

CLAUDIO CICCARONE * e GUIDO CAMPADELLI**

* Istituto di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi di Bologna.

** Istituto di Entomologia "G. Grandi" dell'Università degli Studi di Bologna.

Osservazioni sul complesso *Beauveria-Tolypocladium* in simbiosi con gli Insetti.*

(Ricerche eseguite con il contributo del M.U.R.S.T. 60 %)

INTRODUZIONE.

Il gruppo di funghi entomopatogeni od entomocori che rientra nei generi *Tolypocladium* e *Beauveria* è stato più volte oggetto di collocazioni incertamente slittanti tra i generi *Trichoderma*, *Beauveria*, *Tolypocladium*, *Sporotrichum*, a causa della stentata fisiologia manifestata nelle colture in vitro e nelle colture in vivo controllate in laboratorio.

Il fatto che le larve degli insetti parassitizzati da *Beauveria* presentino parte del ciclo entro il legno di varie essenze forestali, entro le quali alligna *Trichoderma* con tutta la varietà delle sue specie, fa sì che, nelle operazioni di isolamento, sia frequente imbattersi in miceli frammisti di *Trichoderma* e di *Beauveria* (non altrettanto facile è trovare miceli frammisti di *Tolypocladium* e di *Trichoderma*).

Un inquadramento fluttuante di questi funghi rischia, quindi, di riflettersi molto negativamente sulle applicazioni tecniche che si basano sull'utilizzazione di ceppi sottilmente differenziati di *Trichoderma*.

Oltretutto *Trichoderma* è un genere che presenta, già al suo interno, gravi difficoltà di caratterizzazione, potendo essere, entro alcune specie, considerato semplicemente come una fase spermaziale di funghi ascomiceti lignicoli.

Anche attualmente, su importanti cataloghi di collezioni micologiche internazionali si legge: "*Tolypocladium*: see *Beauveria* synonyms" ed, in altri casi, si osserva che *Tolypocladium inflatum* può essere considerato sinonimo di *Beauveria nivea* oppure, addirittura, di *Trichoderma polysporum*.

Sicuramente, come in questo caso, si ammette la possibilità di attribuzioni imprecise: se *Tolypocladium* è stato, episodicamente, considerato un *Trichoderma*, la cosa andrebbe analizzata sul materiale specificamente chiamato in causa.

(*) Lavoro accettato il 13 Settembre 1992.

Più difficile da ammettere è l'estensione a tutti i componenti di un genere del criterio adottato in un caso singolare.

MATERIALI E METODI.

I campioni cui si riferisce questo lavoro provengono da siti di collezioni i più disparati e da erbari micologici internazionali.

1a. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill., da campioni di larve di Coleotteri da Foresta della Lama e di Sasso Fratino (Appennino romagnolo).

1b. *B. bassiana*, gentilmente fornita dal laboratorio di Fitofarmacia dell'Università degli Studi di Bologna.

1c. *B. bassiana*, ceppo derivato da materiale entomologico conferito dall'Osservatorio delle Malattie delle Piante di Corticella (Bologna).

1d. *B. bassiana*, ceppo isolato da carpofori marcescenti di *Xanthochrous tamaricis* Pat. = *Inonotus tamaricis* (Pat.) Maire apud Pilat = *Polyporus tamaricis* (Pat.) Sacc. ò *D. Sacc.*, basidiomicete parassita ed agente di carie bianca del duramen di *Tamarix gallica* L. (da Bernicchia A.R., 1990) riviera romagnola.

1e. *B. bassiana* ceppo di confronto acquistato da micoteca internazionale C.B.S. Coltivato in primo trapianto su Emmon's Modified Saboraud's Agar, quindi mantenuto su PDA.

