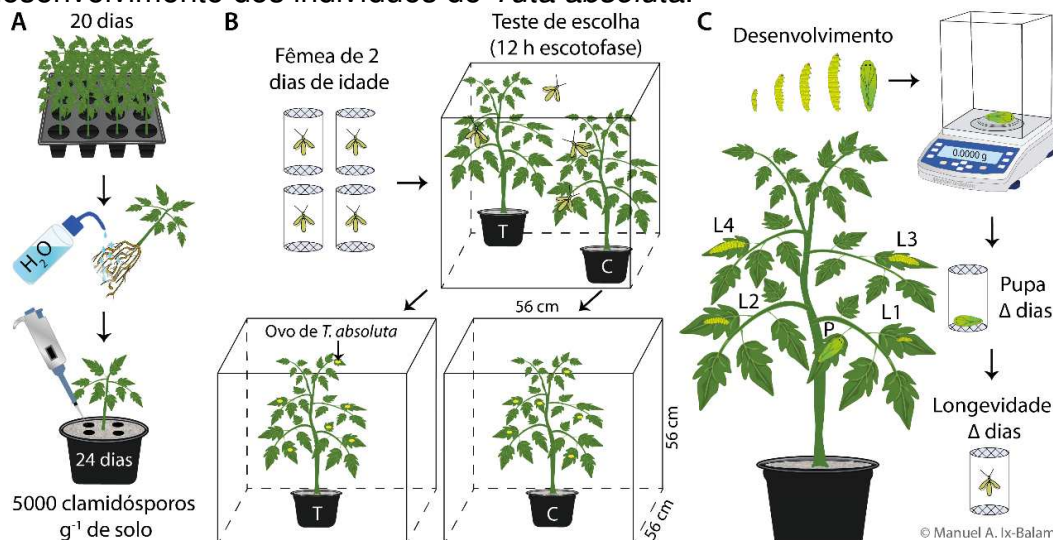
### 2.3 Plantas de tomate

Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), variedade Santa Clara, foram utilizadas na criação de *T. absoluta*, nos testes de preferência de oviposição e desenvolvimento. As plantas foram obtidas de sementeira em bandejas plásticas contendo substrato para hortaliças. As bandejas foram colocadas em câmara de germinação (TE-4000/1) com fotoperíodo de 12:12 (claro: escuro). As plântulas, com duas folhas definitivas (segundo par de folhas em expansão, além do cotiledonar),

foram transplantadas para vasos de 3L contendo condicionador de solo (MecPlant®). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação a  $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 5\%$  de U.R. e NPK (10:10:10) foram fornecidos a cada 7 dias. Estas foram utilizadas para manutenção da criação de *T. absoluta*.

Para os testes de preferência de oviposição, plantas de tomate foram transplantadas para vasos (2L) contendo solo formado pela mistura de areia e latossolo vermelho (proporção 1:1), 20 dias após a semeadura. Previamente, o solo foi esterilizado a 120 °C durante 2 h e umedecido diariamente durante pelo menos 5 dias antes do transplante. A umidificação do solo foi feita para mitigar os efeitos dos gases liberados durante a esterilização, a fim de deixá-lo propício para receber as plantas. Após o transplante, as plantas foram divididas em dois grupos: (I) plantas com a raiz inoculada com *P. chlamydosporia* (plantas inoculadas) e (II) plantas sem fungo na raiz (plantas controle). Para inoculação na raiz, quatro buracos ( $\varnothing \sim 1,5\text{cm}$  e 2cm de profundidade) foram feitos envolta do caule da planta, adicionando 5000 clamidósporos de *P. chlamydosporia/g*<sup>-1</sup> de solo (Figura 1A). As plantas (inoculadas e controle) foram mantidas em casa de vegetação como descrito acima e irrigadas sempre que necessário, de forma que o solo se mantivesse úmido. Os experimentos iniciaram 24 dias após a inoculação, tempo suficiente para o estabelecimento do fungo na raiz. Sendo assim, as plantas (inoculadas e controle) utilizadas nos testes de preferência de oviposição tinham 44 dias de idade.

Figura 1 - Metodologia experimental. (A) Transplante e inoculação de *Pochonia chlamydosporia*; (B) teste de preferência; (C) monitoramento do desenvolvimento dos indivíduos de *Tuta absoluta*.



