

ASPECTOS TAXONÔMICOS E CITOLÓGICOS DE HYPHOMYCETES (DEUTEROMYCOTINA) ENTOMOPATOGÊNICOS

ELZA ÁUREA DE LUNA-ALVES LIMA

Departamento de Micologia, CCB/UFPE, Av. Prof. Arthur de Sá, s/nº, Campus Universitário, 50740 Recife, PE, Brasil

O sistema de classificação de Whittaker (1969) comporta cinco reinos, baseado em três níveis de organização celular: o Reino Monera onde estão inseridos os procariotos, o Reino Protista que inclui os eucariotos unicelulares, e os Reinos Plantae, Fungi e Animalia que abrangem os eucariotos multicelulares e multinucleados. Esse sistema de classificação foi adotado pelo Instituto de Micologia das Comunidades Britânicas, que edita o Dicionário de Fungos de Ainsworth & Bisby (1971) e eleva fungo a categoria de Reino, com bases no modo de alimentação por absorção e nas relações filogenéticas. Essa classificação é amplamente aceita porque considera as relações evolutivas e está compatível com os modernos estudos de ultraestruturas, bioquímicos e genéticos. Esses estudos sugeriram a endossimbiose (viver junto, um no interior do outro) hereditária que evoluiu até a célula eucariótica. Esta, resultou de uma variedade de unidades procarióticas que se originaram a partir de um ancestral procariótico comum (Whittaker, 1969).

Relações filogenéticas das subdivisões fúngicas – As subdivisões Zygomycotina, Ascomycotina e Basidiomycotina têm relações filogenéticas e por isso são consideradas grupos naturais (Ainsworth, 1973). As outras subdivisões têm relações incertas e são tidas como polifiléticas, com exceção da subdivisão Deuteromycotina que por não apresentar relações filogenéticas entre os demais fungos é considerada um grupo artificial, também denominado de Fungos Imperfeitos. Nesse grupo estão os Ascomycotina e os Basidiomycotina que perderam a capacidade de se reproduzirem sexuadamente, ou mesmo outros fungos que nunca apresentaram essa capacidade. Esses fungos contêm grande diversidade de formas estruturais, de modo que a sua sistemática é muito controversa. Kendrick (1981) considera a taxonomia dos mesmos confusa e desorganizada, não por incompetência dos taxonomistas, mas sim, pela grande complexidade que existe entre eles.

Complexidade de espécies – A ordenação de espécies fúngicas num sistema de classificação pode parecer relativamente fácil e uniforme, mas não o é. Quando se deseja enquadrar uma espécie nova, todas as categorias taxonômicas, como por exemplo: espécies, gêneros, famílias, ordem, classe e divisão, de um grupo particular de organismo exige certo julgamento. A principal unidade de classificação é a espécie e esta não tem uma definição objetiva. E em última análise é formada por organismos tão semelhantes que os micologistas mais experientes cometem enganos julgando que são iguais. Este fato justifica o grande número de espécies em sinônimas.

Aspectos da taxonomia moderna – Os fungos, como outros organismos, são identificados pela comparação entre unidades “conhecidas” e unidades “desconhecidas”. Identificar um organismo requer caracterização, descrição e comparação adequadas com as descrições peculiares das espécies já conhecidas, confrontando com a literatura especializada.

A necessidade de maior eficiência no conhecimento da grande variabilidade fúngica, enriquece os estudos taxonômicos e os tornam fascinantes.

A taxonomia é dinâmica, de modo que esforços vêm se desenvolvendo no sentido de estabelecer e de adaptar novas técnicas que venham permitir um maior conhecimento de conceitos básicos que caracterizem novas tendências taxonômicas.

A taxonomia fúngica é um processo extremamente importante devido ao papel que os fungos desempenham na natureza, particularmente os entomopatogênicos que são utilizados no controle biológico de inseto praga.

Ultimamente têm sido feitas muitas tentativas no sentido de se dar novas referências a fim

de que a literatura moderna que está em constante expansão chegue aos pesquisadores. Contudo as descrições fúngicas são baseadas nas características culturais e morfológicas. Estas técnicas devem permanecer, pois funcionam como alicerce de toda a sistemática. No entanto esforços devem ser feitos para incluir os novos e complexos métodos de microscopia eletrônica, diferenciação bioquímica, eletroforese, sorologia e taxonomia numérica. Tais técnicas têm possibilitado determinar-se com maior eficiência os sistemas de classificação.

