

Fernando Mafalda Freire

**Taxonomia e distribuição de *Ophiocordyceps dipterigena*
(*Ophiocordycipitaceae*, *Hypocreales*)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. David Peter Hughes

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Freire, Fernando Mafalda

Taxonomia e distribuição de *Ophiocordyceps dipterigena*
(Ophiocordycipitaceae, Hypocreales) / Fernando Mafalda Freire ;
orientador, Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos ; coorientador,
David Peter Hughes. - Florianópolis, SC, 2015.

128 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Micologia. 3.
Ascomycota. 4. fungos entomopatógenos. 5. sistemática
filogenética. I. Drechsler dos Santos, Elisandro Ricardo. II.
Hughes, David Peter. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e
Plantas. IV. Título.

Fernando Mafalda Freire

**Taxonomia e distribuição de *Ophiocordyceps dipterigena*
(*Ophiocordycipitaceae*, *Hypocreales*)**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Florianópolis, 31 de Agosto de 2015.

Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos,
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos
(Presidente/PPG FAP/UFSC)

Prof. Dr. Jadergudson Pereira
(Externo/UESC)

Prof. Dr. Luiz Carlos de Pinho
(Externo/UFSC)

Dr. Mateus Arduvino Reck
(PPG FAP/UFSC)

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, a minha filha e ao meu grande amor.

AGRADECIMENTOS

As pessoas que colaboraram para conclusão deste trabalho, coletando e disponibilizando belíssimos exemplares de *Cordyceps*. Sei que apesar de haver na biologia muitas coisas incríveis a serem coletadas estas pessoas reservaram um tempinho para pensar nos fungos patógenos de insetos e de alguma forma lembraram de mim. Agradeço especialmente ao Prof. Admir, a Cris, ao João Araújo, ao Felipe, ao Vitor, ao Alti e a Fernanda que foram os que contribuíram diretamente com materiais para esta dissertação.

A Dr. Tatiana Sanjuám que me recebeu muito bem na Colômbia e que me ajudou a obter literaturas, discutir parte de meu trabalho. Muito obrigado pelos ensinamentos e pela oportunidade de fazer uma inesquecível expedição de campo na Colômbia.

Ao Dr. Carlos José Carvalho-Pinto e ao Dr. Luiz Carlos Pinho pelas identificações dos hospedeiros bem como pela discussão sobre a ecologia e distribuição dos mesmos, pois serviram como peça fundamental para formulação e corroboração das hipóteses aqui presentes.

Ao pesquisador Fumio Ihara pela contribuição com fotos e descrições de exemplares do Japão.

Ao Shigeo Ootake pela colaboração com literatura e pelas conversas sobre suas observações em relação aos *Cordyceps* do Japão.

A Patricia Rogers por fornecer imagens e informações importantes sobre espécimes depositados no University of Michigan Herbarium.

A toda a equipe do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC), especialmente a Eliana de Medeiros Oliveirae a Tammy Iwasa Arai, que realizaram minhas análises de MEV.

Aos colegas e amigos do Micolab pelo apoio durante este trabalho. Espero que minhas brincadeiras tenham sido entendidas da melhor forma possível e que minha desorganização não tenha superado meu esforço de estar sempre bem humorado e disposto a ajudar a todos.

Marcão, Val, Diogo, Carlos, Mel, Alti e Salo, eu e vocês somos de alguma forma os dinossauros do Micolab UFSC e fico grato pelas experiências que tivemos juntos (boas e ruins), cada um marcou minha vida de alguma forma.

Um grande abraço para os que entraram junto comigo no Mestrado aqui no Micolab, Gesi, Raquel, Caio, Ari e Celeste, foi uma caminhada e tanto. Saibam que representam muito pra mim e que estarei

sempre com um sorriso no rosto quando lembrar de vocês e do período que passamos juntos. Aos que entraram mais recentemente no lab, Genivaldo, Melissa, Jaime, Peruca, Samuel, Mari e Mary, Obrigado pelas vivências sorte nessa nova empreitada.

Mateus, obrigado pelo companheirismo, dedicação e atenção especial que você deu a nós do Micolab.

Raquel, adorei trabalhar lado a lado contigo, fico muito feliz por todo seu sucesso, pois pude ver durante estes dois anos a mulher batalhadora e incrível que você é. Sei que vitórias, na carreira e na vida, são rotina para você, mas espero ver ainda mais das suas façanhas.

Um agradecimento especial ao João Araújo, com quem me correspondi e quem me aconselhou durante o mestrado. Obrigado não apenas pelo apoio intelectual e técnico, mas também por proporcionar a viagem mais incrível que já fiz. Além de muito divertida foi a realização de um sonho.

Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos, ou melhor, Ricardo, obrigado por tudo. As experiências em viagens foram indescritíveis, agradeço muito pelas oportunidades que você me deu e espero retribuí-las de alguma forma. Obrigado pelos ensinamentos, pelas discussões e principalmente pela Amizade. Você é um exemplo de pessoa para todos, principalmente para seus alunos.

Gostaria de agradecer a minha família que me deu suporte emocional e financeiro para minha formação acadêmica e pedir desculpa pelos meus momentos de estresse. Espero que vocês entendam minha ausência, tanto em momentos de dificuldade quanto de confraternização. Eu sempre reconheci a importância de todos na minha formação como pessoa, mas tive que ser egoísta diversas vezes, pois alguns obstáculos exigiam muito do meu tempo para superá-los.

Abraços e beijos especiais aos meus pais, Marco Antônio e Silvine, e meu irmão, Diango, saibam que podem contar comigo a qualquer momento. Sei que cada um de nós tem visões de mundo diferentes, mas também sei do amor incondicional que sentimos uns pelos outros. Obrigado pelo apoio, amor e carinho durante essa jornada.

Obrigado a Larinha, minha filha, que foi motivo de alegrias para mim e para toda minha família. São as pequenas coisas que vejo nela que me motivam a sonhar com um mundo melhor.

Sou muito grato a minha segunda família, Beto, Nani, Ro, Hique e Gabi que me aceitaram e me acolheram.

Abraços e beijos especiais para minha grande companheira, Fernanda, que esteve sempre presente nos melhores e piores momentos durante esta jornada na Micologia. Ela que foi a principal incentivadora

para minha entrada no Micolab e, portanto o gatilho para as minhas aventuras no incrível mundo da Micologia. Foi minha maior inspiração e até hoje me surpreende por ser uma pessoa incrível em todos os aspectos. Índia, te amo muito.

“Nada na biologia faz sentido exceto à luz da evolução.”

(Theodosius Dobzhansky, 1973)

RESUMO

Ophiocordyceps representa o maior e mais variado táxon de *Ophiocordycipitaceae*, tanto morfológico quanto ecologicamente. *Ophiocordyceps dipterigena* foi descrito por Berkeley e Broome (*Cordyceps dipterigena*), em 1875, a partir de um material coletado em uma mosca adulta no Sri Lanka (Ceilão). Atualmente o táxon, apresentando distribuição pantropical, é caracterizado morfológicamente pelos estromas filiformes, capitados, marrom alaranjados a amarelados, região fértil terminal, hemisférica e bem definida. Apresenta uma ampla variedade de hospedeiros (moscas adultas) e atualmente possui seis sinônimos heterotípicos. Apesar das evidências de um complexo taxonômico, nenhum estudo mais aprofundado (morfológico e molecular) foi realizado com este táxon até o momento. Este trabalho apresenta aspectos taxonômicos, ecológicos e filogenéticos sobre *O. dipterigena*, a partir de análises morfológicas (macro, micro e ultraestruturais) e de biologia molecular. Ao todo, foram revisados 84 materiais parasitas de moscas adultas de espécimes morfológicamente e ecologicamente próxima de *O. dipterigena*. Uma filogenia (ITS) do complexo *O. dipterigena* é apresentada, assim como uma discussão geral sobre diferentes possíveis novos táxons existentes. Novos caracteres relevantes para a interpretação de hipóteses de espécies são apresentados. O nome *Cordyceps muscicola* é resgatado da sinonímia de *O. dipterigena* sendo caracterizada por parasitar moscas grandes, geralmente aderidas na superfície abaxial, mas sempre com micélio recobrendo todo hospedeiro, até o momento ocorrente na Floresta Ombrófila Densa do território Catarinense. Além da lectotipificação do desenho do protólogo de *C. muscicola* e da epitipificação de um espécime da localidade do tipo (Blumenau) a espécie é combinada em *Ophiocordyceps*, *O. muscicola*. Outras três espécies (*Ophiocordyceps* sp. 1, sp. 2 e sp. 3), que se diferenciam no complexo *O. dipterigena*, são apresentadas, são caracterizadas pela combinação de caracteres morfológicos e ecológicos. Outras possíveis espécies novas são discutidas. Este trabalho demonstra uma grande diversidade no complexo *O. dipterigena* e prevê o elevado potencial de revelar uma diversidade maior ainda com pesquisas futuras.

Palavras-chave: Ascomycota, *Cordyceps* s.l., fungos entomopatógenos, complexo taxonômico, sistemática filogenética.

ABSTRACT

Ophiocordyceps is the largest and most varied taxon of *Ophiocordycipitaceae*, both morphologically and ecologically. *Ophiocordyceps dipterigena* was described by Berkeley and Broome (as *Cordyceps dipterigena*) in 1875 from material collected on an adult fly in Sri Lanka (Ceylon). Currently, the taxon presents pantropical distribution and is morphologically characterized by having filiform, capitate, orange-brown to yellowish stromata and a terminal, hemispheric, well defined fertile region. *Ophiocordyceps dipterigena* occurs on a wide variety of hosts (adult flies) and currently has six heterotypic synonyms. Despite the evidence of a possible taxonomic complex, no detailed investigation into the possibility of cryptic species has yet been conducted. This work offers the first comprehensive taxonomic, ecological and phylogenetic treatment of the *O. dipterigena* complex, supported by morphological and molecular analyses. In all, eighty-five collections morphologically and ecologically related to *O. dipterigena* were examined. A phylogeny (ITS) of the *O. dipterigena* complex is presented, as well as a general discussion on potentially new taxa in the complex. New characters relevant to the interpretation of species hypotheses are presented. The name *Cordyceps muscicola* is recovered from synonymy with *O. dipterigena*, characterized by a thoroughly myceliated host which often adheres to the abaxial surface of leaves, until the moment occurring in the Ombrophilous Dense Forest territory of Santa Catarina. In addition to the lectotypification of the protologue drawing of *C. muscicola* and epityfication of a specimen from the type locality (Atlantic rainforest of Blumenau), the species is recombined in *Ophiocordyceps* as *O. muscicola*. Three additional species are described (*Ophiocordyceps* sp. 1, sp. 2 and sp. 3) which differ in the *O. dipterigena* complex on the basis of morphological and ecological characters. Other possible new species are discussed. This work demonstrates both a greater diversity within *O. dipterigena* complex than previously considered, and forecasts the high potential for revealing greater diversity with further research.

Keywords: *Ascomycota*, *Cordyceps* s.l., entomopathogenic fungi, taxonomic complex, phylogenetic systematics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da distribuição conhecida de *Ophiocordyceps dipterigena*. O quadrado verde indica a localidade onde foi coletado o holótipo.33

Figura 2. Locais de coleta dos espécimes estudados (pontos vermelhos).36

Capítulo I

Figura 1. *Ophiocordyceps dipterigena* s.s. A-B: holótipo com dois estromas sobre ramo. Figura e legenda modificadas a partir de imagens de Lloyd (1921), figura 1990 e 1991, prancha 183, página 1060. (Fonte: Google Livros, disponível em <https://books.google.com.br/>).53

Figura 2. *Ophiocordyceps dipterigena* sensu Kobayasi & Shimizu. A-B. Hospedeiro e macromorfologia de estromas e sinêmios; C. Detalhe da região fértil evidenciando os ostíolos; D. Região fértil em corte longitudinal evidenciando os peritécios; E. Detalhe do ápice do sinêmio; F. Superfície do sinêmio com células conidiogênicas; G. Conídios; H. Detalhe dos *part-spores* fusoides; I. Ascósporo com 64 *part-spores* (montagem de fotos). (Fotos cedidas e autorizadas para uso por F. Ihara)58

Figura 3. *Ophiocordyceps* sp. 1. A. Holótipo em campo (Foto por F. Bittencourt); B. Detalhe da região fértil evidenciando os ostíolos; C. Região fértil em corte longitudinal evidenciando os peritécios e o interior do estroma; D. Peritécios; E. Conídios (montagem de fotos); F. Asco com *cap* evidente; G. Detalhe do *cap*; H-I. Ascósporos com *part-spores*.63

Figura 4. *Ophiocordyceps* sp. 2. A. Holótipo em campo evidenciando hospedeiro e macromorfologia do estroma e habitat reprodutivo; B-C. Parátipos (Fotos por F. Bittencourt); D. Detalhe do estroma e da região fértil com ostíolos evidentes; E. Região fértil em corte longitudinal evidenciando os peritécios; F. Peritécio; G. Asco com *cap* evidente (montagem de fotos); H. Ascósporo com 64 *part-spores* em MEV (montagem de fotos); I-K. Detalhe da germinação de diferentes *part-spores*; L. Detalhe dos dois primeiros *part-spores* de um ascósporo em MEV67

Figura 5. *Ophiocordyceps* sp. 3. A. Holótipo em campo aderido ao seu habitat reprodutivo evidenciando o estroma e o sinêmio; B. Holótipo desidratado; C. Detalhe do estroma e da região fértil desidratados com ascósporos na superfície; D. Vista superior da região fértil evidenciando os ostíolos; E. Corte longitudinal da região fértil mostrando a disposição dos peritécios; F. Peritécio; G. Conídios (união de 6 fotos); H. Conídios em MEV (união de 4 fotos); I. Asco com *cap* evidente (montagem de fotos).....70

Figura 6. *Ophiocordyceps discoideicapitata*. A. Desenho do holótipo de *O. discoideicapitata* apresentado em Shimizu (1997); B-D. Espécimes de TNS-F. 181545 (NMNS); E. Detalhe da região fértil com ostíolos evidentes; F. Região fértil em corte longitudinal evidenciando os peritécios; G. Peritécio; H. Asco com *cap* evidente; I. Detalhe do *cap*; J-K. Detalhe dos *part-spores* dentro dos ascos.74

Figura 7. Grupo *Ophiocordyceps* cf. *discoideicapitata*. A-C. Hospedeiro sobre o seu habitat reprodutivo e macromorfologia dos estromas; D. Detalhe da região fértil evidenciando os ostíolos; E. Região fértil em corte longitudinal evidenciando os peritécios; F. Peritécio; G. Asco com *cap* evidente; H. Ascósporo com 64 *part-spores*, evidenciando os segmentos terminais mais alongados (montagem de fotos). (Fotos cedidas e autorizadas para uso por F. Ihara)77

Figura 8. *Ophiocordyceps* aff. *discoideicapitata*. A. Hospedeiro sobre o seu habitat reprodutivo e macromorfologia dos estromas e sinêmio; B. Detalhe da região fértil evidenciando os ostíolos; C. Região fértil em corte longitudinal evidenciando os peritécios; D. Corte da região fértil; E. Asco com *cap* evidente (montagem de fotos); F. Superfície do sinêmio com células conidiogênicas e um conídio; G. Conídios (união de 4 fotos).....80

Figura 9. Árvore filogenética gerada a partir do marcador ITS, com topologia baseada na análise de Inferência Bayesiana. Os números nos ramos representam os valores de BS / PP. Os ramos destacados em negrito indicam a posição dos espécimes de fungos entomopatógenos parasitas de moscas e morfologicamente relacionados a *O. dipterigena* (clado *O. dipterigena*; destacado em verde). O outro clado é composto por representantes do clado “*O. sphecocephala*” sensu Quandt et al. (2014), bem como um espécime de *O. aff. discoideicapitata*, ambos em destaque.....85

Capítulo II

Figura 1. *Ophiocordyceps muscicola*. A. Detalhe de uma prancha da obra “Phycomyceten und Ascomyceten. Untersuchungen aus Brasilien” (1901) mostrando um desenho de *C. muscicola*; B. Epítipo de *O. muscicola*; C-D. Epítipo de *O. muscicola* em campo, ainda imaturo, mostrando por dois diferentes ângulos a posição em que este táxon é comumente encontrado no ambiente; E-F. Visão lateral e superior da região fértil, com ostíolos evidentes; G. Região fértil em corte longitudinal; H. Peritécios; I. Asco com *cap* evidente; J. Ascósporos com 64 *part-spores*.....105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolos dos termociclos utilizados nas reações de PCR.....39