Fonte: Santos (2021).

## **2.4 Obtenção de clamidósporos de *P. chlamydosporia***

O fungo *P. chlamydosporia* (isolado Pc-10) foi obtido da micoteca do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides da UFV. Clamidósporos de *P. chlamydosporia* foram obtidos em meio sólido (150 g de arroz umedecido com 40 mL de água destilada e autoclavado 20 minutos a 120 °C). Dez discos ( $\varnothing = 9$  mm) de *P. chlamydosporia*, cultivado em batata dextrose agar (BDA), foram acrescentados ao meio sólido e mantidos a 27°C. Após 21 dias, os clamidósporos foram recuperados com extração aquosa, filtrados com gazes e a suspensão calibrada em câmara de Neubauer.

## **2.5 Plaqueamento do solo com *P. chlamydosporia***

Para confirmar o estabelecimento do fungo na raiz das plantas inoculadas e determinar as unidades formadoras de colônia (UFC) do fungo no solo, foram coletados 1g de solo de cada vaso. O solo foi diluído em água esterilizada, previamente autoclavados por 30 minutos a 120 °C. Para as diluições, 1g de solo inicialmente foi colocado em 9mL de água, numa concentração inicial de  $10^{-1}$ ; posteriormente foram agitadas no Vortex Mixer (KASVI basic K45-2820) por 20 segundos, e 1mL dessa diluição foi colocada em outro tubo de ensaio contendo 9mL de água esterilizada. Esse mesmo procedimento foi repetido mais uma vez, até que a solução fosse reduzida a  $10^{-3}$ . As diluições foram plaqueadas em meio semi-seletivo (Gaspard *et al.* 1990), com 5 repetições por tratamento. As placas foram mantidas por 7 dias a 28 °C para monitorar o crescimento do fungo.

## **2.6 Preferência de oviposição de *T. absoluta***

Uma planta inoculada e uma planta controle, separadas diagonalmente 15 cm, foram colocadas numa gaiola (56x56x56cm) de madeira, coberta com organza (Figura 1B). 4 fêmeas acasaladas de *T. absoluta* foram liberadas na gaiola e o número de ovos em cada planta foi contado após 12 h. Os testes foram desenvolvidos durante a escotofase, período de oviposição de *T. absoluta* (Proffit *et al.* 2011), numa sala com condições controladas de temperatura, U.R. e fotoperíodo. Para cada tratamento (inoculada e controle) foram realizadas 28 repetições. As plantas foram aclimatadas na sala de realização dos testes, 24h antes da execução dos mesmos.

## **2.7 Desenvolvimento de *T. absoluta***

Subsequente ao teste de preferência de oviposição, cinco plantas de cada grupo (inoculada e controle) foram separadas e colocadas em gaiolas individuais (Figura 1B). O número de ovos por planta foi padronizado para 3. A padronização teve

como finalidade: (I) garantir alimento suficiente para todas as lagartas completarem seu ciclo de vida, (II) evitar competição por alimento entre os indivíduos, e (III) alcançar níveis de dano semelhantes em todas as plantas (Arce *et. al.*, 2017). Cada planta foi examinada duas vezes por dia e, para cada indivíduo de *T. absoluta*, foi avaliado o desenvolvimento e duração (em dias) de cada estágio (ovo, lagarta, pupa e adulto) (Figura 1C). Após a fase de lagarta, as pupas foram pesadas em balança analítica e colocadas individualmente em gaiolas de 70 mL para observação do tempo de emergência do adulto (Figura 1C). Mortalidade de indivíduos (em quaisquer fases do desenvolvimento), deformidade nas pupas e pupas que não saíram os adultos, em algum dos tratamentos, também foi registrado. Foram avaliados 15 indivíduos para cada tratamento (inoculada e controle).

