

POTENCIAL DE ISOLADO FÚNGICO DE LESMAS TERRESTRES CONTRA O ÁCARO-RAJADO

DE MORAES, B. R.¹; MALESKI, L.¹; PÓSS, J. R.¹; SILVA, R. L. A.¹; BARBOSA, A. A.¹;
XAVIER, G.¹

¹Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Laboratório de Entomologia Ângelo Moreira da Costa Lima, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (Labmicro) - AV. Coronel Francisco H. dos Santos, 210, Centro Politécnico, Bairro Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, Brasil – CEP 81.531-980; C.P. 19031-99.

RESUMO

O ácaro-rajado *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae) é uma das principais pragas de ocorrência no cultivo de morangueiro. A detecção, amostragem e monitoramento de *T. urticae* são essenciais para seu manejo. Embora existam produtos à base de microrganismos para o controle do ácaro-rajado, os acaricidas sintéticos vem sendo o método de controle mais utilizado. O uso incorreto e indiscriminado desses produtos pode levar à acumulação de contaminação em alimentos, da água e do solo, intoxicação de produtores rurais, seleção de pragas resistentes. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi identificar e avaliar a patogenicidade de um isolado fúngico da lesma terrestre, *Meghimatium pictum*, contra *T. urticae*. Este é o primeiro relato da utilização de fungos isolados de lesmas com potencial de biocontrole contra *T. urticae*. A colônia de *T. urticae* foi coletada em cultivo convencional de morangueiro (*Fragaria* × *ananassa* Duch; Rosaceae) em Araucária, Paraná, Brasil. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições para cada tratamento (água, fungo espécie 1 e Abamectin). Em relação à identificação, os esporos do fungo da espécie 1 desenvolveram micélio abundante nos ácaros levando a morte e posterior extrusão fúngica. Os resultados indicaram que o fungo da espécie 1 diferiu significativamente do produto comercial (p-valor<0,05), mortalidade de 79,57%, enquanto o produto comercial Abamectin apresentou mortalidade de 30,11%. Esses resultados indicam que esse isolado fúngico se mostra promissor para ser utilizado no controle biológico do ácaro-rajado.

Palavras-chave: Fungo; Lesma; *T. urticae*; Biocontrole.

INTRODUÇÃO

O ácaro-rajado *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae) é uma das principais pragas de ocorrência no cultivo de morangueiro (Choi et al., 2022). A detecção, amostragem e monitoramento de *T. urticae* são essenciais para seu manejo (Choi et al., 2022). Embora existam ferramentas disponíveis para o controle do ácaro-rajado, como o uso de produtos à base de microrganismos como *Beauveria* spp. (Almeida et al., 2022), ácaros predadores como por exemplo *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae, McGregor) (Phytoseiidae) (Castillo-Ramirez et al., 2020), produtos à base de plantas como por exemplo o

Oxymatrine (Matrine[®]) que é à base de *Sophora flavescens* (Fabaceae) (Xu et al., 2023), os acaricidas sintéticos tem sido a ferramenta mais utilizada, sendo as moléculas de dimetoato, dicofol, cyhexatin, hexythiazox, clofentezina, abamectina, fenpyroximate, chlorfenapyr (Araújo et al., 2020a). O uso incorreto e indiscriminado desses produtos pode levar à acumulação de resíduos tóxicos em alimentos, contaminação da água e do solo, intoxicação de produtores rurais, seleção de pragas resistentes, entre muitos outros problemas (Araújo et al., 2020a). Estratégias tradicionais de isolamento e seleção têm garantido a descoberta de microrganismos potencialmente utilizados nos processos biotecnológicos para exploração de novos agentes de controle biológico com aplicações industriais e tecnológicas. Neste contexto, devido à escassez de estudos utilizando fungos isolados de lesmas terrestres, que apresentam hábitos polípagos e são encontradas em condições adversas, assim como os fungos que vivem em solos mais secos e troncos caídos em decomposição (Landal, 2021, Landal, 2024), nosso grupo de pesquisa vem realizando coletas a campo de lesmas colonizadas por fungos com o objetivo de isolar, identificar e selecionar fungos com potencial para o controle de pragas agrícolas. Assim, devido à necessidade em buscar medidas alternativas para o controle do ácaro-rajado e do efeito promissor do controle biológico no uso de microrganismos patogênicos o objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar a patogenicidade de um fungo isolados da lesma terrestre, *Meghimatium pictum* (Stoliczka, 1873) (Gastropoda: Stylommatophora) contra *T. urticae*. uma vez que são inexistentes os trabalhos com fungos isolados de lesmas terrestres para utilização no biocontrole de pragas agrícolas