Capítulo I

Tabela 2. Espécimes utilizados nos estudos moleculares48

Tabela 3. Comparação entre os grupos observados no complexo
Ophiocordyceps dipterigena e táxons morfológica e ecologicamente
relacionados.81

APÊNDICE A

Tabela 2. Lista de exsiccatas revisadas.....121

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM – Amazonas

FH – Farlow Herbarium

FLOR – Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina

ICN – Código Internacional de Nomeclatura para algas, fungos e plantas; *The International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants* (Melbourne Code)

KEW – Royal Botanic Gardens

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MICH – University of Michigan Herbarium

NARO – National Agriculture and Food Research Organization

NMNS – National Museum of Nature and Science

PARNA SI – Parque Nacional da Serra do Itajaí

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PE Fritz Plauman – Parque Estadual Fritz Plauman

PR – Paraná

RR – Roraima

SC – Santa Catarina

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

cm – centímetro

comp. – comprimento

diam. – diâmetro

et al. – do latim *et alii*, e colaboradores, e outros

Fig., Figs. – Figura, Figuras

h – hora

Kev – mil elétrons-volt

M – molar

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

μL – microlitro

μm – micrômetro

nm – nanômetro

rpm – rotações por minuto

s – segundo

s.l. – do latim *sensu lato*, no sentido amplo

s.s. – do latim *sensu strictu*, no sentido específico

v – volume

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	25
2. INTRODUÇÃO	26
2.1 MACROFUNGOS ENTOMOPATÓGENOS (<i>CORDYCEPS</i> s.l.)	26
2.2 <i>OPHIOCORDYCEPS</i> E SUA TAXONOMIA	27
2.2 <i>OPHIOCORDYCEPS</i> DIPTERIGENA	29
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 ESPECIFICAMENTE	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. COLETAS E COLEÇÕES EXAMINADAS E PROCESSAMENTO DO MATERIAL.....	35
4.2. OBSERVAÇÕES SOBRE O HOSPEDEIRO E ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	37
4.3. ANÁLISES MOLECULARES	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
CAPÍTULO I - EVIDÊNCIAS MORFOLÓGICAS, ECOLÓGICAS E MOLECULARES DE ESPÉCIES NOVAS NO COMPLEXO TAXONÔMICO EM <i>OPHIOCORDYCEPS DIPTERIGENA</i>	43
CAPÍTULO II - ESTUDO TAXONÔMICO E NOMENCLATURAL DE <i>CORDYCEPS MUSCICOLA</i> MÖLLER	96
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	112
REFERÊNCIAS	114

1. APRESENTAÇÃO

Neste trabalho é apresentada uma filogenia do complexo *Ophiocordyceps dipterigena* (Berk. & Br.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora e uma revisão morfológica detalhada do táxon a partir de espécimes coletados e de referência, considerando marcadores ecológicos, como a distribuição, habitat reprodutivo e informações sobre hospedeiro. A partir dessas análises foi possível detectar diferentes grupos, podendo representar diferentes espécies, devido principalmente a um conjunto de características morfológicas e ecológicas. Dessas, além da discussão do que poderia ser *O. dipterigena* s.s., é resgatado um nome para uma espécie distinta, bem como são apresentadas outras espécies como novas. A presente dissertação está subdividida em Introdução (Fundamentação Teórica), Objetivos, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Considerações Finais e Referências. Os Resultados e Discussão estão subdivididos em dois capítulos que apresentam:

Capítulo I – Evidências morfológicas, ecológicas e moleculares de espécies novas no complexo taxonômico em *Ophiocordyceps dipterigena*.

Capítulo II – Estudo taxonômico e nomenclatural de *Cordyceps muscicola*.

Todas as referências bibliográficas citadas na Introdução e Material & Métodos são apresentadas no final deste último item. As referências dos demais capítulos são apresentadas no final de cada um deles, bem como uma tabela com os espécimes examinados é apresentada no final da dissertação.

2. INTRODUÇÃO

O Reino Fungi compreende organismos eucariontes e heterotróficos por absorção. Estes organismos possuem um importante papel na dinâmica dos ecossistemas por serem decompositores e contribuírem na ciclagem de nutrientes. Além da decomposição de matéria orgânica morta, os fungos estão associados com a maior parte dos organismos vivos, podendo formar micorrizas com raízes de plantas, atacar árvores vivas, causar doenças em animais ou mesmo matar insetos (Stajich et al. 2009). Aproximadamente 100 mil espécies de fungos são reconhecidas pela ciência (Kirk et al. 2008). Destas, quase 22 mil produzem estruturas reprodutivas sexuadas macroscópicas, denominadas ascomas e basidiomas, sendo distribuídos nos filos Ascomycota e Basidiomycota, respectivamente (Mueller et al. 2007).

2.1 MACROFUNGOS ENTOMOPATÓGENOS (*CORDYCEPS* s.l.)

Os fungos entomopatógenos são caracterizados por serem patógenos de artrópodes, infectando usualmente insetos e aracnídeos e utilizando o hospedeiro para concluir parte do seu ciclo de vida. Grande parte desses fungos pertence a Ascomycota e é comumente encontrada em campo na forma anamórfica (Sosa-Gómez et al. 2010). *Cordyceps* Fr. (*Hypocreales*), por sua vez, é caracterizado por apresentar espécies patogênicas de artrópodes que utilizam o hospedeiro para produzir um ou mais estromas e, conseqüentemente, as estruturas que darão origem aos esporos sexuais (ascósporos), concluindo assim a parte sexual do seu ciclo reprodutivo (Sung et al. 2007).

O ciclo de vida destes fungos é sempre direto, ou seja, utilizam somente um hospedeiro, não havendo hospedeiros intermediários. Infecções por *Cordyceps* são altamente “virulentas”, matando o hospedeiro durante seu desenvolvimento e utilizando seus recursos para produzir estruturas reprodutivas que se projetam deste, a fim de dispersar esporos, os quais podem então infectar outros hospedeiros (Hughes et al. 2009). São comuns os casos de utilização destes fungos como controle biológico em florestas e na agricultura, devido a especificidade entre patógeno e hospedeiro (Sosa-Gómez et al. 2010). Contudo, experimentos de infecção *in vitro* reproduzidos em ambiente controlado demonstraram que é possível que algumas espécies deste grupo possam atuar de forma menos específica, infectando espécies de hospedeiros não usuais (Hughes et al. 2009). Ainda assim, existem evidências de que a maior parte das espécies de fungos

entomopatógenos está restrita a uma única espécie de hospedeiro ou a um conjunto de espécies filogeneticamente relacionadas (Sung et al. 2007, Evans et al. 2011).

Estudos moleculares recentes revelaram diferentes linhagens filogenéticas em *Cordyceps* s.l. (Sung et al. 2007). Atualmente, suas espécies estão distribuídas em 17 gêneros reconhecidos principalmente por estruturas teleomórficas (*Ascopolyporus* Möller, *Conoideocrella* D. Johnson, G.-H. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, *Cordyceps* s.s., *Hyperdermium* J.F. White, R.F. Sullivan, Bills & Hywell-Jones, *Hypocrella* Sacc., *Metacordyceps* G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, *Moelleriella* Bres., *Ophiocordyceps* Petch, *Orbiocrella* D. Johnson, G.-H. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, *Pochonia* Bat. & O.M. Fonseca, *Podocrella* Seaver, *Regiocrella* P. Chaverri & K.T. Hodge, *Samuelsia* P. Chaverri & K.T. Hodge, *Shimizuomyces* Kobayasi, *Tolypocladium* W. Gams., *Torrubiella* Boud., *Villosiclava* E. Tanaka & C. Tanaka), além de diversos outros gêneros relacionados a estes, caracterizados por estruturas anamórficas (p. ex. *Akanthomyces* Lebert, *Gibellula* Cavara, *Hirsutella* Pat., *Hymenostilbe* Petch, *Isaria* Pers., *Metarhizium* Sorokin). Todos esses gêneros estão distribuídos nas três famílias, *Cordycipitaceae* Kreisel ex G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, *Clavicipitaceae* Earle, *Ophiocordycipitaceae* G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, de *Hypocreales* Lindau (Kobayasi 1981, Sung et al. 2007, Tanaka et al. 2008, Johnson et al. 2009, Araújo et al. 2014, Quandt et al. 2014).

São conhecidas mais de 400 espécies de *Cordyceps* s.l. (Sung et al. 2007), as quais infectam uma vasta diversidade de hospedeiros, dentre eles nove ordens de insetos, uma ordem de aranhas e também uma ordem de fungos hipógeos (Hughes et al. 2009). As espécies de *Cordyceps* s.l. podem ser encontradas em qualquer ambiente terrestre, com exceção da Antártica, com destaque para as regiões subtropicais e tropicais do planeta, o que reflete a importância ecológica destes organismos nessas regiões (Sung et al. 2007).

2.2 OPHIOCORDYCEPS E SUA TAXONOMIA

Ophiocordycipitaceae representa a maior família de *Cordyceps* s.l. e compreende dois gêneros, *Tolypocladium* (*Elaphocordyceps* G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora) e *Ophiocordyceps*. O primeiro consiste em espécies que parasitam trufas (*Elaphomyces*) e ninfas de cigarras (*Hemiptera*, *Auchenorrhyncha*). O segundo representa

o mais diverso táxon desta família, tanto morfológicamente quanto ecológicamente, com mais de 150 espécies descritas (Sung et al. 2007).

Ophiocordyceps compreende espécies que produzem estromas rígidos a flexíveis ou fibrosos, raramente carnosos, completamente ou parcialmente escuros. Usualmente, as espécies do gênero apresentam região fértil não terminal (mediana) com peritécios superficiais, parcial ou completamente imersos, oblíquos ou transversais em relação à superfície do ascoma. Os ascos são hialinos, cilíndricos (filiformes a vermiformes), com espessamento da parede no seu ápice (*cap*) e os ascósporos são geralmente cilíndricos, multiseptados, podendo ou não se fragmentar/desarticular em *part-spores*. Além disso, parasitam hospedeiros em diferentes estágios de desenvolvimento (ninfas, larvas, pupas e adultos) encontrados em diversos substratos, como enterrados no solo, entre ou sob a serapilheira, em madeira em decomposição e sobre/sob folhas ou galhos (Sung et al. 2007).

Algumas espécies de *Cordyceps* s.l. apresentam grande variação morfológica e/ou ampla distribuição geográfica, bem como uma aparente plasticidade na utilização de hospedeiros. Especificamente para *Ophiocordyceps* é possível citar vários exemplos, como *O. australis* (Speg.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, *O. dipterigena* (Berk. & Br.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, *O. myrmecophila* (Ces.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, *O. nutans* (Pat.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora e *O. unilateralis* (Tul. & C. Tul.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (Evans 1982, Sung et al. 2007, Evans et al. 2011). Contudo, são diversos os casos em que as espécies apresentam morfologia e ecologia muito similares, sendo denominadas espécies crípticas. Muitas vezes, por autores aceitarem a ampla variação morfológica e ecológica (distribuição geográfica e hospedeiros) de alguns táxons, bem como utilizarem chaves taxonômicas de diferentes regiões do planeta, a determinação/delimitação das espécies pode ser comprometida e isso promove o surgimento de um problema recorrente, os complexos taxonômicos (Evans & Samson 1982, Evans & Samson 1984, Evans et al. 2011).

Historicamente, há trabalhos como o de Petch (1932), que apresenta dezenas de sinonimizacões em diferentes táxons a partir de revisões de materiais tipo e de seus respectivos protólogos. Por outro lado, recentemente, alguns trabalhos que utilizam morfologia detalhada, análises moleculares e dados sobre a distribuição geográfica e o hospedeiro, vem sendo realizados para solucionar problemas taxonômicos em *Ophiocordyceps*. Evans et al. (2011) e Araújo et al.

(2015) estudaram o complexo *O. unilateralis* e, a partir de materiais morfológicamente similares a este táxon, propuseram quatro e três novas espécies, respectivamente, com base principalmente nos diferentes hospedeiros e na micromorfologia dos esporos sexuais.

Esses fungos entomopatógenos vêm, recentemente, recebendo destaque no meio científico, devido à sua importância ecológica e o seu potencial econômico na produção de biocompostos e como biocontrole (Sasaki et al. 2012, Xiang et al. 2013). Muitas novidades taxonômicas estão sendo apresentadas, entre elas novas espécies de *Ophiocordyceps*, como *O. camponoti-balzani* H.C. Evans & D.P., *O. camponoti-melanotici* H.C. Evans & D.P. Hughes, *O. camponoti-novogranadensis* H.C. Evans & D.P. Hughes, *O. camponoti-rufipedis* H.C. Evans & D.P., *O. communis* Hywel-Jones & Samson, *O. halabalaensis* Luangsa-ard, Ridkaew, Tasan. & Hywel-Jones, *O. laojunshanensis* J.Y. Chen, Y.Q. Cao & D.R. Yang (Chen et al. 2011, Evans et al. 2011, Luangsa-Ard et al. 2011, Sung et al. 2007). Sendo assim, a circunscrição do gênero, bem como de algumas espécies, está passando por um momento dinâmico do ponto de vista taxonômico e a adição de espécimes da região Neotropical poderá contribuir de forma significativa para os trabalhos de *Ophiocordyceps* e táxons relacionados.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular nas últimas décadas foi possível elucidar algumas relações em *Hypocreales*, especialmente entre as três famílias que abrangem *Cordyceps* s.l. Contudo, apesar das relações filogenéticas entre os táxons do grupo estarem teoricamente “estáveis” e bem suportadas, é inevitável que novos gêneros sejam propostos a fim de delimitar os diversos clados inclusivos apresentados nas filogenias da família e especificamente em *Ophiocordyceps*. A inclusão de dados moleculares de espécimes da região Neotropical pode resultar em árvores com topologias diferentes das existentes nas atuais filogenias, revelando não só novidades científicas (novos táxons) como também novas interpretações das relações filogenéticas entre as espécies do gênero.

2.2 OPHIOCORDYCEPS DIPTERIGENA

Ophiocordyceps, um táxon que tem chamado atenção pela ampla distribuição geográfica, variação morfológica e por parasitar diversas espécies de hospedeiros é *O. dipterigena*. A espécie foi descrita por Berkeley e Broome, em 1875, a partir de um material coletado em uma mosca adulta no Sri Lanka (antigo Ceilão). O táxon é caracterizado morfológicamente por apresentar de um a vários estromas filiformes (2-

8 mm de comprimento), capitados, de cor marrom alaranjado a amarelado; uma região fértil terminal, hemisférica, bem definida; peritécios ovoides a cônicos, totalmente imersos na região fértil; ascos cilíndricos e filiformes, com oito ascósporos também cilíndricos, filiformes e multiseptados (Mains 1958, Kobayasi e Shimizu 1978).

Todavia, esta descrição assemelha-se a circunscrição de outras espécies, como por exemplo, *Ophiocordyceps lloydii* (H.S. Fawc.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, descrita originalmente para Guiana, e que, apesar de ser patógena de formigas (*Myrmicinae*), possui morfologia similar a de *O. dipterigena* (Evans 1982). Outra espécie semelhante morfológicamente é *O. discoideicapitata* (Kobayasi e Shimizu) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, registrada como ocorrente até o momento somente no Japão e que também é parasita de moscas (Kobayasi e Shimizu 1978).

Ophiocordyceps dipterigena, como atualmente reconhecido, é caracterizado por fungos que parasitam diversas espécies de moscas, com registros para as famílias *Asilidae*, *Calliphoridae*, *Muscidae* e, possivelmente, *Tabanidae* (Kobayasi & Shimizu 1978, Evans 1982, Luangsa-ard et al. 2008). Há ainda um registro do táxon parasitando *Ichneumonidae* (*Hymenoptera*), para o Suriname (Hennings 1902), porém Petch (1933) afirma que o hospedeiro é na verdade uma mosca. Algumas espécies de *Cordyceps* s.l. são tradicionalmente tratadas como parasitas generalistas, contudo as interações específicas entre parasita e hospedeiro já foram reveladas em diferentes estudos, principalmente com a inclusão de dados de distribuição geográfica e de dados moleculares (Sung et al 2007, Evans et al. 2011, Araujo et al. 2015). De modo geral, os diversos hospedeiros de *O. dipterigena* são encontrados mortos sob ou sobre folhas/galhos (Evans 1982), aderidos através do micélio que emerge dos mesmos formando uma crosta amarelo amarronzada (Mains 1958).