Colonie lanose, monocentriche, a contorno incertamente circolare. Profilo verticale raso. Lato retto bianco. Lato verso bianco tardivamente (e non sempre) pigmentandosi di giallo paglierino. Wrinkling tenue, radiale. Conidificazione frequente, ma scarsa ed oltremodo dispersa. Ogni simpodioconidioforo reca non più di 2-4 conidi ovato-sferici con misure dell'ordine dei 3 X 2,5 micron.

Spesso le colonie vanno soggette ad autostasi. Crescita lenta. I sinonimi più noti sono: *Sporotrichum sulfurescens*, *Beauveria effusa*, *B. stephanoderis*, *B. globulifera*, *B. tenella*, *B. shiotae*. 2. *Beauveria felina* (DC.: Fr.) Carm. isolato da foglie di fragola (Emilia-Romagna) e foglie di vite (Toscana). Si tratta di un inquinante. Ora è considerato quale *Isaria felina* (DC.: Fr.) Fr. e, quindi, escluso da questa trattazione.

3a. *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. Sinonimi: *Beauveria densa*, *B. melonothae*, *Sporotrichum epigaeum*. Isolata da larve di ditteri, Punta Alberete (Ravenna).

Crescita stentata in vitro su Agar PDA: lato retto cangiante dal bianco candido a bianco avorio con l'età; lato verso da bianco-gialliccio ad arancio-caramello. Osservata su matrice naturale, presenta numerosi (4-8) simpodioconidi ovali per ogni conidioforo misuranti ca. 3,8 X 3 micron, conidiofori fortemente botriosi. La produzione conidica appare fortemente accentrata in zone del micelio ove è estremamente elevata. Il micelio, appena disidratato, si disarticola a livello dei setti.

3b. *B. brongniartii* ceppo nx 148 fornito dal Laboratorio del Centro di Fitofarmacia dell'Università di Bologna. Proveniente da larve di insetti (Svizzera) e coltivato su Agar PDA.

Conidi ovali o lievemente ropaloidi misuranti ca. 4-4,5-5,2 X 2,4-2,6-3 micron.

Produzione conidica concentrata e abbondantissima. Micelio recto beige, fluff raso, farinoso, radialmente Wrinkled. Il micelio, appena disidratato, si disarticola a livello dei setti. Reverse aranciato, metallico.

4a. *Tolypocladium cylindrosporum* Gams. Sarebbe caduto in sinonimia con *Beauveria cylindrospora* (W. Gams) Von Arx. Colonie ad accrescimento estremamente lento, si estinguono in pochi trapianti su Agar Malto od Agar PDA. Contorni irregolari. Lato retto bianco-sporco, fluff ossifilo. Lato verso bianco e talora leggermente pigmentato di colore vinoso. Questo *Tolypocladium* si distingue per i fialidi recanti conidi unicellulari, ialini e decisamente cilindrici, ad apici arrotondati, raggruppati in capitoletti di 2-4 individui all'apice delle cellule conidiogene, con un portamento affine a quello di un *Acremonium*. La conidiogenesi, fialidica enteroblastica, produce conidi di 4 X 1,2 micron. Ceppo puro di confronto ottenuto da C.B.S. (nx 311.75) e coltivato su MEA (formula di Blakeslee).

