

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DE *Meghimatium pictum* (Stoliczka, 1873) (Philomycidae) COM POTENCIAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DE GASTRÓPODES-PRAGAS.

Autores: Yasmin Mayara Santos, Rebecca Luíza Almeida Silva, Beatriz Negoseke Lada, Gabriel Schilt Figueiredo, Laura Bueno Figueiredo, José Renan Póss

RESUMO

Os gastrópodes terrestres são um dos grupos de moluscos diversos e muitas vezes tornam-se pragas, com potencial para gerar grandes impactos nesse setor produtivo. Nesse sentido, a malacologia agrícola vem ganhando destaque em estudos que relacionam o ataque e métodos de controle de moluscos em culturas agrícolas. No Brasil, o controle químico de lesmas está restrito às iscas a base de fosfato férrico, consequentemente, a necessidade de soluções mais sustentáveis para o controle de lesmas e caracóis tem se tornado cada vez mais importante. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi isolar e identificar fungos de *Meghimatium pictum* coletadas no campo com potencial de biocontrole de gastrópodes-pragas. As lesmas foram coletadas em matas nativas sob troncos, material vegetal senescente e entulhos no município de São José dos Pinhais/PR. Após a coleta uma criação-estoque das lesmas foi mantida em laboratório. Para a observação da extrusão dos fungos, as lesmas foram individualizadas, em placas de Petri com papel filtro umedecido com água e mantidos em BOD a $28^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante sete dias. Os fungos que extrusaram das lesmas foram cultivados em meio SBA, incubados em BOD a $28^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e purificados através da seleção de colônias monospóricas. A identificação preliminar dos isolados fúngicos foi realizada por métodos clássicos a partir da observação das características macromorfológicas e micromorfológicas. Este é um relato importante da diversidade de fungos isolados de *M. pictum* que podem apresentar potencial de biocontrole de gastrópodes-pragas.

Palavras-chave: Biocontrole; lesmas; microrganismos

INTRODUÇÃO

Os gastrópodes terrestres são um dos grupos de moluscos mais diversos, estimando-se o número de 100.000 espécies descritas (Landal, 2021). Nesse contexto, lesmas e caracóis, em particular as espécies invasoras, têm um enorme potencial de ataque à culturas agrícolas, incluindo a infestação de jardins comerciais e residenciais. Além disso, esses ambientes podem apresentar importância epidemiológica onde fornecem locais ideais para o desenvolvimento desses animais (Oliveira et al, 2023). Devido às preferências alimentares e voracidade, em sua maioria herbívoros, muitas vezes os moluscos tornam-se pragas, com potencial para gerar grandes impactos nesse setor produtivo (Landal, 2021, Marchi et al., 2021). Nesse sentido, a malacologia agrícola vem ganhando destaque em estudos que relacionam o ataque e métodos de controle de moluscos em culturas agrícolas.

A lesma-chinesa invasora *Meghimatium pictum* (Stoliczka, 1873) (Stylommatophora: Philomycidae) é originária da Ásia e foi introduzida em países da América Latina, onde é considerada uma praga hortícola crítica (Landal et al., 2024). No

Brasil, *M. pictum*, já foi relatada causando danos em vinhedos (*Vitis labrusca* L.; Vitaceae) (Baronio et al., 2014) e em cultivos de morango (*Fragaria × ananassa* Duch.; Rosaceae) (Landal, 2021). Entretanto sabe-se que essa espécie apresenta alta adaptabilidade a ambientes com diferentes condições edafoclimáticas (Landal et al., 2024). Outro agravante é a característica de lesmas exóticas apresentarem maior eficiência na exploração de recursos do que espécies nativas (Mazaleytrat et al., 2022).

Artigos publicados a partir do isolamento, caracterização e seleção de microrganismos que apresentaram atividade *in vitro* comprovada no controle em diferentes alvos biológicos com potencial de controle biológico foram publicados. Actinobactérias que mostraram potencial contra artrópodes (Poitevin et al., 2018), fungos isolados de solos agrícolas, matas nativas (Amatuzzi, 2018) que apresentaram atividades contra afídeo (Pacheco et al., 2017), besouro (Furuie et al., 2022a), lagarta (Porsani et al., 2022), drosófila (Furuie et al., 2022b) e moluscos Landal, 2024) o que os tornam candidatos potenciais para o manejo integrado de pragas. Os isolados fúngicos encontrados nesse trabalho vem de encontro com a busca de novos isolados que podem apresentar potencial de biocontrole.