O táxon possui distribuição geográfica pantropical (Fig 1), tendo sua ocorrência registrada para o Brasil (Mata Atlântica do Paraná como *C. dipterigena* e de Blumenau/SC como *Cordyceps muscicola* Möller), Bolívia, Costa Rica, Cuba, Estados Unidos da América, Gana, Guiana, Indonésia, Japão, Nicarágua, Nova Guiné, Panamá, Porto Rico, República da China (Taiwan), Sri Lanka, Suriname, Tailândia, Trinidad e Tobago em áreas que apresentam elevada umidade e precipitação (Möller 1901, Petch 1932, Mains 1950, Mains 1958, Mains 1959, Chen 1978, Kobayasi e Simizu 1978, Evans 1982, Tzean et al. 1997, de Meijer 2006, de Meijer 2010).

Atualmente, *O. dipterigena* possui cinco sinônimos heterotípicos: *Cordyceps muscicola*, *C. surinamensis* Henn., *C. ouwensii* Höhn, *C. thwaitesii* Lloyd, *C. opposita* Syd. e uma forma anamórfica, *Hymenostilbe dipterigena* Petch (<http://www.indexfungorum.org/>, acessado em 20 de Julho de 2015). Outros sinônimos foram propostos para esta espécie, por exemplo *Cordyceps musae* Henn., contudo a confirmação destas propostas fica comprometida devido à dificuldade de acesso aos tipos (Mains 1958). Mains (1958) também não concorda com a proposta de sinonimização de *Cordyceps surinamensis* de Petch (1933), pois com base no protólogo da espécie, sugere que o hospedeiro seja diferente de *C. dipterigena*. De acordo com Petch (1921,1932), *Cordyceps coccigena* (Tul.) Sacc. seria sinônimo de *C. dipterigena* ($\equiv O. dipterigena$). No entanto, *Torrubia coccigena* Tul., descrita por Tulasne em 1865, a partir de coleções de Nova Guiné, tem prioridade. Além disto, o hospedeiro *T. coccigena*, embora apresentado como *Coccus* (*Hemiptera*, *Sternorrhyncha*), parece ser uma mosca de acordo com as ilustrações do protólogo (Mains 1958). Adicionalmente, de acordo com Mains (1958), Lloyd (1916) afirma não existir o espécime tipo no Herbário de Tulasne e por isso seria um erro adotar esse nome para a espécie. Outro caso é o de *Cordyceps oumensis* Höhn., que é apresentado como sinônimo de *O. dipterigena* por Sung et al. (2007). No entanto, o protólogo da espécie não apresenta descrição (Höhn 1902), portanto é provável que este tenha sido um sinônimo proposto equivocadamente.

Cordyceps muscicola parece ser o caso mais intrigante, pois foi descrita a partir do espécime coletado em Blumenau (Santa Catarina, Brasil) por Möller (1901). Apesar da morfologia e ecologia semelhantes à *O. dipterigena*, o hospedeiro e o número de estromas de *C. muscicola* poderiam ser levados em consideração para diferenciar essa espécie do material originalmente descrito para o Sri Lanka (Petch 1932).

Diversos complexos taxonômicos estão sendo elucidados, principalmente a partir de estudos moleculares (Sung et al 2007, Luangsa-ard et al. 2011, Quandt et al. 2014). Atualmente, existem 23 sequências de DNA de espécimes identificados como *O. dipterigena* no GenBank da plataforma NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, acessado em 20 de Julho de 2015). Ainda, apenas dois trabalhos utilizam em suas análises sequências do táxon (Luangsa-ard et al. 2011, Quandt et al. 2014) e nenhum desses discute especificamente as relações filogenéticas de *O. dipterigena* com outras espécies do gênero.

A ampla distribuição e a morfologia, entre outros aspectos ecológicos (hospedeiro e habitat reprodutivo), sugerem a possibilidade

da existência de mais espécies sob o nome *O. dipterigena*. Por ser um táxon com distribuição pantropical e por já existirem registros para o Brasil, os diferentes ecossistemas do país se tornam um cenário ideal para a realização de um estudo com o táxon. O estudo taxonômico de *O. dipterigena* utilizando uma abordagem integrativa, a partir de dados morfológicos (macro, micro e ultraestruturais) e moleculares possibilitara uma melhor interpretação do táxon, bem como auxilia na delimitação entre as espécies do complexo e na intenção de elucidar as relações filogenéticas entre elas.

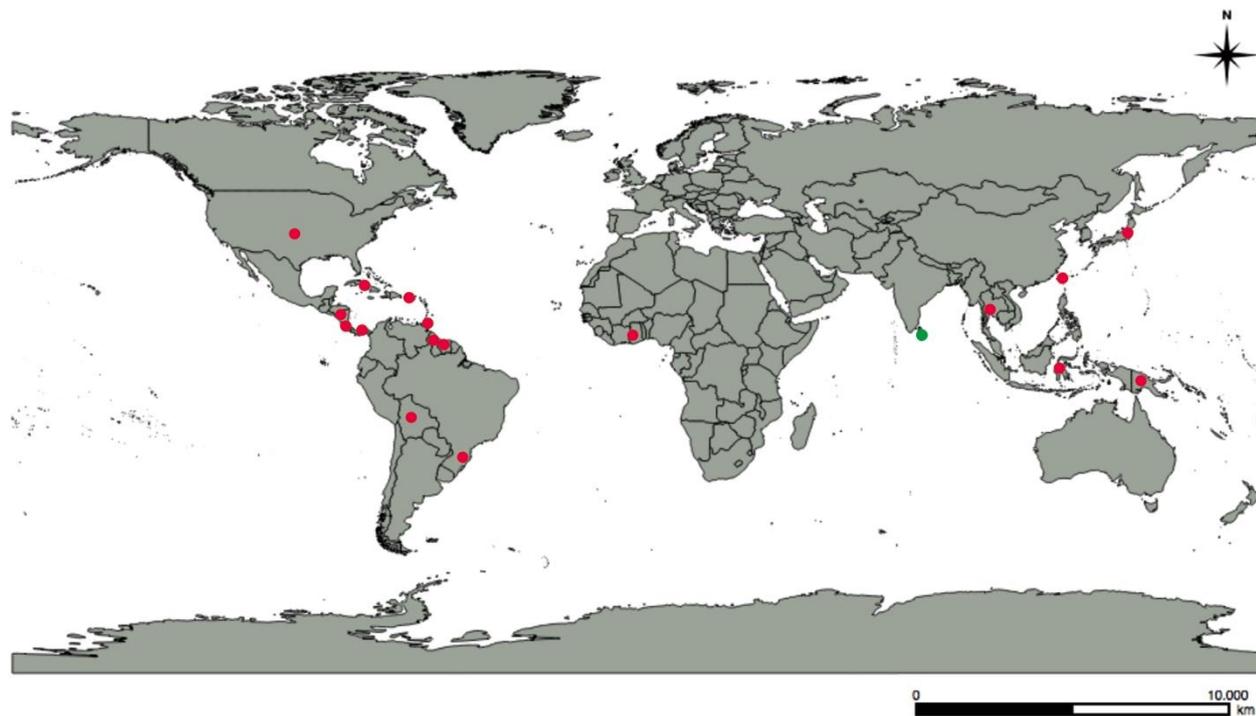


Figura 1. Mapa da distribuição conhecida de *Ophiocordyceps dipterigena*. O quadrado verde indica a localidade onde foi coletado o holótipo.

3. OBJETIVOS

Revisar taxonomicamente *Ophiocordyceps dipterigena* através de estudos morfológicos e moleculares. Ainda, a partir de aspectos ecológicos (hospedeiro, habitat reprodutivo e distribuição geográfica) interpretar as espécies de fungos entomopatógenos que atacam *Diptera*, morfológicamente relacionados ao táxon.

3.1 ESPECIFICAMENTE

- Coletar espécimes parasitas de *Diptera* nos Domínios da Mata Amazônica e Mata Atlântica;
- Revisar macro e micromorfológicamente, incluindo a ultraestrutura de ascósporos e conídios, os espécimes coletados e comparar com materiais de referência;
- Extrair DNA total, amplificar e sequenciar a região ITS de espécimes coletados (Brasil);
- Identificar os hospedeiros até o nível taxonômico possível;
- Interpretar filogeneticamente as espécies deste complexo, a partir de aspectos ecológicos, análises morfológicas (macro, micro e ultraestruturais) e moleculares;
- Apresentar novidades científicas relacionadas aos espécimes estudados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COLETAS, COLEÇÕES EXAMINADAS E PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Espécimes de *Cordyceps* s.l., previamente identificados como *O. dipterigena*, coletados em ecossistemas da Mata Atlântica (SC e PR) e Mata Amazônica (RR e AM), foram utilizados neste estudo (Fig. 2). Também foram analisados materiais de referência depositados nos herbários FH, MICH, NMNS, RB e da coleção particular de Fumio Ihara (Japão).

Os espécimes coletados foram mantidos em câmara úmida por até 26 dias para que obtivessem maturidade sexual e/ou fosse possível a coleta de ascósporos e conídios para estudos em microscopia de luz, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e obtenção de isolados em Agar Batata. Apenas um material (FLOR FMF 345) foi acompanhado semanalmente ainda em campo para que atingisse a maturidade sexual em seu ambiente natural, o que levou quatro semanas a partir da primeira observação. Após sua maturação sexual, este espécime também foi coletado e levado para o laboratório, sendo mantido em câmara úmida para coleta de esporos por mais sete dias.

Os espécimes coletados foram desidratados lentamente em sílica, à temperatura ambiente, a fim de obtê-los com poucas alterações morfológicas bem como preservar o seu DNA. Em alguns casos porções dos materiais foram extraídas e colocadas diretamente em tampão CTAB, também com a finalidade de preservar o DNA. Todos os espécimes estudados estão listados na tabela 1 e todos os espécimes coletados foram depositados no Herbário FLOR. Os acrônimos dos herbários estão de acordo com o *Index Herbariorum* (Thiers, atualizado continuamente).

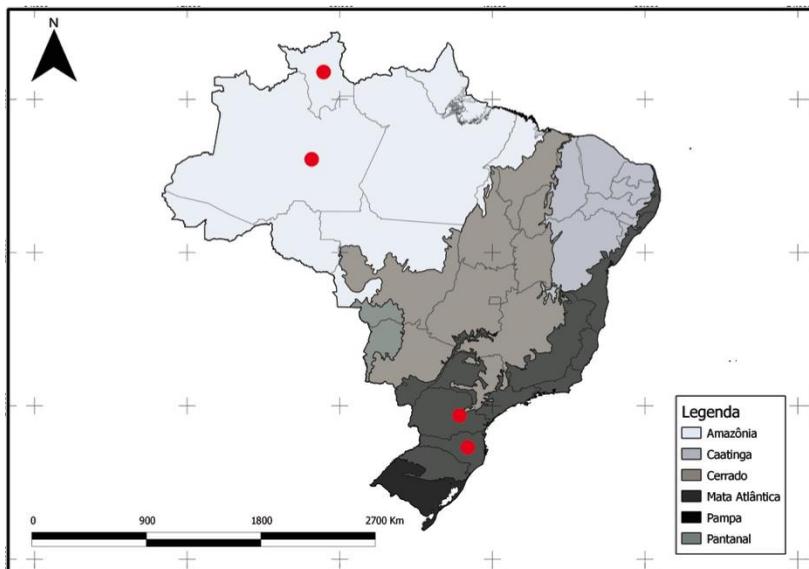


Figura 2. Locais de coleta dos espécimes estudados (pontos vermelhos).

4.2. OBSERVAÇÕES SOBRE O HOSPEDEIRO E ANÁLISES MORFOLÓGICAS

Alguns aspectos foram observados em campo ou no laboratório (a olho nu e em esteromicroscópio) e alguns dados anotados, por exemplo o tipo de substrato (espécie de planta quando possível), o tipo de hospedeiro (identificação das moscas quando possível), a disposição do hospedeiro em relação ao substrato (ramo ou folha; quando em folha, na região adaxial ou abaxial), a presença ou ausência de micélio recobrando o hospedeiro, o estado de preservação aparente do hospedeiro (presença ou ausência de estruturas como asas, pernas e cabeça), o número de estruturas emitidas do hospedeiro (estromas e sinêmios), local de onde eram emitidas estas estruturas, dimensões dos estromas e sinêmios, características da região fértil (forma, presença ou ausência de uma base facilmente distintiva, ostíolos conspícuos a evidentes), disposição dos peritécios (quando em corte longitudinal), cores destas estruturas e variações destes caracteres comparando-os antes e depois da desidratação dos espécimes.

Para observação dos caracteres microscópicos (microscópio de luz) foram realizados cortes longitudinais da região fértil à mão livre para observação da disposição dos peritécios no estroma e descrição do micélio na região medular do estroma, quando presente. Peritécios foram isolados com auxílio de agulhas que eram então colocados em lactofucsina e deixados reidratar por aproximadamente cinco minutos (Evans et al. 2011, com modificações). Com a finalidade de mensurar e descrever corretamente os peritécios, estas observações foram feitas antes de ser colocada a lamínula, preservando a forma e dimensões tridimensionais destas estruturas e facilitando seu entendimento. Com o auxílio de agulhas foram feitas secções próximo à base dos peritécios para que houvesse a liberação dos ascos, sendo esta massa de ascos corada também com lactofucsina e espalhada com auxílio de agulhas. Essa amostra foi então recoberta com lamínula de vidro e aquecida em chama até o surgimento de pequenas bolhas. O comprimento e diâmetro dos ascos e do *cap* foram tomados nessa condição, sendo considerados apenas ascos que apresentassem em seu interior ascósporos maduros, ou seja, com os *part-spores* facilmente visíveis e, de modo geral, devidamente corados com lactofucsina.

Para descrição de ascósporos e *part-spores* foi feita câmara úmida dos materiais coletados, colocando-os com a região fértil voltada para uma lamínula de vidro e deixados para esporular por até 18 dias. Os espécimes deixados para esporular foram acompanhados diariamente,

com a troca de lamínulas a cada 24 horas. Em seguida à coleta de esporos, uma gota de lactofucsina, em uma lâmina de vidro coberta com uma lamínula com ascósporos, evitou o particionamento dos ascósporos em *part-spores*, preservando unidos todos os segmentos em cada ascósporo.

Para descrição de conídios e células conidiogênicas os sinêmios eram suavemente encostados em uma lâmina de vidro, corados com lactofucsina, recobertos por lamínula de vidro e então aquecidos em chama até o surgimento de pequenas bolhas de ar.

As observações e mensurações (n=40, quando possível) das estruturas foram realizadas em microscópio óptico com ocular micrométrica, sendo 5% das medidas de cada extremo são apresentadas entre parênteses.

Para observação da superfície de células conidiogênicas, de conídios e de ascósporos foi realizada a análise ultraestrutural em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JEOL JSM-6390LV do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME). Para observação de conídios ainda aderidos às células conidiogênicas, fragmentos de sinêmio foram desidratados em sílica gel, cortados transversalmente e em seguida colados diretamente sobre um cilindro metálico de alumínio (*stubs*) com o auxílio de fita de carbono dupla face. Para coleta de conídios, sinêmios foram delicadamente esfregados em lamínulas de vidro circulares de 1 cm de diâmetro, sendo estas desidratadas em sílica e coladas nos *stubs*. A coleta de ascósporos seguiu o mesmo protocolo de câmara úmida utilizado para microscopia de luz, todavia estas coletas foram realizadas com o auxílio de lamínulas de vidro circulares de 1 cm de diâmetro, em seguida desidratadas em sílica e coladas nos *stubs*. Após os processos de desidratação, todos os materiais foram recobertos com metalização direta de ouro a 10 nm para então serem observados e fotografados no MEV a 10 Kev.

4.3. ANÁLISES MOLECULARES

Para a realização dos procedimentos moleculares foram selecionados todos os espécimes coletados que apresentavam magnitude suficiente para a extração, visto que diversos materiais (fungo e hospedeiro) pesam menos de 1 mg. Destes foi retirado um pequeno fragmento (1 a 5 mg) do estroma e/ou do micélio somático presente no interior do hospedeiro, o qual foi acondicionado em um tubo *ependorff*

com sílica para que se mantivesse desidratado até os procedimentos moleculares.