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento e Identificação do isolado fúngico

O fungo foi isolado dos espécimes de *M. pictum* em matas nativas próximas de áreas produtoras de cogumelo, sob troncos, material vegetal senescente e entulhos no município de São José dos Pinhais/PR (Latitude 25°34'S e Longitude 49°06'O). As lesmas com sintomas de infecção fúngica foram individualizadas e mantidas em placas de Petri com papel filtro umedecido com água destilada, mantidos em estufa BOD a 28° ±1°C por sete dias e diariamente foram observadas para confirmação da extrusão do fungo. O fungo extrusado das lesmas foi cultivado em placas de Petri em meio Ágar Sabouraud (SBA), incubado em estufa BOD a 28° ±1°C e purificado através da seleção de colônias monospóricas, as quais foram novamente transferidas para SBA nas mesmas condições descritas acima. Os isolados encontram-se em fase de identificação por métodos clássicos (macro e micromorfologia) (DE Hoog et al., 2020) e por biologia molecular.

Aquisição e criação do ácaro fitófago *Tetranychus urticae*

A colônia de *T. urticae* foi coletada em cultivo convencional de morangueiro (*Fragaria × ananassa* Duch; Rosaceae) em Araucária (25°60'96.33"S e 49°52'75.00"O), Paraná, Brasil. Os indivíduos coletados foram infestados nas folhas de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) e mantidos em casa-de-vegetação por pelo menos cinco gerações sem exposição a acaricidas. Os feijoeiros foram cultivados em vasos de plástico de 2,5 L contendo substrato feito pela mistura de casca de coco, turfa e perlita (1:1:2). Para manter a criação da colônia, os vasos contendo novas plantas foram constantemente infestados. Para sincronizar o estágio de desenvolvimento de *T. urticae* para os bioensaios de ovos e adultos, machos e fêmeas de idades

foram infestadas, com auxílio de um pincel de ponta fina (nº 2), em folhas de morangueiro orgânico com os pecíolos recobertos com algodão hidrófilo umedecido com água destilada e acondicionados em placa de Petri (15,0 cm de diâmetro × 2,5 cm de altura). Transcorridas 24 horas de acasalamento e postura, os adultos foram removidos com o pincel e as folhas infestadas com os ovos foram mantidas em sala de criação, sob condições controladas ($25 \pm 5^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa (UR) e fotoperíodo de 14:10 [luz (L): escuro (E) h]. Os ovos foram acompanhados até chegar a fase adulta, momento em que foram utilizados no bioensaio.

Preparo do inóculo fúngico para pulverização

O isolado fúngico selecionado foi cultivado em meio de cultura Ágar Sabouraud (SAB), incubados em BOD a $28^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ a 28°C , fotofase de 12 horas por 14 dias (ITO et al., 2019). O micélio de aproximadamente 5 placas de Petri de 9 cm de diâmetro foi raspado e transferido para um tubo Falcon de 50 mL contendo 25 mL de solução salina (NaCl 0,85% com Tween 80 0,01%). O tubo foi agitado em Agitador tipo Vórtex (Cienlab) por 1 min para a homogeneização da suspensão e depois todo o conteúdo foi filtrado para outro tubo Falcon por meio de gaze previamente esterilizada. A concentração da solução filtrada foi estimada usando uma câmara de Neubauer, e a concentração foi corrigida para 10^7 esporos/mL⁻¹ (Araújo, et al., 2020b). As suspensões de esporos foram usadas imediatamente após a preparação.