## 2.8 Quantificação de fito-hormônios, flavonóides e fénolicos

Para a extração dos metabólitos, foram utilizados 150 mg de folhas, acrescidos de 400 µL de metanol, isopropanol e solução de ácido acético (20: 79: 1 v / v / v), e o método de extração foi realizado de acordo com Vital (2019). Os metabólitos foram separados por cromatografia de ultra-performance do tipo UHPLC-MS (Agilent), utilizando coluna C18 (50 mm x 1,0 mm DI, partícula 1,7 µm e 300 Å), acoplada online ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo QqQ. O equipamento foi operado no modo MRM monitorando compostos fenólicos (4 - hidroxyflavone, 4-hidroxi-3-metoxi-cinnamaldeído, 7 - hidroxyflavone, ácido benzoico, ácido cafeico, catecol, calcona, ácido clorogênico, coumarina, curcumina, daidzeina, ácido ferúlico, genisteína, isoferúlico, naringenina, ácido neoclorogênico, n-propil galato, ácido p-coumarico, quercetina, ácido sinápico, álcool sinapílico, ácido seringáico, ácido trans-cinnâmico, vanillina, 3,5-dihidroxi) e flavonoides (kaempferol, quercetina, miricetina, catequina, epicatequina, rutina, morina, luteolina, apigenina, oerentina, isoorientina, vitexina, isovitexina, naringina, hesperetina, naringenina, hesperidina, calcona, floretina, daidzeina e genisteína). Para os fito-hormônios, a massa do íon/fragmento precursor estabelecido foi monitorada pela fragmentação de cada molécula: citocinas (zeatina) (220/136), precursor do etileno, 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) (102, 1/56,2), ácido abscísico (ABA) (263/153), ácido indolacético (AIA) (176/130), ácido salicílico (AS) (137/93), ácido geberélico - 3 (AG3) (345/142,9), ácido jasmônico (AJ) (209/59), ácido geberélico - 4 (AG4) (331/21). Citocinas, AIA e ACC foram escaneadas no modo positivo, enquanto ABA, AG3, AG4, AJ e AS no modo negativo.

Neste método, os tempos de retenção e as transições MRM (monitoramento de reação múltipla), gerados para cada padrão foram tabulados para formar a lista de transição que foi utilizada como entrada no pacote Skyline, permitindo análises quantitativas dos compostos específicos identificados nas folhas do tomateiro. Os dados foram analisados no software Skyline e com a obtenção de valores de área dos picos, foi efetuada a quantificação absoluta (ng/g de tecido vegetal) utilizando-se a curva padrão de cada fenólico, flavonoide e fito-hormônio.

### **2.9 Análises estatísticas**

O efeito da inoculação de *P. chlamydosporia* sobre a proporção de ovos de *T. absoluta* colocados em cada planta foi analisado com um teste Qui-Quadrado.

O efeito da inoculação de *P. chlamydosporia* sobre: I) as concentrações dos metabólitos das plantas, II) tempo de desenvolvimento de ovos, III) lagartas (L1, L2, L3, L4) e pupas, IV) peso da pupa e V) longevidade do adulto de *T. absoluta* foi analisado com um GLM com distribuição de erro gaussiana.

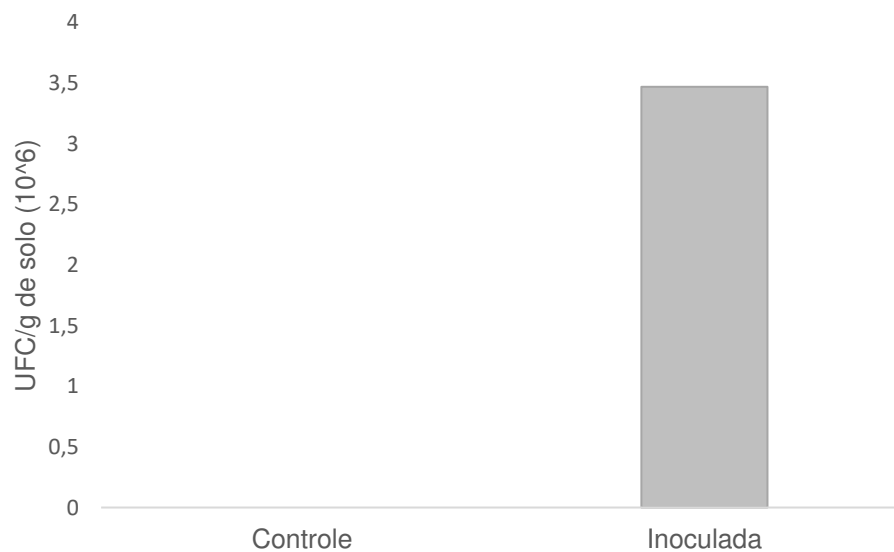
As análises foram seguidas por análise residual para verificar a adequação da distribuição de erros e ajuste do modelo. Todas as análises estatísticas foram feitas no programa estatístico R (R Development Core Team, 2016).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Plaqueamento do solo com *P. chlamydosporia*

Foram identificadas, em média, 3,47 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de solo, nas plantas inoculadas com *Pochonia chlamydosporia*, e nenhuma UFC foi identificada no solo das plantas controle (Figura 2).