Para as análises filogenéticas do complexo taxonômico de *O. dipterigena* foi utilizada a região ITS do DNA nuclear ribossômico, eleito por ser o *Barcoding* de fungos e por apresentar variabilidade genética suficiente para separar espécies, inclusive de linhagens crípticas (Schoch et al. 2012).

A extração do DNA total dos materiais coletados seguiu o protocolo de Romano & Brasileiro (1998), adaptado para fungos (anexo A). Para os espécimes que possuíam menos de 1 mg o processo de extração do DNA foi realizado com o *Kit Magnex* DNA seguindo o protocolo do fabricante adaptado para extração de DNA de fungos (anexo B). Foi utilizado um protocolo alternativo (Kepler et al. 2011) para extrações de materiais frescos (anexo C). Os produtos de extração permaneceram armazenados a -20°C até o seu uso na reação de PCR.

Para a amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) foram utilizados os iniciadores (*primer*) ITS1-F (*forward*) e ITS4-R (*reverse*) (Sasaki et al. 2012). Em cada amostra, foi utilizado 1 µL do DNA total, seguindo as recomendações que acompanham o Master Mix (2x PCR Taq MasterMix ABM®), que consistia em 20 µL do Master Mix, 3 µL de água ultrapura Milli-Q, 0,5 µL de cada iniciador e 1 µL de DNA total ou diluído em água ultrapura Milli-Q numa concentração de 1:10. O programa utilizado no termociclador para as reações de PCR está especificado na tabela 2. A amplificação foi verificada para todos os produtos de PCR em gel de agarose 0,8% através da técnica de eletroforese, utilizando-se 2 µL de tampão *blue juice* 2x, 1 µL de GelRed 500x e 2 µL do produto de PCR. Em seguida, a região do DNA amplificada (produtos da PCR) foi purificada com PEG (polietilenoglicol), para eliminação de dos reagentes remanescentes do processo de amplificação e de possíveis impurezas (anexo D).

Tabela 1. Protocolos dos termociclos utilizados nas reações de PCR

Iniciadores	Ciclos	Temperatura	Tempo
ITS1-F ITS4-R	Desnaturação inicial	94°C	30 s
	25x	94°C	1 min s
		50°C	1 min
		72°C	2 min
	Extensão final	72°C	10 min

O sequenciamento foi realizado no Sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystem) do centro de Pesquisas René Rachou, Fiucruz – Belo Horizonte/MG, no âmbito do Projeto Identificação Molecular de Fungos do Brasil – BrBol Fungi.

As sequências foram editadas manualmente com o software Geneious v6.8 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al. 2012). Foi montada uma matriz (ITS), contendo sequências geradas neste trabalho e sequências disponíveis na base de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Todas as sequências geradas foram depositadas no mesmo banco de dados (Genbank). O alinhamento foi realizado com o software MAFFT v7 (Katoh & Standley 2013) e as sequências inspecionadas manualmente no software MEGA v. 6 (Tamura et al. 2013). O modelo evolutivo utilizado foi selecionado com o parâmetro AIC (Akaike Information Criterion) no *software* jModelTest v2.1.6 encontrado na plataforma CIPRES Science gateway (Darriba et al. 2012; Guindon & Cascuel 2003).

Foram utilizados dois métodos de análises filogenéticas. As análises de Máxima Verossimilhança foram realizadas no programa RAxML v. 8.0 (Stamatakis 2014), disponível na plataforma CIPRES Science Gateway (phylo.org), utilizando o modelo GTRGAMMAI, com todos os parâmetros estimados pelo programa, e os valores de suporte sendo acessados através de 500 pseudoreplicações - *bootstrap* (BS). As análises de Inferência Bayesiana foram realizadas no programa Mr. Bayes v. 3.2.3 da plataforma CIPRES Science gateway, utilizando o modelo de substituição estimado. Cada análise foi feita com cinco milhões de gerações, começando a partir de árvores aleatórias, com duas corridas independentes, cada uma com quatro cadeias correndo paralelamente, amostrando as árvores geradas a cada 500 gerações. O valor da fase inicial de *burn-in* foi 25%, sendo que todas as árvores com o melhor valor de verossimilhança e retidas durante a análise foram usadas para calcular a árvore consenso a partir da regra de maioria de 50%, assim como a probabilidade posterior dos ramos (PP).

Nos cladogramas gerados, um ramo foi considerado bem suportado se o seu valor de BS fosse maior do que 70% e/ou a PP foi maior do que 0,9.

A espécie *Metacordyceps taii* (Z.Q. Liang & A.Y. Liu) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora foi utilizada como grupo externo do filograma gerado a partir do marcador ITS. Segundo estudos filogenéticos moleculares este táxon pertence à *Clavicipitaceae*, família filogeneticamente relacionada a *Ophiocordycipitaceae* (Sung et al. 2007, Kepler et al. 2011).

Todos os procedimentos moleculares citados, exceto o sequenciamento, foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Botânica da UFSC. As amostras resultantes dos procedimentos de extração, amplificação e purificação estão armazenadas em freezer a -20°C no mesmo Laboratório.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para realização deste estudo foram revisados 84 materiais de fungos entomopatógenos parasitas de moscas adultas (Diptera), todos morfológicamente similares a *O. dipterigena*. Dentre os espécimes estudados, 65 foram coletados durante este trabalho, todos no Brasil, sendo cinco na Amazônia e 60 na Mata Atlântica, além de 19 espécimes de herbários e/ou coleções de pesquisadores: três do FH, quatro do MICH, um do NMNS (material de referência de *O. discoideicapitata*) e 11 da coleção pessoal de Fumio Ihara, cinco identificados como *O. discoideicapitata* e seis de *O. dipterigena*. A lista completa dos espécimes estudados é apresentada na tabela 3 do Capítulo I.

Os resultados e a discussão são apresentados de forma separada em capítulos:

Capítulo I – é apresentada uma revisão detalhada dos oito grupos observados no complexo *O. dipterigena*, bem como sobre táxons relacionados. Dos oito grupos observados três são apresentados como espécies novas e os outros, embora apresentem evidências de novidades, não são considerados espécies novas, pois faltam confirmações sobre a identificação do hospedeiro, ou são necessárias mais coletas, ou foi acessada apenas morfologia parcial e/ou não foi possível a obtenção de dados moleculares. Ainda, é apresentada uma filogenia de *Ophiocordyceps* que inclui *O. dipterigena* e táxons relacionados.

Capítulo II – é proposto o resgate de *C. muscicola* da sinonímia de *O. dipterigena* para aqueles espécimes que parasitam moscas *Muscidae*, usualmente aderidas à superfície abaxial de folhas, e que apresentam micélio recobrendo todo hospedeiro. Além da lectotipificação do desenho do protólogo de *C. muscicola* e da epitipificação de um espécime coletado recentemente na localidade do tipo (Floresta Ombrófila Densa em Blumenau), é proposta a combinação da espécie em *Ophiocordyceps*, *O. muscicola* (Möller) Mafalda-Freire & Drechsler-Santos *Ad int.*

CAPÍTULO I - EVIDÊNCIAS MORFOLÓGICAS, ECOLÓGICAS E
MOLECULARES DE ESPÉCIES NOVAS NO COMPLEXO
TAXONÔMICO *OPHIOCORDYCEPS DIPTERIGENA*.

Evidências morfológicas, ecológicas e moleculares de espécies novas no complexo taxonômico em *Ophiocordyceps dipterigena*.

FERNANDO MAFALDA FREIRE^{1*}, ELISANDRO RICARDO DRECHSLER-SANTOS¹

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Campus Universitário, Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

*fmbio@gmail.com**

RESUMO - *Ophiocordyceps dipterigena* é um táxon de fungos entomopatógenos que parasitam moscas (Diptera) e apresenta ampla distribuição geográfica (África, América do Norte, América do Sul, Ásia, Austrália). Durante expedições para coleta de fungos entomopatógenos no Brasil, espécimes morfológicamente similares a *O. dipterigena* foram coletados nos domínios da Mata Atlântica e Mata Amazônica. A ocorrência do táxon na região Neotropical é reavaliada e suas implicações taxonômicas são discutidas. A partir de evidências morfológicas e moleculares são reconhecidas outras espécies no complexo taxonômico. Neste trabalho são apresentadas três novas espécies de *Ophiocordyceps* que parasitam moscas adultas e outras possíveis novidades são comentadas.

Palavras chaves: Taxonomia, *Cordyceps* s.l, fungos entomopatógenos, moscas.

ABSTRACT - *Ophiocordyceps dipterigena* is an entomogenous taxon parasitizing flies (Diptera) with worldwide distribution (Africa, Asia, Australia, North America, South America). During forays to collect entomogenous fungi in Brazil, specimens morphologically similar to *O. dipterigena* were collected from Atlantic Forest and Amazonian Forest domains. The Neotropical occurrence of this taxon is re-evaluated and its taxonomic implications are discussed. Using morphological and molecular evidences *O. dipterigena* is recognized other species in the complex. In this work three new species of *Ophiocordyceps* parasitizing adult flies are presented, and other possible novelties are discussed.

Key words: Taxonomy, *Cordyceps* s.l., entomogenous fungi, flies.

Introdução

Ophiocordyceps Petch (*Ophiocordycipitaceae*, *Hypocreales*, *Ascomycota*) é o mais diverso gênero de fungos entomopatógenos, tanto em número de espécies quanto em morfologia e ecologia, com aproximadamente 150 espécies descritas. O gênero é usualmente caracterizado por possuir estroma cilíndrico, resistente, flexível, de coloração escura, crescendo em larvas ou indivíduos adultos de mais de 12 ordens de insetos. Embora esta seja uma descrição bastante abrangente do táxon, ainda não compreende todas as formas e variações encontradas (Sung et al. 2007).

Ophiocordyceps dipterigena (Berk. & Br.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (≡ *Cordyceps dipterigena* Berk. & Br.) foi originalmente descrita a partir de material coletado no Sri Lanka (Ceilão), sudeste asiático, parasitando indivíduos adultos da ordem *Diptera* (Petch 1932, Sung et al. 2007). A ocorrência do táxon já foi reportada para as Américas (Bolívia, Brasil, Costa Rica, Cuba, Estados Unidos da América, Guiana, Nicarágua, Panamá, Porto Rico, Suriname, Trinidad e Tobago), Ásia (Indonésia, Japão, República da China, Sri Lanka, Tailândia), Austrália (Papua Nova Guiné.) e África (Gana) (Möller 1901, Petch 1932, Mains 1950, Mains 1958, Mains 1959, Kobayasi & Simizu 1978, Evans 1982, Tzean et al. 1997), parasitando várias espécies de moscas adultas, geralmente encontradas aderidas a pequenos ramos ou sob folhas (Petch 1932; Kobayasi & Shimizu 1978). Atualmente, são aceitos cinco sinônimos heterotípicos em *O. dipterigena*: *Cordyceps muscicola* Möller, *C. surinamensis* Henn., *C. ouwensii* Höhn., *C. thwaitesii* Lloyd, *C. opposita* Syd., e uma forma anamórfica, *Hymenostilbe dipterigena* Petch (<http://www.indexfungorum.org/>, acessado em 20 de Julho de 2015). O táxon é reconhecido morfologicamente por apresentar estroma peritecial capitado e amarelo pálido a marrom amarelado, com a região fértil terminal globosa a hemisférica (Mains 1958, Kobayasi & Shimizu 1978).

Até o momento, existem apenas dois trabalhos envolvendo estudos moleculares que utilizam sequências de *O. dipterigena* (Luangsa-ard et al. 2011, Quandt et al. 2014), sendo que poucas sequências do táxon estão disponíveis no GenBank. Apesar de não tratarem especificamente do táxon, é possível observar em ambos os estudos que os exemplares de *O. dipterigena* incluídos nas análises se agruparam com espécimes em um clado mais inclusivo de *Ophiocordyceps*, denominado *O. sphecocephala clade* (Quandt et al. 2014) ou *Hymenostilbe clade* (Luangsa-ard et al. 2011). Este é composto principalmente por espécimes de fungos entomopatógenos que

desenvolvem estruturas reprodutivas em hospedeiros em estágio adulto e que produzem estruturas assexuais do tipo *Hymenostilbe*, caracterizada por apresentar sinêmios recobertos por células conidiogênicas clavadas, dispostas de forma paliçada e recobertas por dentículos oriundos da formação dos conídios (Mains 1950).

Trabalhos recentes (Evans et al. 2011, Araújo & Hughes 2015) com outros grupos de fungos entomopatógenos vêm descrevendo diferentes espécies ao considerar a distribuição mais restrita, hospedeiros específicos e morfologias mais detalhadas. Segundo estes trabalhos a biologia destes fungos está ajustada de forma precisa ao ambiente e ecologia de seus hospedeiros, criando um cenário de especificidade entre ambos.

Associado a esse histórico e caracterização atual de *O. dipterigena*, durante as incursões para coletas de fungos entomopatógenos no Brasil, foram coletados diversos espécimes que apresentaram similaridades morfológicas com o táxon, em diferentes espécies de moscas, principalmente das famílias *Muscidae* e *Micropezidae*, o que levou ao seguinte questionamento: *O. dipterigena* é uma espécie de fungo entomopatógeno generalista e amplamente distribuída ou um complexo taxonômico de espécies similares quanto a morfologia/ecologia?

A ocorrência Neotropical deste táxon é aqui reavaliada e suas implicações taxonômicas são discutidas baseadas em evidências morfológicas, ecológicas e moleculares. Análises moleculares foram realizadas com a finalidade de verificar a monofilia de *O. dipterigena* e o posicionamento filogenético dos espécimes brasileiros no clado “sphecocephala”.

Material e Métodos

Amostragem: Foram realizadas coletas de fungos entomopatógenos nos domínios Mata Atlântica e Mata Amazônica, no período de 2010 a 2015, nos Estados brasileiros do Paraná, Santa Catarina, Amazonas e Roraima, priorizando Unidades de Conservação. Também foram incorporados ao estudo coletas de colaboradores feitas no mesmo período. Os espécimes patógenos de moscas foram transportados ao laboratório e após processamento de rotina tiveram seus hospedeiros identificados com ajuda de especialistas. Os espécimes coletados foram depositados no Herbário FLOR. Também foram revisadas coleções de referência dos herbários FH, MICH, NMNS (Tóquio) e da coleção pessoal de F. Ihara.

Estudos morfológicos: Os espécimes coletados foram mantidos em câmara úmida para observação do desenvolvimento das estruturas reprodutivas e coleta de esporos. Os esporos foram coletados colocando os espécimes posicionados sobre lamínulas de vidro que, após receber a esporada, foram montadas sobre lâmina de vidro contendo uma gota do corante lactofucsina. Após o processamento inicial de descrição macroscópica e de coleta de esporos os materiais foram desidratados em sílica gel. Secções longitudinais da região fértil foram realizadas para observação das características internas do estroma bem como da disposição dos peritécios. Alguns peritécios foram isolados com o auxílio de agulhas, hidratados e corados com lactofucsina e mensurados em sua forma tridimensional. Em seguida, uma pequena incisão foi feita na base dos peritécios para a liberação dos ascos, os quais foram montados entre lâmina e lamínula em lactofucsina. Todas as observações e descrições seguiram Evans et al. (2011), Kobayasi & Shimizu (1978), Mains (1958) e Petch (1932), utilizando microscópio de luz (Olympus CX21).

Análises filogenéticas: A extração de DNA seguiu o protocolo de Romano & Brasileiro (1998) adaptado para fungos. Esta foi realizada a partir de um pequeno fragmento do estroma desidratado, que foi colocado em um tubo *ependorf* de 1,5 mL, congelado com nitrogênio líquido e pulverizado utilizando um pistilo para microtubos. Foi adicionado 750 μ L de tampão CTAB pré-aquecido a 65°C e 4 μ L de β -mercaptoetanol, sendo as amostras incubadas a 60°C por 30 minutos, ressuspendidas a cada 5 minutos. Após o resfriamento das amostras, foi adicionado 750 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1; v/v) a -20°C, homogeneizado por 10 minutos e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo *ependorf* de 1,5 mL, onde foi adicionado 450 μ L de isopropanol a -20°C, e mantido a -20°C por uma hora. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos e tiveram o seu sobrenadante descartado. O *pellet* contendo o DNA foi lavado com 450 μ L de etanol 70% (v/v), secado em banho-maria seco a 35°C e ressuspenso em 50 μ L de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM).