Bioensaio de patogenicidade *in vitro* contra *T. urticae*

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições para cada tratamento. Cada repetição foi composta por uma placa de Petri de plástico (5,1 cm de diâmetro x 1,1 cm de altura), contendo um folíolo de morangueiro da cultivar ‘San Andreas’ com o pecíolo envolto por algodão hidrófilo umedecido com água destilada para manter a turgidez, em cada folíolo foram adicionados dez *T. urticae* adultos para posterior aplicação via pulverização dos tratamentos utilizando um aerógrafo sw776- sagyma (10 lb.pol-1). Os tratamentos avaliados foram T1 = água destilada esterilizada (controle negativo) utilizado para correção dos dados pela Fórmula de Abbott; T2 = fungo espécie 1 e T3 = Abamectin (17/ml em 20ml de água). A mortalidade foi avaliada a cada 24 horas durante 8 dias. Os ácaros mortos foram transferidos para placas de Petri (15 cm × 2 cm) com papel filtro umedecido com água destilada autoclavada para extrusão do fungo e confirmação do agente causal.

Análise dos dados

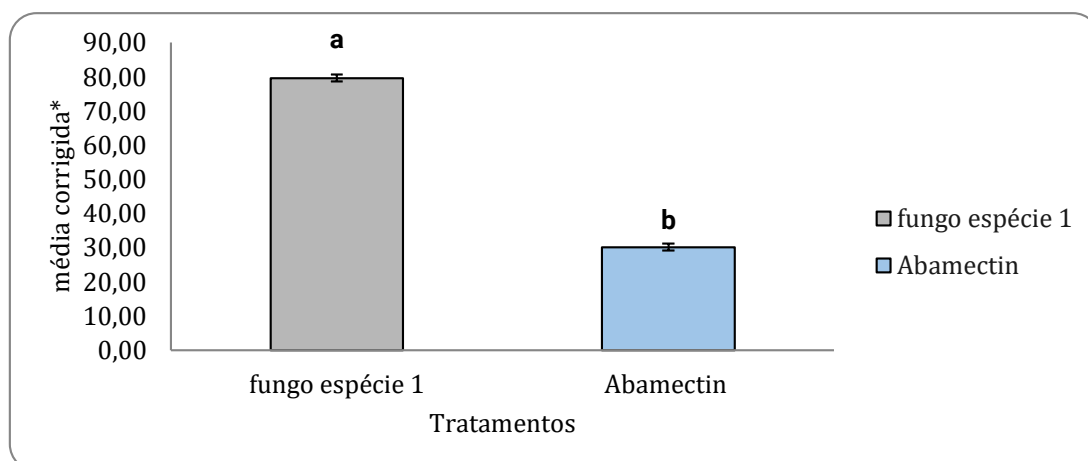
Os dados de mortalidade foram corrigidos pela fórmula de Abbott (1925) e submetidos ao Teste t de Student para verificar a diferença entre os tratamentos, utilizando o *software* SISVAR (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bioensaio de patogenicidade *in vitro* contra *T. urticae*

Nos experimentos desenvolvidos com o objetivo de avaliar a patogenicidade de fungos contra *T. urticae* foi observado que o isolado fúngico diferiu significativamente do produto comercial (p-valor<0,05), apresentando taxa de mortalidade de 79,57%, enquanto o produto

comercial Abamectin apresentou mortalidade de 30,11%.". Os dados de mortalidade encontram-se na figura 1.



*Dados corrigidos pela Fórmula de Abbott

Médias na coluna com letras diferentes diferem significativamente pelo Teste t de Student a 5% de significância

Figura 1 – Mortalidade média (%*) do número de *T. urticae* após o tratamento com suspensões de esporos do fungo espécie 1 (10^7 esporos/mL⁻¹) e com o produto comercial Abamectin. A mortalidade foi avaliada a cada 24 horas durante 8 dias.