Classificação Adansoniana — O acesso à computação colocou em evidência a análise fenética. Esta é uma das características da classificação Adansoniana muito empregada na classificação de bactérias. É assim chamada porque se baseia nos princípios adotados por Adanson há cerca de 200 anos (Sneath, 1962). Na análise fenética, a afinidade é tratada independentemente da filogenia, portanto a taxonomia tem dimensão autônoma, daí o termo fenético o qual significa uma afinidade que não se baseia na ancestralidade. Alves et al. (1986) empregaram essa técnica para separar onze isolados de *Metarhizium anisopliae*, tomando como base dezesseis características diferentes.

Taxonomia de fungos entomopatogênicos — Dentre as várias espécies fúngicas que causam doenças nos insetos, destacam-se as da subdivisão Deuteromycotina, precisamente a classe Hyphomycetes (Kendrick, 1981; Roberts & Humber, 1981). As espécies mais comuns estão nos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Paecilomyces*, *Verticillium* entre outros. Nesse trabalho será dado ênfase aos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Nomuraea*.

O estudo do *Metarhizium anisopliae* data de 1879, quando o russo Elie Metschnikoff o isolou pela primeira vez do inseto *Anisopliae austriaca* Hbst. com o nome de *Entomophthora anisopliae*. Um ano depois, o mesmo pesquisador o descreve como *Isaria destructor*. Mais tarde o fungo recebe várias denominações, e, por fim, em 1883, Sorokin o colocou em sinonímia, permanecendo até os dias atuais, *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Veen, 1968; Kendrick, 1971; Tulloch, 1976).

O gênero *Metarhizium* Sorokin, segundo Tulloch (1976) e Arx (1981) comporta duas espécies: *M. flavoviride* Gams & Rozsypal e *M. ani-*

sopliae (Metsch.) Sorokin var. *anisopliae* para a que apresenta conídios que variam de 3,5-9,0 μm e *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin var. *majus* (Johnston) para a que tem conídios variando de 9,0-18,0 μm .

Em sua monografia sobre o gênero, Tulloch (1976) não reconhece a espécie *M. album* Petch descrita pela primeira vez em 1931, isolada de *Cofana spectra* (L.) (Homoptera: Cicadellidae), do Sri Lanka. Rombach et al. (1987) identificaram a espécie *M. album* Petch, isolada de *Cofana spectra*, da Indonésia. Portanto atualmente são referidas três espécies para o gênero *Metarhizium*.

O gênero *Beauveria* Vuillemin foi reorganizado em 1912, mas a espécie tipo *B. bassiana* (Bals.) Vuill. foi descrita pela primeira vez em 1835 por Balsamo com o nome de *Botrytis bassiana* (Benham & Miranda, 1953). Hoog (1972) e Samson (1981) baseados na mensuração dos conídios e na morfologia das fiálides, consideram dois gêneros entomopatogênicos. São eles: *B. bassiana* (Bals.) Vuill., de conídios globosos, subglobosos (2-3 x 2,0-2,5 μm) e fiálides formando densos cachos. A outra espécie é *B. brongniartii* (Sacc.) Petch, cujos conídios são elipsóides (2-3 x 1,5-2,5 μm) com fiálides mais delgadas e raramente formando cachos.

O gênero *Nomuraea* Maublanc, segundo Samson (1981) tem duas espécies: *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, de conídios cilíndricos a elipsóides (3,5-4,5 x 2-3,1 μm) e *N. atypicola*, de conídios cilíndricos, ligeiramente curvados (4-6 x 1,2-1,5 μm). A espécie *N. rileyi* foi descrita pela primeira vez por Farlow (1883), com o nome de *Botrytis rileyi*. Em 1936 Charles a reestuda e denomina de *Spicaria rileyi*, permanecendo com esse nome durante vários anos. Em 1974, Kish et al. (1974) estudaram o gênero e deram à espécie o nome de *N. rileyi*, o qual permanece até os dias atuais.

Aspectos da citologia fúngica — A citologia de fungo apesar de ser necessária para se conhecer e compreender os fenômenos de variabilidade genética, não está suficientemente explorada. Este fato, ocorre, possivelmente, devido o tamanho dos núcleos fúngicos serem bastante reduzidos, requerendo assim, domínio de técnicas que muitas vezes desafiam os limites de resolução de instrumentos ou mesmo do processo de tratamento. Desse modo a citologia dos

fungos, desafia a capacidade inventiva dos pesquisadores familiarizados com as figuras clássicas de mitose e meiose, comumente observadas nos padrões estabelecidos para os eucariotos (Robinow, 1981).

O núcleo fúngico, analisado sob o microscópio eletrônico, é semelhante ao núcleo de outros organismos eucarióticos. Durante o processo de divisão do núcleo, a membrana nuclear não sofre desorganização e o fuso mitótico é intranuclear. Na divisão meiótica, na fase de prófase, a técnica de microscopia eletrônica mostra a ocorrência de complexo sinaptonêmico (Girbardt, 1978; Alexopoulos & Mims, 1979).