Figura 2 – Média do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Pochonia chlamydosporia* por grama de solo, nas plantas de tomate controle e das plantas inoculadas.

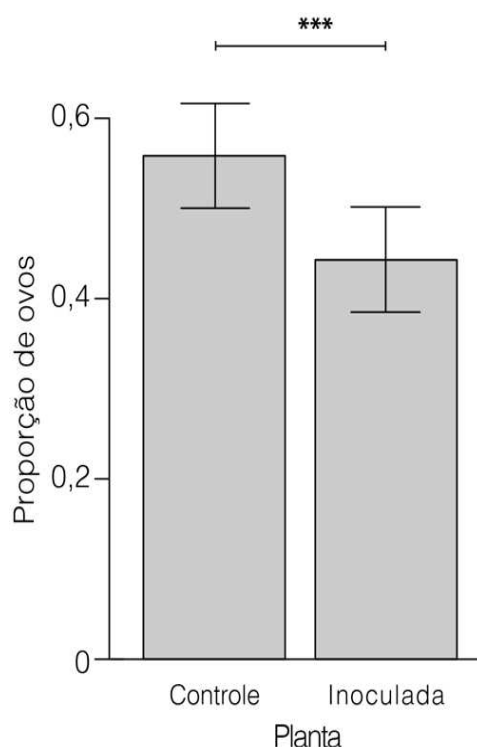


Fonte: Santos (2021).

#### 3.2 Preferência de oviposição de *T. absoluta*

Fêmeas de *T. absoluta* colocaram uma maior proporção de ovos em plantas controle (55,75%) do que em plantas inoculadas com *P. chlamydosporia* (44,25%) (Figura 3). As fêmeas ovipositaram, em média, 11 ovos nas plantas controle e 9 ovos nas plantas inoculadas.

Figura 3 - Proporção de ovos de *Tuta absoluta* colocados em plantas de tomate controle e plantas inoculadas com *Pochonia chlamydosporia*. \*\*\* indica diferença entre tratamentos ( $p < 0,001$ ).



Fonte: Santos (2021).

### 3.2 Desenvolvimento de *T. absoluta*

A duração (em dias) dos estágios de desenvolvimento de *T. absoluta* não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos. O peso da pupa também não foi influenciado pelos tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros de desenvolvimento para indivíduos de *Tuta absoluta* alimentados com plantas de tomate controle e plantas inoculadas com *P. chlamydosporia*.<sup>d</sup> = valores correspondem a dias de desenvolvimento. Valores correspondem ao valor da média  $\pm$  desvio padrão.

Parâmetro	Planta controle	Planta com <i>P. chlamydosporia</i>	Valor <i>P</i>
Tempo larval total <sup>d</sup>	13,13 $\pm$ 2,79	12,55 $\pm$ 1,24	0,4364
Estágio de pupa <sup>d</sup>	5,53 $\pm$ 0,51	5,88 $\pm$ 0,92	0,2444
Peso pupa (mg)	3,07 $\pm$ 0,66	3,15 $\pm$ 0,53	0,6775
Longevidade do adulto <sup>d</sup>	12,87 $\pm$ 0,66	15 $\pm$ 4,72	0,237
Tempo total do desenvolvimento <sup>d</sup>	34,93 $\pm$ 7,62	37,05 $\pm$ 5,74	0,3692

Fonte: Santos (2021).