Em relação à identificação, foi observado que os esporos do fungo da espécie 1 desenvolveu um micélio abundante nos ácaros levando a morte e posterior extrusão fúngica (Figura 2a). Em relação a morfologia da colônia (macromorfologia) do fungo as colônias desenvolvidas em meio SAB apresentaram coloração branca, micélio aéreo curto, branco e cotonoso (Figura 2 b). A observação à microscopia óptica mostrou hifas verdadeiras grosseiras que se segmentam em arthroconídios retangulares que variaram em comprimento (a maioria é de 4 a 10 μ m) e apresentaram um arredondamento de suas extremidades (Figura 2c). A identificação por biologia molecular está em andamento para a confirmação do gênero do fungo da espécie 1 utilizado nessa pesquisa. A confirmação da identidade dos isolados fúngicos por biologia molecular está em andamento e posteriormente as linhagens serão depositadas na Coleção Microbiana da Rede Paranaense – TAXonline (CMRP) da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, Brasil). (<http://www.splink.org.br>).

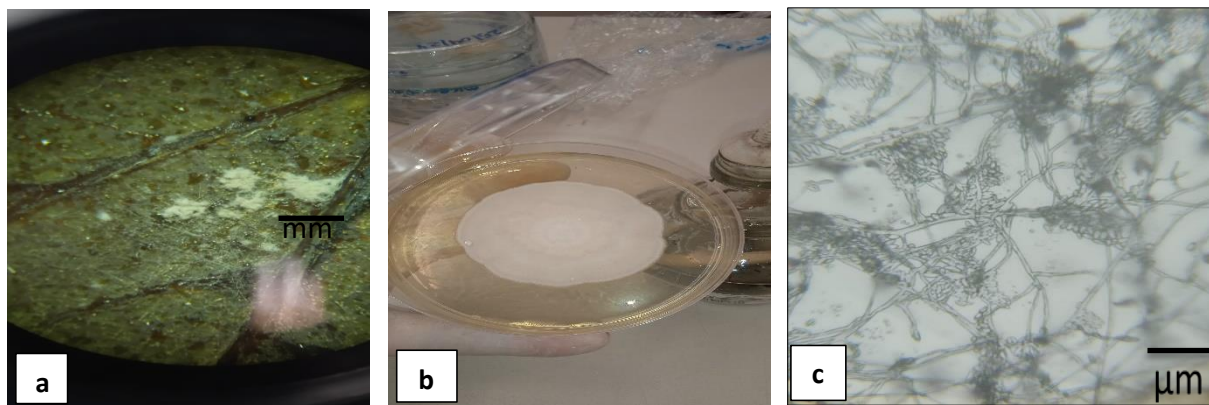


Figura 2 – (a) Extrusão do fungo da espécie 1 em adultos de *T. urticae* avaliado em estereomicroscópio óptico após 8 dias de incubação em BOD a $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotofase de 12 horas por 14 dias (20X); (b) Macromorfologia do fungo da espécie 1 em meio SAB incubado em BOD a $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a 28°C , fotofase de 12 horas por 14 dias (c). Micromorfologia do fungo da espécie 1 observada ao microscópio óptico (aumento de 400x)

Fonte: SILVA, R. L. A. (2024).

O ácaro-rajado, *Tetranychus urticae* Koch, é considerado a principal praga da cultura do morangueiro. O controle desta espécie é tradicionalmente dependente de acaricidas sintéticos atualmente empregados que apresentam baixa eficiência induzindo ao uso de agrotóxicos e ao aumento de resíduos de agroquímicos na fruta. Para reduzir a dependência desses produtos químicos o controle biológico aparece como uma alternativa sustentável (Zhao et al, 2023) .A bioprospecção tem sido o alvo principal do nosso grupo de pesquisa, alguns trabalhos publicados mostram que microrganismos depositados na Coleção Microbiana da Rede Paranaense – TAXonline (CMRP) da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, Brasil) mostraram atividade contra afídeo (Adly et al., 2022), besouro (Furuie et al., 2022a), lagarta (Porsani, 2022), drosófila (Furuie et al., 2022b), molusco (Landal, 2021)e consórcios fúngicos controlando lagartas (Stuart et al., 2023)o que os tornam candidatos potenciais para o controle de pragas agrícolas. Assim, os resultados obtidos na presente pesquisa indicam que esse isolado fúngico se mostra promissor para ser utilizado no controle biológico do ácaro-rajado. Na continuidade do projeto serão realizadas novas coletas a campo para a manutenção da criação ácaro fitófago *T. urticae* e para a utilização na seleção dos microrganismos nos bioensaios *in vitro*. Novos bioensaios serão realizados com outros isolados fúngicos que estão em fase de identificação.