No Brasil, o controle químico de lesmas está restrito às iscas a base de fosfato férrico, com eficiência de 70% (Baronio et al., 2014). Consequentemente, a necessidade de soluções mais sustentáveis para o controle de lesmas e caracóis tem se tornado cada vez mais importante. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi isolar e identificar fungos de *Meghimatium pictum* coletadas no campo com potencial de biocontrole de gastrópodes-pragas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas de *M.pictum*

Os espécimes de *M. pictum* foram coletados quinzenalmente 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). Um total aproximado de 200 a 300 indivíduos foram coletados manualmente, com a utilização de luvas e, posteriormente, foram acondicionados em recipientes plásticos (1,5 L) contendo folhas de papel umedecidas com água destilada a fim de mantê-los vivos durante o transporte para o laboratório. A criação-estoque das lesmas foi mantida no Laboratório de Entomologia Agrícola Professor Ângelo Moreira da Costa Lima (UFPR).

Estabelecimento da criação em laboratório

O protocolo de criação foi adaptado para *M. pictum* com base nos métodos de Landal (2021). Os espécimes adultos coletados foram separados em grupos de dez a cinquenta indivíduos e mantidos em placas de Petri (15,0 cm de diâmetro × 2,5 cm de altura) e frascos de vidros (23,5 cm de altura × 13,6 cm de base × 9,6 de diâmetro; 2,5 L de volume) fechados com filme de PVC transparente. No fundo dos recipientes foi colocado papel filtro umedecido com água destilada. Para simular o habitat natural das lesmas, pedaços de madeiras e solo removidos dos locais de coletas foram adicionados nos recipientes. As lesmas foram alimentadas com alface, pepino e cenoura de produção orgânica, sendo a reposição do alimento realizada em intervalos de 72 h. As lesmas foram mantidas em condições de laboratório (25 ± 2 °C, 70 ± 10% de umidade relativa [UR] e 24 h de escuro.

Isolamento, purificação e identificação de fungos isolados de *Meghimatium pictum*

Os fungos foram isolados 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), Paraná, Brasil. As lesmas foram individualizadas e mantidas em placas de Petri com papel filtro umedecido com água e mantidos em BOD a 28° ±1°C por sete dias e diariamente foram observadas para confirmação da extrusão de fungos. Os fungos extrusados das lesmas foram cultivados em placas de Petri em meio SBA (Sabouraud), incubados em BOD a 28° ±1°C por 7 dias e purificados através da seleção de colônias monospóricas, as quais foram novamente transferidas para meio SBA e incubados nas mesmas condições descritas acima.

Identificação macromorfológica

Após a purificação os isolados fúngicos foram repicados em placa contendo meio SAB utilizando a técnica de ponto único e posteriormente incubados em BOD a 28° ±1°C durante sete dias. Após o período de crescimento foram observadas a morfologia das colônias utilizando as seguintes características: tamanho, forma, textura, cor do verso e do reverso das colônias. (DE Hoog et al., 2020).

Identificação micromorfológica

A técnica do microcultivo foi realizada a fim de identificar morfologicamente os isolados. Dois cubos de meio BDA de camada alta foram cortados com um estilete flambado e depositados em uma lâmina no interior de em placa de petri. Os fungos foram repicados com o auxílio do gancho nos quatro cantos da superfície dos cubos. As lamínulas foram mergulhadas em álcool 70% e passadas na chama, depositadas em cima de cada cubo de meio. Por fim, o algodão presente na placa de microcultivo foi umedecido com água destilada esterilizada com uma pipeta graduada de 1mL. As placas foram incubadas em BOD por 7 dias a 28 °C ± 0,5 °C. Após esse período, com o auxílio de uma pinça as lamínulas foram depositadas em uma lâmina contendo uma gota de lactofenol de Amann (clareador) para a observação ao microscópio óptico num aumento de 400x e posterior identificação em nível de gênero utilizando a literatura (DE Hoog et al., 2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