Para a amplificação da região ITS foram utilizados os iniciadores ITS1-F e ITS4-R (Sasaki et al. 2012). Em cada amostra foi utilizado 1 μ L do produto de extração, seguindo as recomendações que acompanham o Master Mix (2x PCR Taq MasterMix ABM®). A reação

de PCR foi realizada utilizando o termociclador TC-3000 (TECHNE, Reino Unido) e os termociclos seguiram o protocolo de Sasaki et al. (2012).

O sequenciamento foi realizado no sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystem) no Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz (Minas Gerais, Brasil).

As sequências foram editadas manualmente no *software* Geneious v6.8 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al. 2012). Foi montada uma matriz (ITS) contendo as sequências geradas neste trabalho e sequências obtidas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). O alinhamento foi realizado com o *software* MAFFT v7 (Katoh & Standley 2013) e inspecionado manualmente no *software* MEGA 6.06 (Tamura et al. 2013). O modelo evolutivo utilizado foi selecionado com o parâmetro BIC (*Bayesian Information Criterion*) no *software* jModelTest v2.1.6 (Darriba et al. 2012; Guindon & Gascuel 2003) encontrado na plataforma CIPRES Science Gateway (phylo.org). As análises de Máxima Verossimilhança foram realizadas no programa RAxML v. 8.0 (Stamatakis 2014) utilizando o modelo GTRGAMMAI com todos os parâmetros estimados pelo programa, e os valores de suporte sendo acessados através de 500 pseudoreplicações – *bootstrap* (BS). As análises de Inferência Bayesiana foram realizadas no programa Mr. Bayes v. 3.2.3 utilizando o modelo de substituição estimado. Cada análise foi realizada com 5 milhões de gerações. Nos cladogramas gerados, um ramo foi considerado bem posicionado se o seu valor de BS foi maior do que 70% e/ou a probabilidade posterior (PP) foi maior do que 0,9.

O número de acesso do GenBank para cada espécime utilizado nas análises encontra-se na tabela 2.

Tabela 2. Espécimes utilizados nos estudos moleculares.

Espécie	Voucher do espécime	Localidade	Número de acesso
<i>Metacordyceps taii</i>	HMIGD 20926	-	EF495101
<i>Ophiocordyceps australis</i>	TSJ 774a	Colômbia	KF937351
<i>O. australis</i>	TSJ 992	Colômbia	KF937349
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FMF 33	Brasil (SC)	-
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FMF 104	Brasil (SC)	-
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FMF 141	Brasil (SC)	-
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FMF 325	Brasil (SC)	-
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FMF 317	Brasil (SC)	-
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FMF 328	Brasil (SC)	-
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 4	FMF 147	Brasil (AM)	-

Tabela 3. Espécimes utilizados nos estudos moleculares (continuação).

Espécie	Voucher do espécime	Localidade	Número de acesso
<i>O. dipterigena</i>	-	Tailândia	GU723771
<i>O. dipterigena</i>	MY 621	Tailândia	GU723764
<i>O. dipterigena</i>	MRCIF 71	Tailândia	EU573346
<i>O. dipterigena</i>	BCC 2506	Tailândia	NBRC101397*
<i>O. formicarum</i>	BCMU CF01	-	AB222678
<i>O. formicarum</i>	BCMU CF02	-	AB222679
<i>O. aff. discoideicapitata</i>	FMF 148	Brasil (AM)	-
<i>O. irangiensis</i>	NBRC 101401	-	JN943336
<i>O. irangiensis</i>	-	-	AY646400
<i>O. irangiensis</i>	NHJ 3	Tailândia	AJ786566
<i>O. irangiensis</i>	NHJ 10945	Tailândia	GU723767
<i>O. irangiensis</i>	NBRC 101400	-	JN943335
<i>O. irangiensis</i>	NHJ 10553	Tailândia	GU723766
<i>O. irangiensis</i>	NBRC 101399	-	JN943334
<i>O. sphecocephala</i>	20877	-	AJ536550
<i>O. sphecocephala</i>	MRCIF 54	-	EU573347
<i>O. sphecocephala</i>	-	-	AY646401
<i>O. sphecocephala</i>	NHJ 7	Tailândia	AJ786591
<i>O. sphecocephala</i>	NBRC 101417	-	JN943349
<i>O. sphecocephala</i>	NBRC 101415	-	JN943347
<i>O. sphecocephala</i>	NBRC 101414	-	JN943443
<i>O. sphecocephala</i>	NHJ 4224	Tailândia	GU723778
<i>O. sphecocephala</i>	-	-	AY646402
<i>O. sphecocephala</i>	NHJ 9	Tailândia	AJ786597
<i>O. sphecocephala</i>	NBRC 101416	-	JN943348
<i>O. sphecocephala</i>	NHJ 4317	Tailândia	GU723779
<i>O. sphecocephala</i>	NBRC 101753	-	JN943350
<i>O. sphecocephala</i>	NBRC 101752	-	JN943351
<i>O. myrmecophila</i>	UoH-24680	Finlândia	AJ786579
<i>O. myrmecophila</i>	UoH-13783	Finlândia	AJ786575
<i>O. myrmecophila</i>	UoH-29280	Finlândia	AJ786582
<i>O. myrmecophila</i>	UoH-27480	Finlândia	AJ786580
<i>O. myrmecophila</i>	UoH-17782	Finlândia	AJ786576
<i>O. myrmecophila</i>	UoH-27582	Finlândia	AJ786581
<i>O. myrmecophila</i>	UoH-22580	Finlândia	AJ786578
<i>O. myrmecophila</i>	UoH-17982	Finlândia	AJ786577
<i>O. myrmecophila</i>	UoC-35517	Dinamarca	AJ786574
<i>O. myrmecophila</i>	MRCIF 58	-	EU573350
<i>O. myrmecophila</i>	MRCIF 57	-	EU573349
<i>O. myrmecophila</i>	MY 163	Tailândia	GU723759
<i>O. myrmecophila</i>	MY 185	Tailândia	GU723760
<i>O. neonutans</i>	F25 (FMF 88)	Brasil	-

Tabela 4. Espécimes utilizados nos estudos moleculares (continuação).

Espécie	Voucher do espécime	Localidade	Número de acesso
<i>O. neonutans</i>	R1 (KEL 113)	Brasil	-
<i>O. neonutans</i>	R2 (KEL 114)	Brasil	-
<i>O. neonutans</i>	R3 (KEL 99)	Brasil	-
<i>O. neonutans</i>	R27 (KEL 138)	Brasil	-
<i>O. neonutans</i>	R37 (KEL 142)	Brasil	-
<i>O. nutans</i>	06Tank19	Japão	AB544483
<i>O. nutans</i>	06Tank20	Japão	AB544484
<i>O. nutans</i>	06Tank1	Japão	AB544473
<i>O. nutans</i>	06Tank11	Japão	AB544478
<i>O. nutans</i>	06Tank22	Japão	AB544486
<i>O. nutans</i>	06Yak2	Japão	AB544489
<i>O. nutans</i>	06Tank21	Japão	AB544485
<i>O. nutans</i>	NBRC 101749	-	AB968408
<i>O. nutans</i>	GDGM 20887	-	JX177484
<i>O. nutans</i>	G 97035	China	AJ309367
<i>O. nutans</i>	XC1A1	-	JX177483
<i>O. nutans</i>	XC1A2	-	JX177486
<i>O. nutans</i>	XC1A3	-	JX177485
<i>O. nutans</i>	20886	China	AJ536558
<i>O. nutans</i>	I	China	AJ536560
<i>O. nutans</i>	UoO-113/78	Tailândia	AJ786583
<i>O. nutans</i>	YC0179MT03	-	JX988780
<i>O. nutans</i>	YC0179MT04	-	KF003111
<i>O. nutans</i>	YC0179MT05	-	JX988781
<i>O. nutans</i>	06Yak3	Japão	AB544490
<i>O. nutans</i>	06Yak1	Japão	AB544488
<i>O. nutans</i>	06Fuka3	Japão	AB544463
<i>O. nutans</i>	YC0179MT01	-	JX988778
<i>O. nutans</i>	YC0179MT02	-	JX988779
<i>O. nutans</i>	T62	Japão	AB366626
<i>O. nutans</i>	03Y3	Japão	AB544452
<i>O. nutans</i>	06Fuka7	Japão	AB544467
<i>O. nutans</i>	06Yaka1	Japão	AB544491
<i>O. nutans</i>	T21	Japão	AB366618
<i>O. nutans</i>	T20	Japão	AB366623
<i>O. nutans</i>	T38	Japão	AB366619
<i>O. nutans</i>	T23	Japão	AB366627
<i>O. nutans</i>	T41	Japão	AB176462
<i>O. tricentri</i>	-	-	AB027376
<i>O. tricentri</i>	NBRC 106968	-	AB968410

Resultados e Discussão

Foram estudados 84 espécimes de fungos entomopatígenos morfologicamente relacionados a *O. dipterigena* em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo 65 coletados no Brasil, 11 da coleção pessoal de F. Ihara e oito de herbários. A maior parte dos espécimes foi coletada em áreas de Mata Atlântica, sendo 59 no território do Estado de Santa Catarina e um do Paraná. Na Mata Amazônica foram coletados cinco espécimes, quatro no Amazonas e um em Roraima. Todos os espécimes foram encontrados em ambientes de elevada umidade. Entre os hospedeiros identificados até família, os mais representativos pertencem a *Asilidae* (7), *Micropezidae* (9) e *Muscidae* (36). Muitos espécimes foram coletados em hospedeiros que não continham os caracteres necessários para uma identificação segura, devido ao avançado estágio de deterioração, causado pelo fungo ou pelo tempo de exposição às intempéries.

A partir dos espécimes estudados foram identificados grupos, que são caracterizados por morfologia particular e por apresentarem aspectos ecológicos que podem ser utilizados como potenciais marcadores para distinção das espécies, inclusive de *O. dipterigena* s.s. Estes grupos estão descritos e discutidos a seguir de acordo com os caracteres mais representativos de cada um, como distribuição, hospedeiro, hábitat reprodutivo e morfologia (macro, micro e ultraestrutural).

Os dados morfológicos considerados mais informativos para os grupos e para as espécies apresentadas estão resumidos na tabela 2. Uma lista completa dos espécimes estudados é apresentada no Apêndice A (tabela 1).

Neste trabalho, *Ophiocordyceps discoideicapitata* e táxons relacionados serão tratados como pertencentes ao complexo *O. dipterigena* devido à sua ecologia e morfologia similares, passíveis de gerarem ambiguidade durante estudos taxonômicos.

Taxonomia

Ophiocordyceps dipterigena s.s. (Fig. 1), Masee (1895) e Lloyd (1921)

Descrição combinada de acordo com Masee (1895) e Lloyd (1921): Ausência de micélio recobrimdo hospedeiro, que encontra-se bastante degradado. *Estroma* capitado; *estipe* simples, 5-10 x 1 mm, cilíndrico, liso e marrom amarelado pálido; *região fértil* globosa, 3 mm diam., lisa, pálida. *Asco* cilíndrico, apresentando cap, 8 esporos. *Ascósporos* arranjados de forma paralela em fascículos dentro do asco, hialinos, filiformes, multiseptados, levemente constrictos nos septos, que se fragmentam em *part-spores*. *Part-spores* fusoides, 10 x 1,5 µm, com ápice truncado e hialinos.

Estado anamórfico não informado.

Hospedeiro, habitat reprodutivo e distribuição: Parasita de moscas adultas, sobre ramos (Fig. 1B), em florestas úmidas no Sri Lanka.

Comentários: Diante do reconhecimento de diferentes grupos foi necessário apresentar uma definição de *O. dipterigena* s.s., que aqui é fundamentada pelo protólogo (Berkeley e Broome 1975) e pelas descrições detalhadas e imagens do holótipo apresentadas por Masee (1895) e Lloyd (1921). O táxon é caracterizado por ser patógeno de moscas adultas encontradas em ramos, não apresentar micélio recobrimdo o hospedeiro e possuir estroma capitado com região fértil globosa. Segundo Petch (1932), os espécimes do Sri Lanka invariavelmente apresentaram uma forma característica com dois estromas e um sinêmio, denominada pelo autor como “Ceylon form”, porém o tipo claramente não possui sinêmio (Fig. 1B).

Segundo Masee (1895) e Lloyd (1921) o holótipo do táxon está depositado no Herbário do Royal Botanic Gardens (KEW), porém não foi possível encontrar o material, que atualmente está perdido. Embora o holótipo não tenha sido revisado neste trabalho, este não foi um fator limitante na delimitação de nenhum dos grupos aqui apresentados.



Figura 1. *Ophiocordyceps dipterigena* s.s. **A-B**: holótipo com dois estromas sobre ramo. Figura e legenda modificadas a partir de imagens de Lloyd (1921), figura 1990 e 1991, prancha 183, página 1060. (Fonte: Google Livros, disponível em <https://books.google.com.br/>).

Cordyceps muscicola Möller (1901)

Esse grupo de espécimes (ACM467, FMF340, 345-346 e FB331-333) apresenta caracteres em comum e ao mesmo tempo particulares da espécie, que a caracterizam como distinta no complexo *O. dipterigena*. Essa espécie é caracterizada por apresentar uma camada de micélio que recobre o hospedeiro, com exceção das pernas e asas, que permanecem bem preservadas. Estroma capitado, raramente bifurcado, região fértil terminal discoide e coloração amarelo vibrante a marrom alaranjado de acordo com estágio ontogenético. Essa espécie parasita especificamente grandes moscas da família *Muscidae*, usualmente encontradas aderidas à região abaxial de folhas, eventualmente em troncos ou ramos perpendiculares ao solo, até agora, da Floresta Ombrófila Densa, nos municípios de Blumenal (localidade do holótipo), Santo Amaro da Imperatriz e São Francisco do Sul..

Sendo assim, foi necessário resgatar o nome *C. muscicola* para essa espécie, que era tratado na literatura com sinônimo heterotípico de *O. dipterigena*. O tratamento nomenclatural e taxonômico, necessário em função do resgate do táxon e distinção da espécie, é apresentado e discutido de forma detalhada no Capítulo 2.

Grupo *Ophiocordyceps dipterigena* sensu Kobayasi & Shimizu (1978). (Fig. 2)

Descrição cedida por F. Ihara (dados não publicados):

Ausência de micélio sobre o hospedeiro, que apresenta todas as estruturas de quitina preservadas. *Estroma* capitado, eventualmente bifurcado, dois a cinco, sempre na região torácica. *Região fértil* terminal, globosa a hemisférica, 1,5-2,8 x 1,3-2,8 mm, coloração amarelo pálido a amarelo alaranjado. *Estipe* cilíndrico, 5-8 x 0,5-0,8 mm. *Peritécios* ovoides. *Ascos* não mensurados; *Cap* do asco 5-6 µm diam. hialino. *Ascósporos* filiformes, 590-700 x 2 µm, hialinos, todos com 64 *part-spores* que se separam com facilidade após sua liberação. *Part-spores* usualmente fusoides, raramente cilíndricos, 4,5-9 x 1,5-2,5 µm.

Estado anamórfico do tipo *Hymenostilbe*. *Sinêmios* cilíndricos, 12-18 x 0,3-0,5 mm, 1-4 sinêmios presentes, simples ou bifurcados, coloração creme, com desenvolvimento simultâneo aos estromas, usualmente na região posterior do hospedeiro. *Células conidiogênicas*, clavoides, verrucosas da porção medial até o ápice (dentículos), hialinas, que formam um pseudoparênquima, recobrem o sinêmio. *Conídios* obovoides alongados, 6-9 x 1,5-2 µm, hialinos.

Hospedeiro, habitat reprodutivo e distribuição: Parasita de moscas da família *Asilidae*, que até o momento não pode ser identificada a nível específico, encontradas sobre ramos finos, proximalmente paralelos ao solo. Os espécimes deste grupo são comumente encontrados em todo o Japão (Kobayasi & Shimizu 1978), desde as regiões de clima temperado como Miyagi e Ibaraki até regiões subtropicais como Myazaki, sempre durante o verão (Junho a Agosto).

Espécimes examinados: JAPÃO, Ibaraki: Gozenyama, 29 de Julho de 2001, *F. Ihara* 01021 (Coleção Pessoal); 26 de Julho 2002, *F. Ihara* 02024 (Coleção Pessoal); *F. Ihara* 02025 (Coleção Pessoal); 7 de Agosto de 2002, *F. Ihara* 04063 (Coleção Pessoal); 23 de Julho de 2007, *F. Ihara* 07044 (Coleção Pessoal); *F. Ihara* 07045 (Coleção Pessoal); Kyushu, Julho de 1950, MICH-F-274571 (MICH).