Ao microscópio óptico os aspectos mais notáveis são o pequeno tamanho dos núcleos em relação aos de outros eucariotos, e a variação de formas mesmo que estes não se encontrem em divisão. Contudo, as dificuldades do dia a dia vêm sendo superadas, e o aprimoramento de técnicas de coloração ao nível óptico, como também eletrônico, elucidam e renovam conceitos, até então obscuros, dando maior significado ao estudo e ao conhecimento celular de estruturas vegetativas e reprodutivas, consequentemente renovando conceitos de classificação fúngica (Wingfield et al., 1987).

Conidiogênese: conceito moderno de classificação de Hyphomycetes — Um dos primeiros sistemas de classificação foi o de Saccardo (1899) baseado na forma, septação e pigmentação dos conídios. Na época, o sistema foi bem aceito devido a sua relativa simplicidade e compreensão natural. Mas esse sistema gerou insatisfação, principalmente por que não atendia às peculiaridades dos Hyphomycetes. No entanto somente no início da década de quarenta, um jovem micologista galês, S. J. Hughes, sob a orientação de E. W. Mason, trabalhando no Commonwealth Mycological Institute, desenvolveu novas teorias sobre a taxonomia dos Hyphomycetes (Kendrick, 1981). Hughes (1953) os agrupou em oito seções, tomando como base o desenvolvimento da conidiogênese. Ele incluiu os Hyphomycetes anelados na seção III e o fialídicos na seção IV. Esses trabalhos estimularam vários pesquisadores, de modo que surgiram muitas contribuições complementando os estudos de Hughes (1953) (Tubaki, 1963; Barron, 1968; Kendrick, 1971; 1980).

Muitos dos Hyphomycetes entomopatogênicos se enquadram no modelo fialídico (Hammil,

1981) e entre eles estão *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Nomuraea rileyi*. Estudos da condição nuclear desses fungos demonstraram que as fialídes são uninucleadas; quando binucleadas sugerem telófase mitótica. Neste caso, um núcleo migra da fialíde para o primórdio de conídio, o qual atinge a maturidade e é dispersado. Assim novos conídios são formados complementando a conidiogênese (Hammil, 1972; Reisinger & Olah, 1974; Pendland & Boucias, 1982; McCoy et al., 1984).

Caracterização de linhagens — Até o presente não existe na literatura uma definição para o termo linhagem fúngica. No entanto a grande variabilidade natural encontrada entre os fungos entomopatogênicos, isolados de regiões distintas, forçam a elaboração de técnicas que possibilitem assegurar um conhecimento mais acurado do fungo que está sendo alvo de estudos para o controle biológico. O estudo da conidiogênese (Hammil, 1981) não se mostra adequada para caracterização de linhagem, como uma identidade taxonômica. De Conti et al. (1980) empregaram a técnica de eletroforese para determinar os padrões de esterases e fosfatases em *M. anisopliae*. Azevedo & Messias (1981) separaram linhagens deste mesmo fungo, através da mensuração de conídios feitas ao microscópio óptico, confrontando com as medidas feitas com o "coulter chanelizer" e não encontraram diferenças significativas. Técnicas de imunoeletroforese, sorologia, características bioquímicas, virulência, além de outras são citadas por Ferron (1981). Todas essas técnicas são válidas. Sugere-se ainda que sejam usadas como parâmetro as características: a) hospedeiro de origem; b) cultura monospórica; c) características culturais; d) mensuração de conídios (\bar{M} de no mínimo cem conídios afim de evitar erros grosseiros); e) mensuração do diâmetro de núcleos; f) frequência de núcleos por conídios; g) variação na forma de conídios e h) germinação de conídios, afim de determinar a viabilidade dos mesmos.

Esses estudos além de assegurarem um maior conhecimento das linhagens, também auxiliam nos estudos genéticos que visam o melhoramento da espécie.

REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, G. C., 1973. Introduction, and keys to higher taxa. Vol. A4, p. 1-7, In G. C. Ainsworth; F. K. Sparrow & A. S. Sussman. *The fungi, an advanced treatise*. Academic Press, London.