### **3.3 Quantificação de fenólicos, flavonóides e fito-hormônios.**

Fenólicos, flavonóides e fito-hormônios foram detectados nas plantas controle e com presença de *P. chlamydosporia* através do monitoramento de reação múltipla (MRM) (Tabela 2). Os compostos fenólicos foram ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido neoclorogênico, ácido p-coumarico e ácido sinápico. Os flavonóides foram hesperitina e rutina. Os fito-hormônios foram ácido abscisico, ácido indolilacético e ácido 1-aminociclopropano carboxílico. A concentração de cada composto em ng/g de tecido vegetal não apresentou diferenças significativas entre plantas controle e plantas inoculadas com *P. chlamydosporia* (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração média (em ng/ g tecido vegetal) de fito-hormônios, compostos fenólicos e flavonóides em folhas de plantas de tomate controle e com presença de *P. chlamydosporia*. Valor *P* = comparação da concentração do composto entre as amostras controle e inoculadas com *P. chlamydosporia* analisado com um GLM com distribuição de erro gaussiana.

	Composto	Planta	Média	Erro padrão	Valor <i>P</i>
Fito-hormônios	Ácido Abscísico (ABA)	Controle	36,7794	2,740565	0,571
		<i>P. chlamydosporia</i>	33,17883	3,558481	
	Ácido Indolilacético (AIA)	Controle	3,196227	0,04334004	0,3733
		<i>P. chlamydosporia</i>	3,062571	0,0882260	
	Ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC-1)	Controle	1,802212	0,61402277	0,06887
		<i>P. chlamydosporia</i>	1,384369	0,05245952	
Fenólicos	Ácido cafeico	Controle	10,62173	3,720053	0,3007
		<i>P. chlamydosporia</i>	10,26935	3,551377	
	Ácido clorogênico	Controle	10819872	2958518,7	0,2474
		<i>P. chlamydosporia</i>	6657012	637631,2	
	Ácido ferúlico	Controle	2,452854	0,2229867	0,7191
		<i>P. chlamydosporia</i>	4,682722	2,3493112	
	Ácido neoclorogênico	Controle	3470,734	611,0493	0,8306
		<i>P. chlamydosporia</i>	3602,485	302,9731	
	Ácido p-coumarico	Controle	4,146606	1,1179037	0,6722
		<i>P. chlamydosporia</i>	4,493533	0,5089231	
	Ácido sinápico	Controle	3,32851	0,907199	0,4246
		<i>P. chlamydosporia</i>	2,948109	0,907199	
Flavonóides	Hesperetina	Controle	130805,99	47174,043	0,9219
		<i>P. chlamydosporia</i>	59567,16	4493,429	
	Rutina	Controle	63443,63	23115,35	0,9251
		<i>P. chlamydosporia</i>	28404,51	2291,23	

Fonte: Santos (2021).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo observamos um efeito da presença do fungo *P. chlamydosporia* na proporção de ovos colocados por *Tuta absoluta* em folhas de tomate, mostrando uma escolha maior por plantas com ausência deste fungo. Prevíamos que fêmeas de *T. absoluta* teriam preferência por ovipositar em plantas sem *P. chlamydosporia* na raiz, quando comparadas com plantas infestadas pelo fungo endofítico, e nossos resultados suportam esse comportamento de oviposição.

A presença de microrganismos no solo pode acarretar alterações quantitativas e qualitativas no perfil de voláteis liberados pela planta (Arce *et al.*, 2017). Assim, é possível que a interação *P. chlamydosporia* com raízes de plantas de tomate tenha influenciado no perfil dos voláteis dessas plantas. Como para *T. absoluta* alterações nos COV influenciam na sua escolha pela planta hospedeira, uma vez que pistas químicas são essenciais para localização (Proffit *et al.*, 2011), a menor proporção de ovos em plantas inoculadas, quando se comparada com plantas controle, pode ser justificada por esse fator. Endófitos podem prover proteção às plantas contra insetos herbívoros, podendo minimizar ataques (Bamisile *et al.* 2018), e podem causar alterações no metabolismo da planta (Ludwig-Muller, 2015). Esses fatores podem causar um efeito nas folhas da planta, influenciando na atratividade das fêmeas de *T. absoluta*, uma vez que o contato com a folha ser essencial para indução da oviposição (Proffit *et al.* 2011), podendo então a presença do endófito *P. chlamydosporia* ter acarretado numa menor oviposição nas plantas inoculadas.