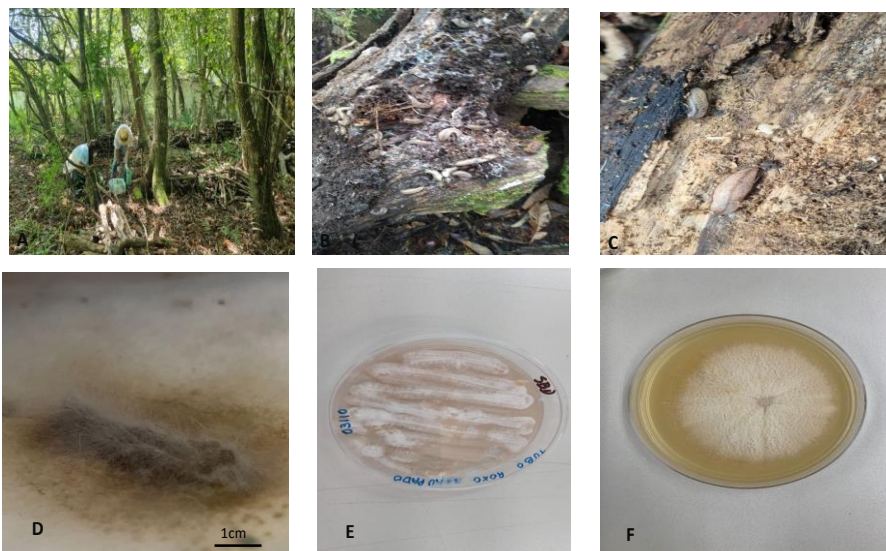
Identificação macromorfológica e micromorfológica dos fungos isolados de *M. pictum*

Os isolados fúngicos das lesmas coletadas em área de matas nativas próximas de áreas produtoras de cogumelo, sob troncos, material vegetal senescente (Figura 1) apresentaram uma grande diversidade (Figura 2). Após a purificação foram separados de acordo com a macromorfologia em diferentes morfogrupos (Tabela 1). As características observadas foram, cor do verso e do reverso das colônias, pigmentação do meio de cultivo e tamanho das colônias durante o período de crescimento (Figura 3). As análises das características micromorfológicas encontram-se em andamento.

Tabela 1 -Descrição das características dos fungos isolados de *M. pictum* em relação à textura e cor do verso e do reverso das colônias observadas em meio de cultivo SAB incubadas em BOD por 7 dias a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Código	Textura verso	Textura reverso	Cor verso	Cor reverso
A	Algodonoso	Liso	Branco	Amarelo
B	Algodonoso	Liso	Branco	Amarelo
C	Algodonoso	Liso	Marrom	Marrom claro
D	Algodonoso	Liso	Branco	Amarelo claro
E	Algodonoso	Liso	Marrom	Amarelo
F	Algodonoso	Liso	Rosa	Rosa
G	Algodonoso	Liso	Roxo	Roxo escuro
H	Algodonoso	Liso	Branco	Amarelo claro
I	Algodonoso	Liso	Marrom	Amarelo
J	Algodonoso	Liso	Marrom claro	Amarelo
K	Algodonoso	Liso	Rosa	Rosa
L	Algodonoso	Liso	Branco	Amarelo claro
M	Algodonoso	Liso	Marrom	Amarelo
O	Algodonoso	Liso	Verde	Amarelo
P	Algodonoso	Liso	Marrom	Amarelo
Q	Algodonoso	Rugoso	Verde	Marrom claro
R	Algodonoso	Liso	Cinza	Amarelo
S	Algodonoso	Liso	Rosa	Rosa claro
T	Algodonoso	Liso	Marrom	Amarelo escuro
U	Algodonoso	Liso	Marrom	Amarelo
V	Algodonoso	Rugoso	Cinza	Verde
X	Algodonoso	Liso	Branco	Amarelo
Y1	Algodonoso	Rugoso	Roxo claro	Marrom

Fonte: Santos, Y. M. (2024)



Fonte: Santos, Y.M; Zawadneak, M. A. C.; Schlit; G. F (2024).