4b. *T. cylindrosporum* W.Gams: reperto isolato dall'esoscheletro di un Coleottero Cerambicide adulto (*Analeptes trifasciata* F., parassita di Anacardiaceae in Ciccarone, 1990) in località Lamto di savana ivoriana (detta localmente, con termine francofono di significato fitosociologico, savana arborata a "palmes roiners" e, successivamente, da carcasse di Coleotteri Dinastini della specie *Xylotrupes gideon* L. raccolti al suolo su pista sterrata fiancheggiante il fiume Cavally (al confine tra Liberia e Costa d'Avorio). Si riproduce la diagnosi: "Micelio tenue (difficilmente visibile ad occhio nudo: calibro medio di 2 micron), ialino, di consistenza sericea, tenace, con parete tenuemente granulata in brevi segmenti di parete ifale sub-apicali; setti difficilmente evidenziabili a meno di 1200 ingrandimenti; ramificazioni rade, sub-ortogonali. Fialidi ialini, a parete liscia, non annulati, intercalari, laterali (oppositi od alterni) oppure terminali, flessuosi, pedalmente settati, alti circa 10 micron. Producono, per conidiogenesi fialidica enteroblastica, conidi ialini, bacilliformi, di 4,5 * 1,3 micron, talora recati in capitoletti di 2-4 individui all'apice delle cellule conidiogene. Produzione di conidi su matrice naturale, su CMA, su MEA, su Bacto-Agar a 25 °C ed U.R. > 60%. Accrescimento su CMA mediamente rapido (40 mm. di diametro in 10 gg. a 20°C) formando colonie a contorno sfrangiato, policentriche, irregolari, di colore bianco-giallastro.

5. *Tolypocladium geodes* W. Gams. = *Beauveria geodes* (W. Gams) Von Arx : isolato proveniente da suolo di conifere fornito dal C.B.S. (n. 723.70) coltivato su PDA. Il micelio da noi osservato è sterile.

6. *Tolypocladium inflatum* W. Gams. Proviene da humus di regosuoli alpestri con la sigla UAMH 4828. Acquistato presso C.B.S. coltivato su MEA (formulazione di Blakeslee). Presenta fialidi isolati, botriosi dal collo lungo (complessivamente raggiungono i 12 micron) ed esile che estrude conidi minutissimi (1,5 X 1 micron) di forme variabili tra l'ellittico e lo sferico. Il micelio, esile (0,7-1,5 micron di sezione), è poco vitale e si presenta in forma di affioramenti di ciuffetti policentrici biancastri dei quali è difficile discernere i caratteri di un lato verso ed uno retto.

7. *Tolypocladium nubicola* Bisset= *Beauveria nubicola* (Bisset) Von Arx, isolata da regosuoli alpini, fornito da DAOM con il nx 167320. Coltivato su MEA.

Colonie policentriche levaniformi a bordo tondeggiate, netto: micelio aereo abbondante, lanoso; lato retto bianco candido. Lato verso centralmente aranciato e perifericamente color giallo-carota. Wrinkling radiale, a settori, spiccata autoinibizione. Fialidi intercalari o terminali, producenti conidi ovoidi, minuscoli (diametro 2 micron). Fortemente ossifilo. Accrescimento moderato.

8. *Tolypocladium parasiticum* Barron. Colonia pura acquistata presso C.B.S. Coltivato su MEA. Isolato n° 300.83 originariamente collezionato da emocele di Rotiferi.

Colonie policentriche centralmente depresse, a bordo irregolarmente rotondeggiate, netto: micelio aereo lanoso; lato retto bianco (lascia trasparire il sottostante pigmento variabile dal carota al beige, non molto diffusibile). Conidificazione in vitro non evidenziabile. Wrinkling sagittale. Accrescimento lento.

9. *Tolypocladium penicillariae* Bref. Ceppo C.B.S. n° 377.36 originariamente isolata da *Pennisetum*. Coltivato su MEA.

Colonie policentriche rase, a bordo nettissimo, a profilo policentrico: micelio aereo scarso (velutino, bianco) od assente, micelio immerso membranaceo, color carne, superiormente ed inferiormente raggricciato in raggi settoriali. Pigmentazione del lato verso color carota, non diffondibile. Autoinibizione assente. Produzione conidica da cellule conidiogene micronematiche laterali intercalari o terminali. I conidi sono a profilo litoide e misurano ca. 1-1,6-2 micron di diametro. Accrescimento vegetativo comparativamente rapido, anossifilo.

10. *Tolypocladium tundrense* Bisset. Ceppo terricolo, boreale, prodotto da DAOM (nx167133), coltivato su PDA.