CONCLUSÃO

O fungo isolado da lesma terrestre *M. pictum* causou mortalidade superior ao controle utilizado atualmente contra *T. urticae*, o que é promissor para novos testes.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. The value of the dry substitutes for liquid lime. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265–267, 1925.

ADLY, D.; EID, A. E.; KAMEL, H. M.; NOUGH, G. M. Efficacy of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and certain insecticides on some cabbage insects in field, 2022.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; ROCHA, T.C., Desenvolvimento de método para extração física de conídios de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para formulação pó seco e molhável de bioinseticidas. 2022.

ARAUJO, E.S.; BENATTO, A.; RIZZATO, F.B.; POLTRONIERI, A.S.; POITEVIN, C.G.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Combining biocontrol agents with different mechanisms of action to control *Duponchelia fovealis*, an invasive pest in South America. *Crop Protection*, 134, 105184, 2020a.

ARAUJO, E.S.; POLTRONIERI, A.S.; POITEVIN, C.G.; MIRÓS-AVALOS, J.M.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Compatibility between entomopathogenic fungi and egg parasitoids (Trichogrammatidae): A laboratory study of their combined use to control *Duponchelia fovealis*. *Insects*. 11, (630), 2020b.

CASTILLO-RAMÍREZ, O.; GUZMÁN-FRANCO, A.W.; SANTILLÁN-GALICIA, M. et al. Interação entre ácaros predadores (Acari: Phytoseiidae) e fungos entomopatogênicos em populações de *Tetranychus urticae*. *BioControl* 65, 433–445, 2020.

CHOI, Y.S.; KIM, M.J.; BAEK S. Distribuição dentro da planta de ácaros aranha de duas pintas, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), em morangos: decisão de uma unidade de amostragem ideal. *Insetos*. 13(1):55, 2022.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GEN, J.; AHMED, S.; AL-HATMI, A.M.S.; FIGUERAS, M.J.; VITALE, R.G. *Atlas of Clinical Fungi*, 4th ed.; Utrecht, Universitat Rovira i Virgili: Hilversum, The Netherlands, 2020.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 1039-1042, 2011.

FURUIE, J.L. et al. Isolation of *Beauveria* strains and their potential as control agents for *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insects*, v. 13, n. 1, p. 93, 2022a.

FURUIE, J.L. et al. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* strains against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e41611225730-e41611225730, 2022b.

ZHAO, S., ZHAO, Q., DAI, X. et al. Control of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, on strawberry by integrating with cyetpyrafen and *Phytoseiulus persimilis*. *Agriculture and Bioscience*.4, (54), 2023.

LANDAL, M. C. T., SOUZA, M. T. DE, SOUZA, M. T. DE ., BERNARDI, D., GOMES, S. R., & ZAWADNEAK, M. A. C.. Life cycle and food consumption potential of the invasive terrestrial slug *Meghimatium pictum* (Stoliczka, 1873). *Ciência Rural*,54(7), e20230101,2024.

LANDAL, M.C.T. Primeiro relato de parâmetros biológicos de *Meghimatium pictum* (Gastropoda, Philomycidae). 2021.

STUART A.K. C.; FURUIE, J. L. ; CATALDI, T. R. ; STUART, R.M. ; ZAWADNEAK, M. A. C. ; LABATE, C. A. ; PIMENTEL, I.C.. Metabolomics of the interaction between a consortium of entomopathogenic fungi and their target insect: Mechanisms of attack and survival. *Pesticide, Biochemistry and Physiology*, v. 191, p. 1, 2023.

PORSANI, M.V. et al. *Streptomyces* spp. isolated from marine and caatinga biomes in Brazil for the biological control of *Duponchelia fovealis*. *Neotropical Entomology*, 51 (2), p. 299-310, 2022.

XU, J.; LV, M.; FANG, S.; WANG, Y.; WEN, H.; ZHANG, S.; XU, H. Exploração de atividades pesticidas sinérgicas, efeitos de controle e estudo toxicológico de um óleo essencial de monoterpeno com dois alcalóides naturais. *Toxinas*. 15(4):240. 2023.