Figura 1. (A) Coleta das lesmas em áreas produtoras de cogumelo, sob troncos, material vegetal senescente e entulhos no município de São José dos Pinhais/PR; (B e C) Espécimes de *M. pictum* em troncos em decomposição (D) *M. pictum* colonizada por fungos (E) Isolado fúngico purificado em meio SAB incubado por 7 dias a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em BOD; (F) Macromorfologia da colônia do isolado fúngico.

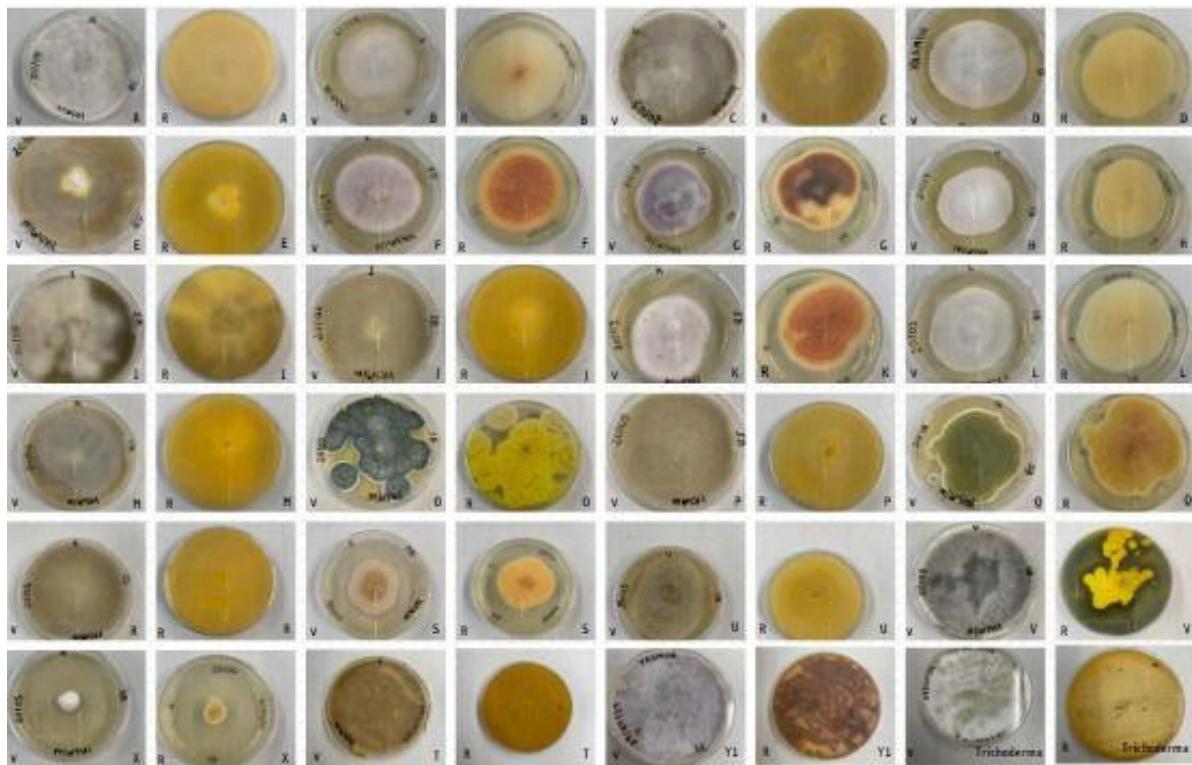


Figura 2 Macromorfologia dos fungos isolados de *M. pictum* em matas nativas próximas de áreas produtoras de cogumelo, sob troncos, material vegetal senescente e entulhos no município de São José dos Pinhais/PR. Legenda: As letras de A a Y1 indicam os diferentes morfotipos fúngicos, V = verso das colônias e R = reverso das colônias.