Os parâmetros de desenvolvimento de *T. absoluta* avaliados nesse estudo não foram influenciados pela presença de *P. chlamydosporia* na raiz das plantas de tomate. Esse resultado pode ser explicado à luz dos resultados acerca dos fito-hormônios, fenólicos e flavonóides presentes nas folhas de tomate, os quais não apresentaram diferenças na concentração dos compostos entre os dois tratamentos. Os fito-hormônios primários associados com a defesa da planta, como ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS) e Etileno (ET) não foram detectados nas nossas amostras, o que pode justificar o desenvolvimento dos indivíduos de *T. absoluta* não ter sido afetado.

*Pochonia chlamydosporia* é capaz de promover crescimento de plantas de tomate, reduzir o tempo para floração e surgimento dos frutos, bem como possui

capacidade de sintetizar fito-hormônios, como ácido indolacético (AIA) (Zavala-Gonzalez *et al.*, 2015). Em um estudo de Khan *et al.* (2016), foi observado também o efeito de endófitos promovendo crescimento de plantas de tomate *Solanum lycopersicum*, mediante atividade de produção de ácido indolacético (AIA) e ácido aminociclopropano carboxílico (ACC). Esses mesmos fito-hormônios foram identificados nas nossas amostras. Essas propriedades de microrganismos endofíticos auxiliam para que a planta de tomate fique mais vigorosa e nutritiva, e conseqüentemente se tornando um recurso de grande valor nutritivo também para desenvolvimento do herbívoro.

A presença de flavonóides em algumas plantas pode ser favorável para alguns insetos, pois estes podem utilizar esses compostos aderindo-os à sua cutícula corporal como forma de proteção contra patógenos e predadores, ou até mesmo em suas asas para atrair parceiros (Simmonds, 2003). Plantas colonizadas por microrganismos benéficos apresentam uma indução significativa de compostos fenólicos, que estão associados com a saúde da planta (Wallis & Galarneau, 2020). Esses fatores podem ter contribuído para que, tanto as plantas inoculadas por *P. chlamydosporia* quanto plantas controle, tenham se apresentadas propícias para os indivíduos de *T. absoluta* se desenvolverem e não apresentar diferenças no tempo de desenvolvimento (em dias), bem como no peso da pupa no presente trabalho. Os mesmos flavonóides e fenólicos foram identificados para os dois tratamentos, e a concentração dos mesmos nas folhas de tomate não diferiu, mostrando um não efeito de *P. chlamydosporia* nas folhas de tomate neste estudo.

Nesse estudo, concluímos que plantas de tomate com presença do fungo endofítico *P. chlamydosporia* pode afetar a escolha do hospedeiro pelas fêmeas de *T. absoluta*, mesmo sem haver um efeito no desenvolvimento da prole, e mudanças nos metabólitos secundários. Mais estudos são necessários sobre quais COV dessa interação tem maior importância na atratividade desses insetos e como podem ser usados no campo e/ou nas técnicas de manejo integrado desta praga.

## REFERÊNCIAS

- Arce C.C., Machado R.A., Ribas N.S, Cristaldo P.F, Ataíde L.M., Pallini A., Carmo F.M., Freitas L.G, Lima E. (2017). Nematode root herbivory in tomato increases leaf defenses and reduces leaf miner oviposition and performance. *Journal of Chemical Ecology* 43: 120-128.
- Bamisile B.S., Dash C. K, Akutse K.S., Keppanan R., Wang L. (2018). Fungal endophytes: beyond herbivore management. *Frontiers Microbiology* 9: 544.
- Bernays E.A & Chapman R.F. (1994). Host-plant selection by phytophagous insects. Springer Science & Business Media TS, 1994; Volume 2 ISBN: 978-0-412-03131-1.
- Biondi A., Guedes R.N.C, Wan F.H., Desneux N. (2018). Ecology, worldwide spread, and management of the invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*: past, present, and future. *Annual Review of Entomology* 63: 239–258.
- Coelho M.D.C. & França, F. H. (1987). Biologia, quetotaxia da larva e descrição da pupa e adulto da traça-do-tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 22: 129-135.
- Desneux N., Wajnberg E., Wyckhuys K. (2010). Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science* 83: 197–215.
- Desneux N., Luna M.G., Guillemaud T., Urbaneja A. (2011). The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *Journal of Pest Science* 84: 403–89.
- EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2017). Global Database. Available online at: <https://gd.eppo.int> (accessed January, 2021).
- Escudero N. & Lopez-Llorca N.V. (2012). Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Symbiosis* 57: 33–42.
- Gaspard J.T., Jaffee B.A., Ferris H. (1990). Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. *Journal of Nematology* 22: 207-213.
- Guedes R.N.C. (2017). Insecticide resistance, control failure likelihood and the first law of geography. *Pest Management Science* 73: 479–484.
- Jaenike J. (1978). On optimal oviposition behavior in phytophagous insects. *Theoretical Population Biology* 14: 350–356.
- Khan A.L., Halo B. A., Elyassi A., Ali S., Al-Hosni K., Hussain J., Al-Harrasi A., Lee I. (2016). Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology* 21: 58–64.