Comentários: Este é um grupo amplamente estudado e coletado no Japão, sendo facilmente diferenciado de outros táxons através de sua macromorfologia, bem como pelo hospedeiro particular (*Asilidae*, *Laphria* sp.) e habitat reprodutivo (sobre ramos). Embora esta

caracterização seja particular os espécimes dessa espécie são tradicionalmente tratados como *O. dipterigena* (Kobayasi & Shimizu 1978). Segundo esses autores, *O. dipterigena* apresenta distribuição pancontinental, porém, se considerarmos apenas os fungos patógenos da família *Asilidae* com morfologia semelhante à encontrada nas descrições dos autores, a distribuição deve ser mais restrita. A partir de revisões detalhadas de materiais de referência e literatura é possível observar diferenças macromorfológicas evidentes nesse grupo, como o número elevado de estromas (dois a cinco), que segundo Petch (1932), é pouco frequente em *O. dipterigena* s.l. Todavia, Petch (1932) reconhece ter revisado materiais provenientes da Guiana e do Panamá que apresentaram enorme variação nesse caráter (dois a seis estromas) e por isso acabou tratando todos espécimes como *O. dipterigena*.

Apesar dos hospedeiros deste grupo também serem observados aderidos a pequenos ramos como no holótipo de *O. dipterigena* s.s., estes diferem tanto morfológica quanto ecologicamente do espécime tipo. Morfológicamente, os espécimes encontrados no Japão são menores (3 a 6 mm *versus* 5 a 10 mm), apresentam grande número de estromas e de sinêmios, diferente da “*Ceylon form*” descrita em Petch (1932), na qual os hospedeiros frequentemente possuem dois estromas no tórax e um sinêmio no abdômen. Não existem dados precisos a respeito do hospedeiro do holótipo de *O. dipterigena*, porém este certamente não é o mesmo de *O. dipterigena* sensu Kobayasi & Shimizu (1978), que pertence à *Asilidae*, uma família de moscas facilmente distinguível de outras da ordem *Diptera*.

A morfologia da região fértil é um caráter particular do grupo, por ser globosa a hemisférica. Luangsa-ard et al. (2008) apresenta descrição e imagens de espécimes de *O. dipterigena* parasitando moscas da família *Asilidae*, que apresentam dois estromas com região fértil globosa, similar aos espécimes do Japão (Kobayasi & Shimizu 1978). Todavia, é possível observar diferenças nos espécimes da Tailândia. O hospedeiro parece ser de uma espécie diferente, assim como os materiais não apresentam sinêmios, que é um caráter comum nos espécimes do Japão. Ainda, a descrição de *O. dipterigena* sensu Luangsa-ard et al. (2008) abrange espécimes que parasitam diferentes hospedeiros e que possuem morfologias claramente distintas, como por exemplo parasitas de moscas da família *Calliphoridae* encontradas aderidas à região abaxial de folhas e que apresentam região fértil discoide, o que dificulta uma discussão e comparação mais precisa com os materiais do Japão.

O único espécime coletado no Brasil parasitando *Asilidae* (Fig. 11) foi encontrado no Estado do Paraná, em área de Mata Atlântica

(Floresta Ombrófila Densa), em estado imaturo, aderido a um ramo. Não foi possível identificação do hospedeiro no nível específico, mas este provavelmente representa uma espécie distinta das encontradas no Japão e na República da China, locais onde também foram encontrados hospedeiros da família *Asilidae*. O espécime do Brasil é muito menor do que os espécimes do Japão (5 mm *versus* 1,3-1,5 mm). Os espécimes da República da China foram registrados sempre aderidos à região abaxial de folhas, diferente do hábitat reprodutivo dos espécimes registrados para o Brasil.

Apesar de não haver sequências moleculares disponíveis no GenBank referentes a materiais deste grupo, já existem dados ecológicos e morfológicos relevantes que corroboram a hipótese de uma nova espécie. Trabalhos futuros incluindo análises morfológicas detalhadas e dados moleculares poderão corroborar a hipótese de espécie ainda não descrita.

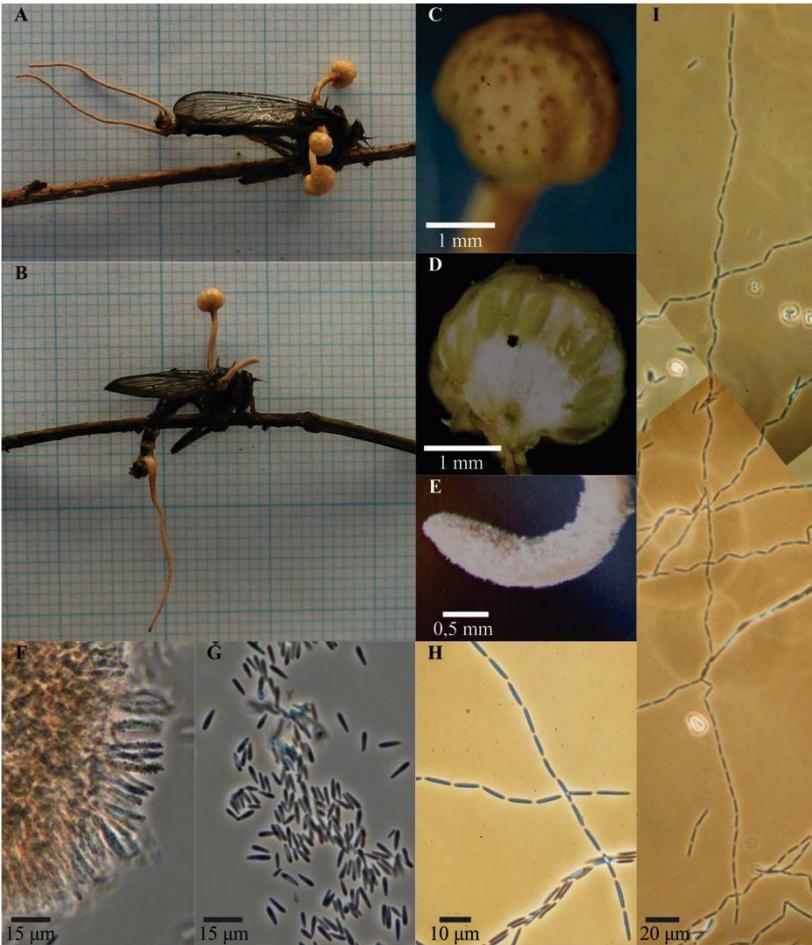


Figura 2. *Ophiocordyceps dipterigena* sensu Kobayasi & Shimizu, em Asilidae (Diptera). **A-B.** Hospedeiro e macromorfologia de estromas e sinêmios; **C.** Detalhe da região fértil evidenciando os ostíolos; **D.** Região fértil em corte longitudinal evidenciando os peritécios; **E.** Detalhe do ápice do sinêmio; **F.** Superfície do sinêmio com células conidiogênicas; **G.** Conídios; **H.** Detalhe dos *part-spores* fusoides; **I.** Ascósporo com 64 *part-spores* (montagem de fotos). (Fotos cedidas e autorizadas para uso por F. Ihara)

Ophiocordyceps sp. 1 (Fig. 3)

Diagnose: Parasita de moscas da família *Muscidae*, encontradas sobre ramos finos, transversais em relação ao solo. Estromas capitados, dois a quatro, raramente bifurcados, resistentes à desidratação e ao intemperismo, região fértil terminal, amarelada, hemisférica, aplanada na base, com ostíolos inconspícuos, estipe cilíndrico e resistente, de coloração mais escura (castanho). Ausência de micélio recobrando o hospedeiro, que frequentemente é encontrado sem asas, pernas e cerdas.

Holótipo: BRASIL, Santa Catarina: Ituporanga, Rio do Norte. Em mosca adulta (Diptera, *Muscidae*), 19 de Outubro de 2014, *Bittencourt* FB 246 (FURB 45181, Isótipos FLOR).

Micélio que recobre o hospedeiro ausente. Micélio basal que adere o hospedeiro ao ramo. *Estroma* capitado, 2-4 no tórax do hospedeiro, raramente ramificado. *Estipe* cilíndrico, 12-20 x 0,8-1 mm, flexível e carnoso quando fresco, rígido e resistente, liso a levemente pruinoso, marrom a marrom acinzentado, região medular creme a branco, composta por hifas paralelas. *Região fértil* terminal, hemisférica, 2-4 x 1-1,2 mm, aplanada na base, recoberta por uma camada de células fortemente aderidas, de consistência rígida, amarelo pálida a amarelo escuro, com ostíolos inconspícuos, marrom amarelados; região medular branca a creme, bem definida abaixo da camada de peritécios, micélio frouxamente entrelaçado. *Peritécios* totalmente imersos, estreitamente ovoides, 780-860 x 220-290 µm, levemente curvados em direção a superfície da região fértil, amarelos em corte transversal, facilmente destacáveis da região fértil. *Asco* filiforme, 500-640 x 5-6 µm, hialinos; *Cap* dos ascos 5-6 µm diam., hialino. *Ascósporos* filiformes, hialinos, não mensurados.

Estado anamórfico do tipo *Hymenostilbe*. *Sinêmio* cilíndrico, 6-12 x 0,5-1 mm, simples ou ramificados, usualmente mais escuros que os estromas, com porções acinzentadas pela concentração de conídios, de duas formas: único sinêmio na região posterior do abdômen em materiais que apresentam dois estromas no tórax do hospedeiro ou três sinêmios (2 no tórax e 1 no abdômen). *Células conidiogênicas* clavóides, verrucosas da porção medial até o ápice (dentículos), hialinas, recobrem o sinêmio formando um pseudoparênquima. *Conídios* estreitamente obovoides, 6,2-8,3 x 2,5-3,5 µm, hialinos, delicadamente verrucosos (observado somente em MEV) com apêndices persistentes (visualizados em MEV, mas difíceis de visualizar em microscopia de

luz). Estromas juvenis apresentam durante o seu desenvolvimento células conidiogênicas e conídios. Não foram observados sinêmios em espécimes com quatro estromas periteciais desenvolvidos.

Hospedeiro, habitat reprodutivo e distribuição: Parasita da mesma espécie (ainda não identificada) de moscas adultas da família *Muscidae* (*Diptera*). Sempre sobre ramos finos (inferiores a 1 cm diam.), transversais em relação ao solo, usualmente encontrado entre 1-1,5 m de altura, nunca em folhas. Os espécimes deste grupo foram encontrados em área de florestas ombrófila densa nos municípios de Águas Mornas, Blumenau, Florianópolis, Ituporanga e Joaçaba.

Espécimes examinados: BRASIL, Santa Catarina: Florianópolis, 2010, *Mafalda-Freire* FMF 33 (FLOR); Joaçaba, Parque Natural Municipal Rio do Peixe, 10 de Março de 2010, *Mafalda-Freire* FMF 104 (FLOR); 24 de Janeiro de 2014, *Mafalda-Freire* FMF 331 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 332 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 333 (FLOR); 27 de Setembro de 2014, *Mafalda-Freire* FMF 295 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 305 (FLOR); 27 de Setembro de 2014, *Mafalda-Freire* FMF 296 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 297 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 298 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 309 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 310 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 311 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 312 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 313 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 314 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 315 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 316 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 317 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 318 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 319 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 320 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 321 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 322 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 323 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 324 (FLOR); Ituporanga, Rio do Norte, 19 de Outubro de 2014, *Bittencourt* FB 246 (FURB 45181); Águas Mornas, Sítio Portal, 26 de Outubro de 2013 *Mafalda-Freire* FMF 141 (FLOR); Blumenau, Parque das Nascentes, 22 de Fevereiro de 2012, *Drechsler-Santos* DS 785 (FLOR).

Comentários: Os espécimes deste grupo são patógenos de moscas grandes, sempre bem degradadas, raramente apresentando pernas ou asas, apesar de não apresentarem nenhum micélio recobrendo o hospedeiro. Essa interação parece ocorrer de forma específica visto que todos os espécimes parasitam a mesma espécie de hospedeiro (moscas adultas da família *Muscidae*), mas que até o momento não pode ser identificada a níveis taxonômicos inferiores. Todos os espécimes foram

encontrados na porção superior de ramos de árvores vivas, fortemente aderidos ao substrato através do micélio que cresce na base da mosca.

Os estromas dessa espécie são os maiores (12-20 mm) e mais robustos entre os grupos do complexo *O. dipterigena* e mesmo depois de desidratados mantém suas características morfológicas e cor. Um caráter exclusivo do táxon é a forma da região fértil hemisférica de base aplanada, com peritécios distribuídos em forma de leque, com contexto algodonoso e de cor branca a creme, bem evidente.

Micromorfológicamente, este táxon é semelhante a *C. muscicola*, com peritécios e ascos ligeiramente menores. Os conídios de ambas as espécies são muito similares, sendo os de *Ophiocordyceps* sp. 1 um pouco menores (6-8,5 x 2,5-3,5 μm versus 7-10 x 2-3 μm). Todavia, os estromas de *C. muscicola* delicados e são menores (9-13 mm versus 12-20 mm), com a região fértil discoide, e o hospedeiro, além de ser uma espécie diferente se mantém preservado, com micélio recobrimo o hospedeiro, que geralmente morre aderido à região abaxial de folhas.

Em uma mesma localidade em Joaçaba/SC foram coletados, no mesmo dia, 19 espécimes. Esses eventos de episotia já foram registrados em outras espécies de fungos entomopatígenos, como *O. communis* e algumas espécies do complexo *O. unilateralis* (Sung et al. 2007, Evans et al. 2011).

Entre os espécimes estudados foi observado duas formas mais comuns, uma com quatro estromas desenvolvendo-se simultaneamente no tórax e outra com dois estromas no tórax e um sinêmio no abdômen. Apesar de autores sugerirem que possa existir uma plasticidade em relação ao número de estromas e sinêmios em *O. dipterigena* (Petch 1932, Mains 1958, Kobayasi & Shimizu 1978, Luangsa-ard et al. 2008), as evidências apresentadas neste trabalho sugerem que este caráter é importante na delimitação dos táxons do complexo e deva ser avaliado com cuidado. Muitos fatores podem estar relacionados ao número de estromas formados, como fatores ambientais (umidade, temperatura, etc) ou quantidade de nutrientes disponível (ex. o tamanho do inseto hospedeiro), todavia não existem trabalhos experimentais que comprovem quais os fatores podem influenciar a variação deste caráter em espécies de *Cordyceps* s.l.

Em três espécimes alguns sinêmios cresceram a partir da região fértil de estromas que tiveram o seu desenvolvimento interrompido. Este foi o único grupo que apresentou sinêmios com este padrão de desenvolvimento, sendo a primeira vez que é relatado na literatura.

Assim como em outros grupos morfológicos, este táxon apresenta conídios se desenvolvendo em células conidiogênicas que recobrem estromas juvenis.



Figura 3. *Ophiocordyceps* sp. 1. **A.** Holótipo em campo (Foto por F. Bittencourt); **B.** Detalhe da região fértil evidenciando os ostíolos; **C.** Região fértil em corte longitudinal evidenciando os peritécios e o interior do estroma; **D.** Peritécios; **E.** Conídios (montagem de fotos); **F.** Asco com *cap* evidente; **G.** Detalhe do *cap*; **H-I.** Ascósporos com *part-spores*.

Ophiocordyceps sp. 2 (Fig. 4)

Diagnose: Parasita de moscas da família *Micropezidae*, encontrados sobre folhas. Apresenta dois estromas, frequentemente ramificados, amarelo pálido a amarelo vibrante, capitados. Região fértil terminal, globosa a subglobosa, em alguns casos cônica. Ausência de micélio recobrimdo hospedeiro.

Holótipo: BRASIL, Santa Catarina: Blumenau, Rio do Norte. Em mosca adulta (Diptera, *Micropezidae*), sobre folha de *Actinostemon concolor*, 28 de Setembro de 2014, F. Mafalda-Freire FMF 327 (Isótipos FLOR).