- AINSWORTH, G. C. & BISBY, G. R., 1971. *Dictionary of the fungi*. Commonwealth Mycol. Inst., Kew, Surrey.
- ALEXOPOULOS, C. J. & MIMS, C. W., 1979. *Introductory mycology*. John Wiley, New York, 632 p.
- ALVES, S. B.; SILVEIRA NETO, S.; HADDAD, M. L. & SOSA GÓMEZ, D. R., 1986. Separação de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. através da análise fenética. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 15: 81-92.
- ARX, J. A. von, 1981. *The genera of fungi sporulating in pure culture*. J. Cramer, Vaduz, 424 p.
- AZEVEDO, J. L. & MESSIAS, C. L., 1981. Tamanho de conídios em diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*. *Bol. Grupo Pesq. Control. Biol.*, 2: 5-8.
- BARRON, G. L., 1968. *The genera of Hyphomycetes from soil*. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- BENHAM, R. W. & MIRANDA, J. L., 1953. The genus *Beauveria*, morphological and taxonomical studies of several species and of two strains isolated from wharf-piling borers. *Mycologia*, 45: 727-745.
- DE CONTI, E.; MESSIAS, C. L.; SOUZA, A. L. & AZEVEDO, J. L., 1980. Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia*, 36: 293-294.
- FARLOW, W. G., 1883. *Botrytis rileyi*. Rep. U. S. Comm. Agr. p. 121.
- FERRON, P., 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*, p. 465-482. In H. D. Burges, *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press, London.
- GIRBARDT, M., 1978. Historical review and introduction. p. 1-20. In *Nuclear division in the fungi*. I. Heath. Academic Press, New York.
- HAMMIL, T. M., 1972. Electron microscopy of phialoconidiogenesis in *Metarhizium anisopliae*. *Amer. J. Bot.*, 59: 317-326.
- HAMMIL, T. M., 1981. Conidiogenesis, p. 152-171. In G. Turian & H. R. Höhl, *The fungal spore: morphogenetic control*. Academic Press, London.
- HOOG, G. S. de, 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria* and *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Stud. Mycol.*, 1: 1-39.
- HUGHES, S. J., 1953. Conidiophores, conidia and classification. *Can. J. Bot.*, 31: 577-659.
- KENDRICK, W. B., 1971. *Taxonomy of fungi imperfecti*. Univ. Toronto Press, Toronto, 390 p.
- KENDRICK, W. B., 1980. The generic concept in Hyphomycetes a reappraisal. *Mycotaxon*, 11: 264-339.
- KENDRICK, W. B., 1981. The systematics of Hyphomycetes, Vol. 1, p. 21-42. In G. T. Cole & W. B. Kendrick, *Biology of conidial fungi*. Academic Press, New York.
- KISH, L. P.; SAMSON, R. A. & ALLEN, G. E., 1974. The genus *Nomuraea* Maublanc. *J. Invertebr. Pathol.*, 39: 81-92.
- McCOY, C. W.; STAMPLER, D. H. & TUVERTSON, P. W., 1984. Conidiogenous cell differences among mutant and wild-type pathotypes of *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*. *J. Invertebr. Pathol.*, 43: 414-421.
- PENDLAND, J. C. & BOUCIAS, D. G., 1982. Ultrastructural aspects of conidiogenesis in the entomogenous Hyphomycetes *Nomuraea rileyi*. *Can. J. Bot.*, 60: 26-33.
- REISINGER, O. & OLAH, G. M., 1974. Etude ultrastructurale et cytochimique de la conidiogénèse chez *Beauveria bassiana*. *Can. J. Microbiol.*, 20: 1387-1392.
- ROBERTS, D. W. & HUMBER, R. A., 1981. Entomogenous fungi, Vol. 2, p. 201-229. In G. T. Cole & W. B. Kendrick. *Biology of conidial fungi*. Academic Press, New York.
- ROBINOW, C. F., 1981. Nuclear behavior in conidial fungi. Vol. 2, 357-393. In G. T. Cole & W. B. Kendrick, *Biology of conidial fungi*. Academic Press, New York.
- ROMBACH, M. C.; HUMBER, R. A. & EVANS, H. C., 1987. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf and planthoppers of rice. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 88: 451-459.
- SACCARDO, P. A., 1899. *Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum*. Vol. 14, 1316 p. Pavia.
- SAMSON, R. A., 1981. Identification: entomopathogenic Deuteromycetes, p. 94-106. In H. D. Burges, *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press, London.
- SNEATH, P. A., 1962. The construction of taxonomic groups, p. 1-9. In G. C. Ainsworth & P. A. Sneath, *Microbial classification*. New York, Cambridge.
- TUBAKI, K., 1963. Taxonomic study of Hyphomycetes. *Ann. Rep. Inst. Ferment. Osaka*, 1: 25-54.
- TULLOCK, M., 1976. The genus *Metarhizium*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 66: 407-411.
- VEEN, K. H., 1968. Recherches sur la maladie, due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. *Mededelingen Land bouwhogeschool Wageningen*, 68: 1-77.
- WHITTAKER, R. H. C., 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, 163: 150-160.
- WINGFIELD, M. J.; SCHALK VAN WIK, P. & WINGFIELD, B. D., 1987. Reclassification of *Phialocephala* based on conidial development. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 88: 1-12.