- Kozyrovska N.O. (2013). Crosstalk between endophytes and a plant host within information processing networks. *Biopolymers and Cell* 29: 234–243.
- Kumar S. & Kaushik N. (2013). Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review. *Phytochemistry Reviews* 11: 507-522.
- Kumar P., Whitten M., Thoeming G., Borgemeister C., Poehling H.M. (2008). Effects of bio-pesticides on *Eretmocerus warrae* (Hym., Aphelinidae), a parasitoid of *Bemisia tabaci* (Hom., Aleyrodidae). *Journal of Applied Entomology* 132: 605–613.
- Larriba E., Jaime M.D., Nislow C., Martín-Nieto J., Lopez-Llorca L.V. (2015). Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. *Journal of Plant Research* 128: 665-678.
- Ludwig-Müller J. (2015). Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnology Letters* 37: 1325–1334.
- Montesinos E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology* 6: 245–252.
- Oki Y., Soares N., Belmiro M.S., Corrêa Junior A., Fernandes G.W. (2009). The influence of the endophytic fungi on the herbivores from *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Neotropical Biology and Conservation* 4:83-88.
- Pentimone I., Lébron R., Hackenberg M., Rosso L.C., Colagiero M., Nigro F., Ciancio A. (2018). Identification of tomato miRNAs responsive to root colonization by endophytic *Pochonia chlamydosporia*. *Applied Microbiology Biotechnology* 102: 907–919.
- Proffitt M., Birgersson G., Bengtsson M., Reis Jr. R., Witzgall P., Lima E. (2011). Attraction and oviposition of *Tuta absoluta* females in response to tomato leaf volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 37: 565–574.
- Santana P. A., Kumar L., Da Silva R.S., Picanço M.C. (2019). Global geographic distribution of *Tuta absoluta* as affected by climate change. *Journal of Pest Science* 92: 1373-1385.
- Simmonds M.S.J. (2003). Flavonoid–insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry* 64: 21–30.
- Speridião S.V.E. (2020). Efeito da qualidade do macho na resposta ao feromônio sexual em *Tuta absoluta*. Master's thesis, Universidade Federal de Viçosa (Brasil).
- Tolba S.R.T., Moustafa M.M.A., Elshawaf I.I.S, Rosso L.C., Pentimone I., Colagiero M., Bubicci G., Prigigallo M.I, Ciancio A. (2021). Root endophytism by *Pochonia chlamydosporia* affects defense-gene expression in leaves of monocot and dicot hosts under multiple biotic interactions. *Plants* 10: 718.

- Urbaneja A., Montón H., Mollá O. (2009). Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. *Journal of Applied Entomology* 133: 292–296.
- Vital C.E., Gómez J.D., Vidigal P.M., Barros E., Pontes C.S.L., Vieira N.M., Ramos H. (2019). Phytohormone profiling by liquid chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC/MS) V.2.
- Zavala-Gonzalez E.A., Escudero N., Lopez-Moya F., Aranda-Martinez A., Exposito A., Ricaño-Rodríguez J., Naranjo-Ortiz M. A., Ramírez-Lepe M., Lopez-Llorca L. V. (2015). Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time of tomato. *Annals of Applied Biology* 166: 472–483.
- Wallis C.M. & Galarneau E.R.A. (2020). Phenolic compound induction in plant-microbe and plant-insect interactions: a meta-analysis. *Frontiers Plant Science*. 11: 580753.