Ausência de micélio recobrimdo o hospedeiro, mas apresenta micélio emergindo das articulações, segmentos e na base do inseto, o qual é frequentemente encontrado sem asas, preservando, porém, cabeça, pernas, cerdas e antenas. *Micélio* na base do hospedeiro cresce sobre a folha, formando um tapete de micélio de até um mm diam. *Estroma* capitado, dois, 3-7 x 0,3-0,5 mm, frequentemente ramificado (uma a cinco ramificações), de coloração homogênea em toda a estrutura, amarelo pálido quando juvenil tornando-se vibrante quando maduro. *Região fértil* terminal, globosa a subglobosa, por vezes cônica na região superior, 1-1,5 mm diam., com ostíolos marrons bem evidentes, que podem se projetar do estroma. *Estipe* cilíndrico, com a mesma coloração da região fértil. Peritécios piriformes, 760-1050 x 220-310 µm. *Ascospores* filiformes, 480-620 x 5-6 µm, hialinos. *Cap* do asco 4-5 x 4-5 µm, hialino. *Ascospores* filiformes, 600-640 x 2 µm, hialinos, com 64 *part-spores*. *Part-spores* dois primeiros cilíndricos, o primeiro 10-16 x 2 µm e o segundo 8-9 x 2 µm, os outros fusoides, 6-8,5 x 2 µm, sendo maiores em direção às extremidades dos ascóspores e menores em direção ao centro.

Estado anamórfico não observado. Estromas juvenis não apresentam células conidiogênicas nem conídios.

Hospedeiro, habitat reprodutivo e distribuição: Parasita de moscas adultas da família *Micropezidae*, sobre folhas, a aproximadamente 1-1,5 m de altura. Os materiais parasitam duas espécies de mosca da mesma família, que até o momento não puderam ser identificadas. Os espécimes deste grupo foram encontrados em área de Mata Atlântica em florestas ombrófila densa, nos municípios de Ituporanga e Joaçaba. Na região de Joaçaba, todos os exemplares foram

encontrados sobre folhas de *Actinostemon concolor*, em Ituporanga todos os exemplares foram encontrados sobre folhas de *Mollinedia* sp.

Espécimes examinados: BRASIL, Santa Catarina: Joaçaba, Parque Natural Municipal Rio do Peixe, 27 de Setembro de 2014, *Mafalda-Freire* FMF 299 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 300 (FLOR); 28 de Setembro de 2014, *Mafalda-Freire* FMF 325 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 326 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 327 (FLOR); Ituporanga, Rio do Norte, 19 de Outubro de 2014, *Bittencourt* FB 242 (FURB 45177); *Bittencourt* FB 243 (FURB 45178); *Bittencourt* FB 244 (FURB 45179); *Bittencourt* FB 245 (FURB 45180).

Discussão: *Ophiocordyceps* sp. 2 caracteriza-se por apresentar dois estromas frequentemente ramificados, com até seis ramificações, e foi o único grupo que não apresentou sinêmios e nem mesmo conídios em estromas juvenis. Este também é o único grupo do complexo que apresenta hospedeiros que morrem aderidos à região adaxial de folhas. Todos os espécimes foram encontrados sobre folhas lisas e pequenas (7 x 3 cm) de *Actinostemon concolor* ou *Mollinedia* sp.

A morfologia da região fértil varia de globosa com ostíolos inconspícuos, em estágios iniciais de desenvolvimento, a levemente afunilado na parte superior com ostíolos bem evidentes, em estágios mais avançados de desenvolvimento. Esta morfologia globosa se assemelha a do holótipo de *O. dipterigena* (3 mm diam.) e do grupo *O. dipterigena* sensu Kobayasi & Shimizu (1978) (1,2-2 mm diam.). Luangsa-ard et al. (2008) também descreve *O. dipterigena* com a região fértil variando de globosa a discoide (1,5-2,5 mm). Contudo, nenhum dos espécimes destas descrições parasitam moscas de *Asilidae*, bem como nenhum deles apresentam o habitat reprodutivo sobre folhas.

Os ascósporos de *Ophiocordyceps* sp. 2 apresentam os dois primeiros *part-spores* cilíndricos e mais alongados do que o restante, sendo que o seu conteúdo citoplasmático não cora com lactofucsina. Em MEV esses dois segmentos se destacam e aparecem mais escuros do que os demais. O restante dos *part-spores* é fusóide e apresenta um decrescimento no seu comprimento em direção ao centro do ascósporo. Outros grupos também apresentaram *part-spores* terminais mais alongados (*C. muscicola* e *O. cf. discoideicapitata*), porém apenas neste táxon os dois primeiros *part-spores* se distinguem claramente de todos os outros.

Os espécimes foram encontrados na Mata Atlântica, em áreas de floresta ombrófila densa, sempre na primavera nos meses de Setembro e

Outubro. Alguns materiais estavam em estágio juvenil e possivelmente o período de desenvolvimento e reprodução sexual se estenda por mais alguns meses. A maior parte dos registros foi realizada em um raio de 20 metros, o que sugere que estas infecções possam ocorrer de forma epizootica, no qual diversos hospedeiros são afetados em uma mesma área geográfica, semelhante ao observado em *Ophiocordyceps* sp. 1.

Moscas da família *Micropezidae* são caracterizadas pelo tamanho médio a grande de seu corpo (5-17 mm comp.), pernas distintamente longas, veias R4+5 e M1+2 convergentes ao ápice da asa, além de cerdas ocelares e vibrissas ausentes (Marshall 2011). Este é o primeiro registro de fungo entomopatógeno parasitando esta família.



Figura 4. *Ophiocordyceps* sp. 2. **A.** Holótipo em campo evidenciando hospedeiro e macromorfologia do estroma e habitat reprodutivo; **B-C.** Parátipos (Fotos por F. Bittencourt); **D.** Detalhe do estroma e da região fértil com ostíolos evidentes; **E.** Região fértil em corte longitudinal evidenciando os peritécios; **F.** Peritécio; **G.** Asco com *cap* evidente (montagem de fotos); **H.** Ascósporo com 64 *part-spores* em MEV (montagem de fotos); **I-K.** Detalhe da germinação de diferentes *part-spores*; **L.** Detalhe dos dois primeiros *part-spores* de um ascósporo em MEV.

Ophiocordyceps sp. 3 (Fig. 5)

Diagnose: Parasita de moscas pequenas da família *Muscidae*, encontrados sobre ramos. Ausência de micélio recobrando o hospedeiro. Estroma de aprox. 5 mm, amarelo pálido. Região fértil discoide, com ostíolos inconspícuos. Estado anamórfico do tipo *Hymenostilbe*, com conídios amplamente ovoides a globosos.

Holótipo: BRASIL, Santa Catarina: Joaçaba, Parque Natural Municipal Rio do Peixe em Joaçaba. Em mosca adulta (Diptera, *Muscidae*), sobre ramo, 27 de Setembro de 2014, F. Mafalda-Freire FMF 294 (Isótipo FLOR).

Ausência de micélio recobrando o hospedeiro, que se fixa ao habitat reprodutivo através de uma pequena camada de hifas. *Estroma* capitado, único, 5 x 0,4 mm, coloração amarelo pálido. *Região fértil* terminal, discoide, 1 x 2 mm, base aplanada, ostíolos inconspícuos. *Estipe* cilíndrico e delicado. *Peritécios* piriformes, 710-810 x 180-250 µm. *Ascospores* filiformes, 440-460 x 5 µm, hialinos. *Cap* do asco 5 x 5 µm, ligeiramente angulares nas laterais, hialinos. *Ascósporos* não observados. *Part-spores* fusoides, 7-9 (10) x 2 µm.

Estado anamórfico do tipo *Hymenostilbe*. *Sinêmio* cilíndrico, único, 5-10 x 0,4 µm, coloração amarelo pálido, usualmente na região posterior do hospedeiro. *Células conidiogênicas* clavoides, verrucosas da porção medial até o ápice (denticulos), hialinas, formam um pseudoparênquima, recobrem o sinêmio. *Conídios* amplamente ovoides a globosos, 3,5-5 x 4-6 µm, hialinos, delicadamente verrucosos (observado somente em MEV).

Hospedeiro, habitat reprodutivo e distribuição: Parasita de moscas pequenas (menos de 5 mm) da família *Muscidae*, encontrados sobre ramos. Os espécimes deste grupo foram coletados no mês de Setembro, durante a primavera, no Parque Natural Municipal Rio do Peixe em Joaçaba, que é uma zona de ecótono (transição entre Floresta ombrófila mista e Floresta estacional semidecidual, ambas em formações de Mata Atlântica).

Espécimes examinados: BRASIL, Santa Catarina: Joaçaba, Parque Natural Municipal Rio do Peixe, 27 de Setembro de 2014, *Mafalda-Freire* FMF 294 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 296 (FLOR).

Discussão: Este táxon é representado por espécimes, patógenos de moscas pequenas (4 mm de comp.), altamente degradadas, aderidas a região superior de ramos e não recobertas por micélio. Difere-se do holótipo de *O. dipterigena* por apresentar estromas menores (5 mm *versus* 5-10 mm), região fértil discoide e presença de sinêmio no abdômen do hospedeiro. *Ophiocordyceps* sp. 3 difere também dos outros grupos apresentados no trabalho devido ao conjunto de caracteres morfológicos e ecológicos, mas principalmente devido à forma dos conídios (subgloboso, 4-6 x 3,5-5 µm), observada somente neste grupo.

Não há no protólogo de *O. dipterigena* (Berkeley e Broome 1875) menções a respeito de sinêmios nem de conídios no holótipo. Masee (1895) fornece uma descrição mais detalhada do táxon a partir do holótipo (depositado no KEW), mas também não menciona sinêmios nem conídios. Lloyd (1921) apresenta uma foto do tipo que comprova a ausência de sinêmios. Porém, Petch (1932) a partir de revisão de materiais do Sri Lanka descreve que a forma mais comum de *O. dipterigena* para esta localidade apresenta dois estromas periteciais e um sinêmio, denominada *Ceylon form.* Segundo Petch (1932), os conídios dos espécimes do Sri Lanka são obovoides (6-9 x 1,5-2 µm). O mesmo autor revisou espécimes do Panamá e de Trindade e Tobago, que apresentaram conídios com 9-11 x 4-5 µm, e da Guiana, que apresentou conídios com 6-9 x 2,5-3 µm, todos com forma obovoide, diferentes do observado em *Ophiocordyceps* sp. 3.



Figura 5. *Ophiocordyceps* sp. 3. **A.** Holótipo em campo com um estroma e um sinêmio; **B.** Holótipo desidratado sem o sinêmio; **C.** Detalhe do estroma e da região fértil desidratados com ascósporos na superfície; **D.** Vista superior da região fértil evidenciando os ostíolos; **E.** Corte longitudinal da região fértil mostrando a disposição dos peritécios; **F.** Peritécio; **G.** Conídios (união de 6 fotos); **H.** Conídios em MEV (união de 4 fotos); **I.** Asco com *cap* evidente (montagem de fotos).

Ophiocordyceps discoideicapitata (Kobayasi & Shimizu) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (2007). (Descrições por F. Ihara; Fig. 6)

Ausência de micélio sobre o hospedeiro. *Estroma* capitado, dois a cinco, 2,5-3,5 x 0,7-1,2 mm, raramente bifurcado, usualmente no tórax do hospedeiro. *Região fértil* terminal, discoide, lateralmente cônica, com o ápice aplanado, 1,5-2,5 x 1 mm, coloração amarelo pálido, com ostíolos evidentes, marrom alaranjados, que se destacam em relação a superfície da região fértil. *Estipe* cilíndrico, robusto e carmoso, coloração marrom alaranjada. *Peritécios* piriformes, 700-820 x 210-250 µm. *Ascospores* filiformes, 340-450 x 5-6 µm, hialinos. *Cap* dos ascos 5-6 x 4-5 µm, hialino. *Ascósporos* não mensurados. *Part-spores* fusoides, 8-10 x 2 µm.

Estado anamórfico não observado. *Sinêmios* ausentes.

Hospedeiro, habitat reprodutivo e distribuição: Parasitas de moscas adultas (*Diptera*), encontrados aderidos a troncos, porém não existem dados detalhados na literatura a respeito da espécie do hospedeiro. Segundo o livro “Guide to ecology of japanese *Cordyceps*” (Japanese Society of *Cordyceps* Research 2014), este táxon pode ser observado principalmente entre os meses de maio a outubro. Os espécimes crescem presos a galhos próximos ao solo, na face do tronco voltada ao solo, pois desta forma evita a pressão causada pela neve, que cai anualmente. O período de infecção ocorre durante o outono, no qual o estroma imaturo surge. O espécime permanece neste estágio de latência durante o inverno e matura durante o verão seguinte. O holótipo foi descrito para Yamagata (Japão). Segundo o livro “Guide to ecology of japanese *Cordyceps*”, os espécimes deste grupo podem ser encontrados das ilhas de Hokkaido até Honshu, mas principalmente nas regiões frias da parte norte de Honshu no Japão.

Espécime examinado: JAPÃO, Yamagata, 8 de Julho de 1982, TNS-F. 181545 (NMNS).

Comentários: *Ophiocordyceps discoideicapitata* é um fungo entomopatígeno descrito por Kobayasi & Shimizu (1982) para Yamagata, localizada na ilha de Honshu no Japão. O táxon é parasita de moscas que morrem aderidas a troncos, seu habitat reprodutivo. O táxon possui registro somente para o Japão e, em campo, pode ser facilmente confundido com *O. dipterigena* por ser parasita de moscas e pela sua coloração marrom amarelada. No entanto, *O. discoideicapitata*

apresenta estromas menores, com o estipe ligeiramente mais grosso e pruinoso do que os espécimes de *O. dipterigena* descritos para o Japão.

O holótipo não foi localizado e os resultados e discussões se deram a partir de material de referência (TNS-F. 181545), coletado por um dos autores da espécie na localidade do tipo. O voucher analisado continha três espécimes (três moscas parasitadas) previamente identificados como *Cordyceps dipterigena* (atualmente *O. dipterigena*) e foi coletado em Yamagata, ao norte do Japão, na localidade do tipo, em 1982. Kobayasi & Shimizu (1978) apresentam uma descrição detalhada de *O. dipterigena* a partir de espécimes coletados exclusivamente no Japão. Todavia, estes em nada se assemelham aos espécimes aqui examinados, visto que o hospedeiro não é *Asilidae* e se encontra em cascas de troncos ao invés de ramos. Outras diferenças são a ausência de sinêmios, o tamanho dos estromas (3-6 mm em *O. dipterigena* versus 2,5-3,5 mm em TNS-F. 181545) e a forma da região fértil (globosa com base aplanada em *O. dipterigena* s.s. e discoidal em TNS-F. 181545). Apesar de menores, os espécimes analisados apresentam estipes proporcionalmente mais robustos do que *O. dipterigena*, assim como descrito para *O. discoideicapitata* (Kobayasi & Shimizu 1982).

Dentre as características mais relevantes na descrição de *O. discoideicapitata* e na diferenciação entre este e *O. dipterigena*, estão a robustez do estipe, a região fértil lateralmente cônica e os ostíolos bastante evidentes (Kobayasi & Shimizu 1982). Este conjunto de características somadas ao habitat reprodutivo incomum (cascas de troncos), possibilitou a identificação dos espécimes analisados como *O. discoideicapitata*.

O grupo *O. cf. discoideicapitata* (Fig. 7), descrito neste trabalho, também a partir de espécimes coletados no Japão, é morfológicamente similar a *O. discoideicapitata*, apresentando estipes robustos e sendo parasita de moscas em galhos. Contudo, características macroscópicas do estroma diferem, sendo o ápice da região fértil de *O. cf. discoideicapitata* obtuso e os ostíolos inconspícuos.

Foi coletado na Amazônia brasileira um espécime (FMF 148; Fig. 8) com morfologia semelhante a *O. discoideicapitata* parasitando uma mosca aderida a um galho e apresentando estromas robustos e estipes grossos. Porém, esse espécime apresenta estroma de coloração homogênea, com um sulco que divide a região fértil do estipe, bem como ostíolos inconspícuos. Além disso, possui um sinêmio na região posterior do abdômen do hospedeiro, caráter não registrado para *O. discoideicapitata*. Tanto a morfologia quanto a ecologia distintas, bem

como a distribuição disjunta são evidências de que esta seja uma nova espécie e é aqui tratado como *O. aff. discoideicapitata*.

Os hospedeiros estudados não puderam ser identificados em nível específico, pois estavam em estágio de decomposição avançado e não apresentavam caracteres morfológicos necessários para a sua identificação.