Colonie policentriche centralmente rase, a bordo irregolarmente rotondeggiate, fioccoso: micelio aereo lanoso, lato retto bianco candido. Lato verso color carota, intenso, gradatamente attenuatesi ai bordi e moderatamente diffondibile. Wrinkling sagittale. I conidi, prodotti da cellule conidiogene micronematiche laterali, sono globosi e subsferici (diametro aggirantesi sugli 1,8 micron) e la loro individuazione è problematica anche ad elevato ingrandimento. Modesta autoinibizione. Accrescimento moderatamente lento.

CONCLUSIONI.

I membri del genere *Tolypocladium* W. Gams presentano caratteri morfologici, fisiologici ed etologici che sembrano caratteristicamente comuni e che li differenziano dai componenti il genere *Beauveria* Vuill.

1) I *Tolypocladium* possono trovarsi su parti inerti (esoscheletro) di insetti (preferibilmente di Coleotteri, Imenotteri Formicidi ed Emitteri Omotteri) od anche su insetti vivi dai quali vengono facilmente veicolati, ma non si costituiscono come parassiti nè dello stadio larvale nè dello stadio adulto: differentemente da quanto si riscontra in *Beauveria bassiana* ed in *B. brognartii* che non soltanto sono parassiti opportunisti molto attivi (attaccano, cioè, le larve in condizioni di particolar-

mente favorevole recettività di queste ultime), ma sono difficilmente isolabili da differenti substrati.

2) L'habitat di *Tolypocladium* è collegabile ai suoli aridi e freddi ed alle acque: esso è spiccatamente ossifilo e fotoindifferente. Meno legato di *Beauveria* alla condizione di aerazione stagnante per il suo sviluppo e può svilupparsi in presenza di acqua, ove *Beauveria* viene, in condizioni di umidità eccessiva, facilmente sopraffatta da altri competitori quali *Ascosphaera* e *Trichoderma*. 3) Il carattere morfologico particolare delle cellule conidiogene di *Beauveria* secondo la tassonomia ufficialmente vigente, consente, tutt'al più, di escludere dal genere alcune specie, ma non di farvi rientrare specie del genere *Tolypocladium*. *Beauveria*, infatti, produce simpodioconidi a partire, cioè, da un conidioforo la cui zona fertile estrude più conidi da pori germinativi disposti secondo una simmetria simpodiale.

Il tipo di conidiogenesi è oloblastico-alternata con secessione schizolitica in sequenza casuale dei conidi dai lati della zona fertile di cellule conidiogene simpodiali. Secondo Ainsworth, perciò, *Beauveria* si conforma ad una formula ontogenetica del tipo 1-A1.hb-sy.

Qualcosa del genere avviene in *Tritirachium* Limber, ma sicuramente non in *Tolypocladium* che presenta cellule conidiogene tipicamente enteroblastiche fialidiche 1-A1.eb-ph.

Oltre a ciò, va considerato che in *Tolypocladium* le cellule conidiogene sono rigorosamente isolate (ad eccezione di *Trichoderma polysporum*) e presenti in numero relativamente modesto entro piccole zone fertili, mentre in *Beauveria* le cellule conidiogene (spesso ancora più rarefatte) sono raggruppate in mazzetti di 5-6 individui.

4) Le colture in vitro di *Beauveria* gen. e di *Tolypocladium* hanno due caratteri in comune: presentano il lato recto bianco o velatamente pigmentato (di giallo, rosa, beige) ed un accrescimento stentato o lento.

Alcuni *Tolypocladium* si estinguono su substrato sintetico agarizzato oppure perdono la capacità di produrre conidi.

Differiscono tra loro per la colorazione del lato verso che è appena percettibile in *Beauveria*, mentre si presenta sempre intensa nelle specie di *Tolypocladium*.