Fonte: Santos, Y. M. (2024)

A confirmação da identidade dos isolados fúngicos será realizada por biologia molecular 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>)

Durante o século XX, os relatos de moluscos pragas aumentaram devido à introdução de novas culturas, intensificação de produção agrícola e introdução acidental de espécies exóticas adaptadas modificar ambientes agrícolas (Barker, 2002; Cowie et al., 2009). Nesse sentido, a malacologia agrícola vem ganhando destaque em estudos que relacionam o ataque e métodos de controle de moluscos em culturas agrícolas. No Brasil, o controle químico de lesmas está restrito às iscas a base de fosfato férrico, com eficiência de 70% (Baronio et al., 2014). Conseqüentemente, a necessidade de soluções mais sustentáveis para o controle de lesmas e caracóis tem se tornado cada vez mais importante.

Neste contexto, a nossa equipe de pesquisa vem buscando estratégias tradicionais de isolamento e seleção tendo como alvo a descoberta de microrganismos potencialmente utilizados nos processos biotecnológicos para exploração de novos agentes de controle biológico com aplicações industriais e tecnológicas.

Nos últimos anos, são inúmeras as pesquisas envolvendo a exploração de diferentes biomas na busca de isolar, caracterizar e identificar microrganismos com

atividade tanto *in vitro* como *in vivo* visando o controle biológico das mais diversas pragas agrícolas. Trabalhos utilizando actinobactérias isoladas da caatinga mostraram potencial contra lagartas (Porsani, et al., 2022), consórcios fúngicos controlando lagartas (Stuart, et al., 2023) fungos entomopatogênicos controlando besouros (Furuie et al., 2022a) e drosófilas (Furuie et al., 2022b). Assim, os fungos isolados nesse trabalho podem ser ótimos candidatos para formulações de bio defensivos no controle de diversas pragas.

O crescimento do mercado brasileiro de defensivos biológicos segue tendência mundial de redução do uso de agroquímicos para combater pragas e doenças nas lavouras. Em um país com alto índice de pragas, o desafio dos agricultores é reduzir a aplicação dos agrotóxicos visando reduzir o custo da produção e os riscos associados para a saúde humana e os recursos ambientais.

Nesse sentido, investir e promover o uso de microrganismos no controle biológico pode representar não apenas uma solução eficaz para o manejo de gastrópodes-pragas, mas também um passo crucial em direção à sustentabilidade ambiental e à proteção da saúde humana.

CONCLUSÃO

Este é um relato importante da diversidade de fungos isolados de *M. pictum* que podem apresentar potencial de biocontrole de gastrópodes-pragas. A partir da seleção desses fungos, será possível desenvolver novas pesquisas para a bioprospecção de novas formulações. Na continuidade desse trabalho espera-se obter bioinsumos que possam ser utilizados como alternativa nacional aos agrotóxicos utilizados.

REFERÊNCIAS

- ALTINOK, H.H.; ALTINOK, M.A.; KOCA, A.S. Modes of action of entomopathogenic fungi. *Current Trends in Nature Science* . 8, 117–124, 2019.
- AMATUZZI, R.F.; POITEVIN, C.G.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to soil-borne entomopathogenic fungi. *Insects*, 9, 70, 2018
- BARKER, G. M. Molluscs as Crop Pests. CABI Publishing, Wallingford, 2002, 450p.
- BARONIO, C. A.; BOTTON, M.; GOMES, S.R. ; ROBINSON, D.G. First record of qualitative losses caused by *Meghimatium pictum* in vineyards of Southern Brazil and the effects of two molluscicides for its control. *Ciência Rural* 44: 1715-1720 ,2014
- 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
- 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.

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.

OLIVEIRA, K. L. D.; RODRIGUES, P. S.; DECANINE, D.; GOMES, S. R.. (2023). Diversity and abundance of terrestrial molluscs and their associated nematode fauna in urban kitchen gardens in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*, 95(1), e20220249.

PACHECO, J.C. et al. Entomopathogenic potential of fungi isolated from intertidal environments against the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: aphididae). *Biocontrol Science and Technology*, v. 27, n. 4, p. 496-509, 2017.

POITEVIN, C.G.; PORSANI, M.V.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Appl. Entomol. Zool.**, 53, 323–331, 2018.

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.

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.