5) Le colonie "in vivo" di *Tolypocladium* hanno una consistenza ottica sericea, tenue e di consistenza meccanica relativamente tenace alla trazione. Le colonie "in vivo" di *Beauveria* sono, al contrario, granulose, facilmente sfaldabili; se reidratate, le ife (che presentano un habitus farinoso) si disarticolano frammentandosi a livello dei setti.

6) Anche megeticamente i generi considerati in questo lavoro presentano un distacco considerevole tra loro.

Se *Trichoderma* può essere osservato comodamente con ingrandimenti nell'ordine degli 800 X, nel caso di *Tolypocladium* sono indispensabili i 1200 X, mentre per *Beauveria* richiede oltre 1600X e sino a 2000 X acciocchè sia ben evidente il dettaglio dei conidiofori simpodiali.

Il micelio di *Trichoderma*, inoltre, presenta caratteri inconfondibilmente distinti da quelli presentati dal micelio di *Tolypocladium* o di *Beauveria*. In un solo caso

si è osservata una situazione di ambiguità tra *Trichoderma* e *Tolyocladium*; ciò è avvenuto, precisamente, con *Trichoderma polysporum* la cui morfologia presenta caratteri transizionali.

Per lo studio di questi particolari corpuscoli è vantaggioso applicare l'effetto di un Electronic Magnification Enhancer ad obiettivi di moderato ingrandimento (80-100 X) piuttosto che spingersi oltre con l'ingrandimento ottenuto ricorrendo solo ad accorgimenti ottici.

NOTE.

C.B.S.= Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn-Delft.

DAOM = Plant Research Institute, Dept. of Agriculture, Mycology, Ottawa, Canada.

UAMH = University of Alberta, Mold Herbarium and Culture Collection, Edmonton, Canada.

MEA = Malt Extract Agar.

PDA = Potato Dextrose Agar.

I-A1.hb-sy.= ameroconidi ialini prodotti per conidiogenesi oloblastica da conidiofori simpodiali.

I-A1.eb-ph.= ameroconidi ialini prodotti per conidiogenesi enteroblastica da cellule conidiogene fiialidiche.

RIASSUNTO

Si discute sulla possibilità che *Beauveria* e *Tolyocladium* siano sinonimi come scritto da alcuni AA. L'occasione di osservare molti ceppi di funghi appartenenti a questi due generi ha suggerito agli autori l'opportunità di mettere in rilievo come alle differenze di carattere fisiologico e morfologico (care a micologi e botanici) si associno differenze di entomopatogenicità.

Si passa in rassegna un gruppo di questi funghi ad ecologia entomocora e si sottolineano alcuni dei dettagli che non sempre consentono di accettare questa sinonimia.

Notes on the *Beauveria-Tolyocladium* in symbiosis with insects.

SUMMARY

Some authors suggest the treatment of whole genres such as *Beauveria* and *Tolyocladium* as they were totally synonyms. Here we exhibit some reasons supporting the thesis that (by the technical point of view, at least) the genres should be considered ecologically, ethologically, biometrically and also morphologically different and then maintained in distinct sites.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- BERNICCHIA A.R., 1990.- Polyporaceae s.l. in Italia.- *A cura dell'Istituto di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi di Bologna*, pp. 584.
- CAMPADELLI G. e CICCARONE C., 1992.- Micromiceti isolati da varie specie di larve nel legno di essenze forestali.- *Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna*, 46:173-178.
- CICCARONE C., 1990.- Due miceti entomopatogeni segnalati su ospiti inconsueti. Nota II.- *Micologia Italiana*, 1:78-81.
- HATT H.D., GANTT M.J., SCAMORDELLA C.J., 1987.- ATCC Catalogue of Fungi/Yeasts.- 17 th. Edition, Rockville, Md, USA.
- HAWKSWORTH D.L., SUTTON B.C., AINSWORTH G.C. et alii, 1983.- Ainsworth Bisby's Dictionary of the Fungi (including the Lichens).- C.M.I., Kew, Surrey, G.B., pp. 445.