Figura 6. *Ophiocordyceps discoideicapitata*. **A.** Desenho do holótipo de *O. discoideicapitata* apresentado em Shimizu (1997); **B-D.** Espécimes de TNS-F. 181545 (NMNS); **E.** Detalhe da região fértil com ostíolos evidentes; **F.** Região fértil em corte longitudinal evidenciando os peritécios; **G.** Peritécio; **H.** Asco com *cap* evidente; **I.** Detalhe do *cap*; **J-K.** Detalhe dos *part-spores* dentro dos ascos.

Grupo *Ophiocordyceps* cf. *discoideicapitata* (Fig. 7)

Descrição cedida por F. Ihara (dados não publicados):

Ausência de micélio recobrimdo o hospedeiro. *Estroma* capitado, dois, 4-7 x 0,7-1,5 mm, simples, no tórax do hospedeiro. *Região fértil* terminal, discoide, lateralmente cônica, com o ápice obtuso, 2-2,3 x 3-4 mm, com ostíolos pouco evidentes e marrom amarelados. *Estipe* cilíndrico, robusto e carnoso, coloração amarela a marrom amarelada, mais escura na base, tornando-se clara em direção ao ápice. *Peritécios* piriformes, 750-820 x 320-340 µm. *Ascospores* filiformes, não mensurados. *Cap* do asco 5-6 x 5-6 µm, hialinos. *Ascóspores* filiformes, 520-570 x 2 µm, hialinos, com 64 *part-spores*. *Part-spores* fusoides, 8-13 x 2,4 µm, porém ambas as extremidades apresentam *part-spores* mais alongados, 12-16,5 µm.

Estado anamórfico não observado.

Hospedeiro, habitat reprodutivo e distribuição: Parasita de moscas adultas (Diptera), encontrado aderido à superfície inferior de troncos de árvores vivas, transversais ou oblíquos ao solo. Os espécimes estudados foram coletados na região de Morioka, prefeitura de Iwate, Japão.

Espécimes examinados: JAPÃO, Iwate: Morioka, 18 de Julho de 2007, *F. Ihara* 07031 (Coleção Pessoal); *F. Ihara* 07032 (Coleção Pessoal); 11 de Agosto de 2007, *F. Ihara* 07116 (Coleção Pessoal); *F. Ihara* 07117 (Coleção Pessoal); *F. Ihara* 07118 (Coleção Pessoal).

Comentários: Este grupo, assim como em *O. discoideicapitata*, parasita moscas que morrem aderidas a troncos, seu habitat reprodutivo, e apresenta estromas robustos com região fértil terminal discoide. Todavia, os estromas do grupo *O.* cf. *discoideicapitata* são consideravelmente maiores que os descritos por Kobayasi & Shimizu (1982) (2,5 a 3,5 mm versus 4 a 7 mm). A região fértil também apresenta diferenças expressivas, sendo que em *O. discoideicapitata* é aplanada na parte superior, apresentando ostíolos bastante evidentes, enquanto que em *O.* cf. *discoideicapitata* esta região é obtusa com ostíolos inconspícuos. Micromorfologicamente, este grupo apresenta peritécios expressivamente maiores do que *O. discoideicapitata* (890 x 360 µm contra 620-700 x 200-250 µm). Os *part-spores* de *O. discoideicapitata* são cilíndricos com tamanho de 6-9 x 1 µm, muito

diferentes do observado em *O. cf. discoideicapitata*, os quais são fusoides e com tamanho de 8-16,5 x 2,4 μm .

Observando ascósporos inteiros, obtidos a partir de esporadas, é possível distinguir que os *part-spores* das extremidades são proporcionalmente maiores (11,5-16,5 μm) do que os intermediários (8-13 μm). Esta variação do comprimento especificamente nos segmentos das extremidades dos ascósporos também foi observada em *C. muscicola* e em *Ophiocordyceps* sp. 2, apesar destes apresentarem outros caracteres morfológicos e ecológicos que os distinguem facilmente de *O. cf. discoideicapitata*.

Segundo as descrições de F. Ihara (dados não publicados), os espécimes deste grupo foram coletados entre os meses de julho e agosto e, o táxon pode ser encontrado imaturo no inverno. Da primavera ao início do verão a região fértil passa a se desenvolver, atingindo o seu desenvolvimento completo do verão ao outono.

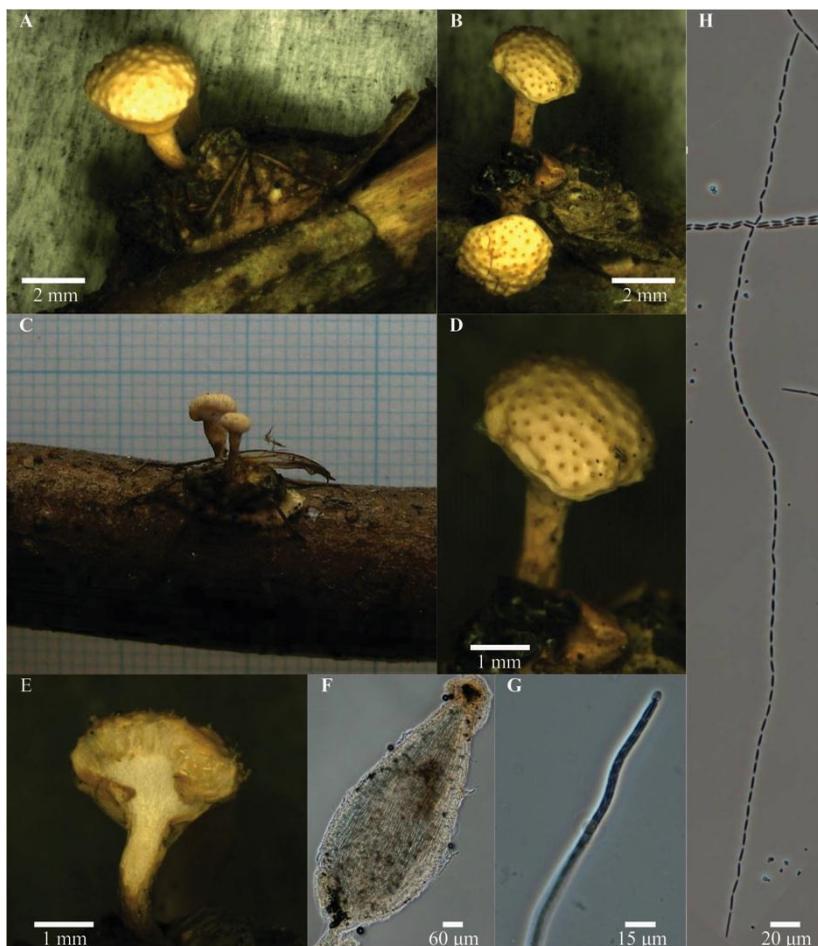


Figura 7. Grupo *Ophiocordyceps* cf. *discoideicapitata*. **A-C**. Hospedeiro sobre o seu habitat reprodutivo e macromorfologia dos estromas; **D**. Detalhe da região fértil evidenciando os ostíolos; **E**. Região fértil em corte longitudinal evidenciando os peritécios; **F**. Peritécio; **G**. Asco com *cap* evidente; **H**. Ascósporo com 64 *part-spores*, evidenciando os segmentos terminais mais alongados (montagem de fotos). (Fotos cedidas e autorizadas para uso por F. Ihara)

Ophiocordyceps aff. *discoideicapitata* (Fig. 8)

Ausência de micélio sobre o hospedeiro. *Estroma* capitado, dois, 4-5 x 1 mm, simples, coloração homogênea marrom alaranjada em toda a estrutura, no tórax do hospedeiro. *Região fértil* terminal, discoide, com o ápice levemente obtuso, 1,2 x 1,8-2,2 mm, ostíolos inconspícuos e marrom alaranjados de tonalidade levemente mais escura. *Estipe* cilíndrico, robusto e carnoso. *Peritécios* piriformes, 650-700 x 200-250 µm. *Ascós* filiformes, 350-450 x 5 µm, hialinos. *Cap* dos ascós 3-4 x 5-6 µm, hialino. *Ascósporos* não mensurados. *Part-spores* fusoides, 8-14 x 2 µm.

Estado anamórfico do tipo *Hymenostilbe*. *Sinêmio* cilíndrico, 3 x 0,3 mm, simples, coloração marrom alaranjada, levemente pruinoso, encontra-se na região posterior do hospedeiro. *Células conidiogênicas* clavoides, verrucosas da porção medial até o ápice (dentículos), hialinas, formam um pseudoparênquima, recobrem o sinêmio. *Conídios* globosos, 3-5 x 4-5 µm. Células conidiogênicas e conídios podem ser encontrados na base na região fértil.

Hospedeiro, habitat reprodutivo e distribuição: Parasita de mosca adulta, possivelmente *Muscidae*, aderida a ramo. O único espécime foi coletado na Reserva Biológica Adolfo Ducke, em Manaus, região de Floresta Amazônica.

Espécime examinado: BRASIL, Amazonas: Manaus, Reserva Florestal Adolfo Ducke, 2012, *J. Araújo* (FMF 148).

Comentários: Este grupo é composto por apenas um exemplar que, apesar de apresentar todos os caracteres necessários para a distinção como um novo táxon, é tratado neste trabalho como *affinis* devido à baixa amostragem. No entanto, o espécime se assemelha morfológicamente a *O. discoideicapitata*, por apresentar o estipe robusto, a região fértil discoide e peritécios com tamanho e forma muito semelhantes. Porém, apresenta a região fértil com ostíolos inconspícuos, semelhante ao observado em *O. cf. discoideicapitata*. O estroma do espécime apresenta uma tonalidade mais escura que em ambos *O. discoideicapitata* e *O. cf. discoideicapitata*. O táxon apresenta peritécios ligeiramente menores que em *O. discoideicapitata* (TNS-F. 181545, 700-820 x 270-280 µm), mas semelhante ao descrito por Kobayasi & Shimizu (1982) para o mesmo táxon (620-700 x 250-300 µm). Também

apresentou sinêmios, caráter não observado em *O. discoideicapitata*, sendo os conídios globosos (3-5 x 4-5 μm).

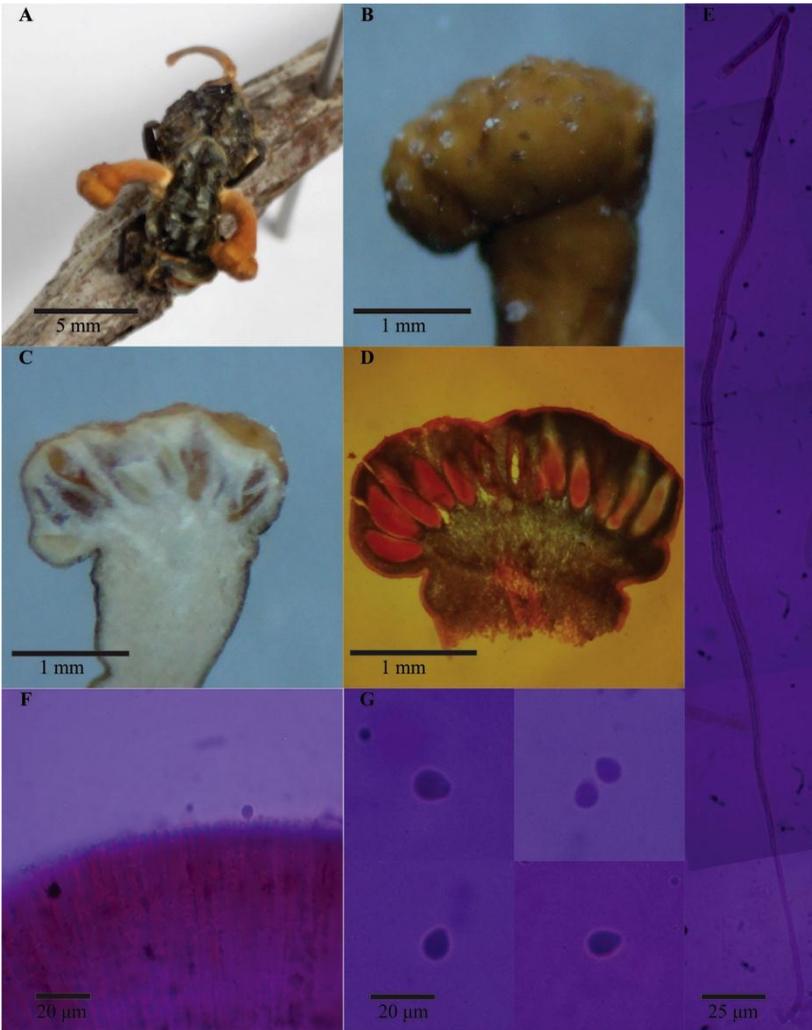


Figura 8. *Ophiocordyceps* aff. *discoideicapitata*. **A.** Hospedeiro sobre o seu habitat reprodutivo e macromorfologia dos estromas e sinêmio; **B.** Detalhe da região fértil evidenciando os ostíolos; **C.** Região fértil em corte longitudinal evidenciando os peritécios; **D.** Corte da região fértil; **E.** Asco com *cap* evidente (montagem de fotos); **F.** Superfície do sinêmio com células conidiogênicas e um conídio; **G.** Conídios (união de 4 fotos).

Tabela 5. Comparação entre os grupos observados no complexo *Ophiocordyceps dipterigena* e táxons morfológica e ecologicamente relacionados.

Espécies e grupos	Hospedeiro	Habitat reprodutivo	Estroma	Região fértil	Peritécios	Ascospores	Ascósporos	Part-spores	Sinênio	Conídios
<i>O. dipterigena</i> s.s.	Diptera	sobre ramos	dois; 5-10 x 1 mm	globosa, 3 mm diam.	-	-	-	truncados, 10 x 1,5 µm	-	-
<i>Cordyceps muscicola sensu</i> Möller (1901)	Diptera, Muscidae	sob folhas	dois a seis, 9-13 x 0,5-1mm, raramente ramificados	discoide, 2-4 x 1-1,2 mm	piriformes, 850-920 x 230-300 µm	filiformes, 550-700 x 5 µm	650-700 x 2 µm, 64 <i>part-spores</i>	terminais cilíndricos 11-14 x 2 µm; intermediários fusoides, 8-10 x 2 µm	filiforme, 10-13 x 0,5 mm	7-10 (13) x 2-3 µm
Grupo <i>O. dipterigena sensu</i> Kobayasi e Shimizu (1978)	Diptera, Asilidae*	sobre ramos	dois a cinco, 3-6 x 0,3-0,5 mm	globosa, base aplanada, 1,2-2 mm diam.	750-800 x 270-280 µm	filiforme	590-700 x 2 µm, 64 <i>part-spores</i>	fusoides, 4,5-9 x 1,5-2,5 µm*	filiforme, 6-15 x 0,4-0,6 mm	obovoide alongados, 6-10 x 1,5-2 µm, lisos
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	Diptera, Muscidae	sobre ramos	dois a quatro, 12-20 x 0,8-1 mm, raramente, ramificados	hemisférica, base aplanada, ostíolos inconspícuos, 1,5-2,5 x 2-4 mm	piriformes, 780-860 x 220-290 µm	filiformes, 500-640 x 5-6 µm	-	-	6-12 x 0,5-1 mm, simples ou ramificado	6,2-8,3 x 2,5-3,5 µm; presentes em estromas juvenis
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 2	Diptera, Micropezidae	sobre folhas de <i>Actinostema concolor</i> ou <i>Mollinedia</i> sp.	dois, frequentemente ramificados, 3-7 x 0,3-0,5 mm	globosa, 1-1,5 mm diam	piriformes, 760-1050 x 220-310 µm	filiformes, 480- 620 x 5-6 µm	600-640 x 2 µm, 64 <i>part-spores</i>	dois primeiros cilíndricos, 10-16 x 2 µm e 8,2-9 x 2 µm; os seguintes fusoides, 6-8,5 x 2 µm	-	-
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 3	Diptera Muscidae	sobre ramos	um, 5 x 0,4 mm	discoide, 1 x 2 mm, com ostíolos inconspícuos	estritamente ovoides, 710-810 x 180-250 µm	filiformes, 400-460 x 5 µm	-	fusoides, 7-9(10) x 2 µm	filiforme, 5-10 x 0,4 mm	subglobosos a globosos, 4-6 x 3,5-5 (6) µm,
<i>O. discoideicapitata sensu</i> Kobayasi e Shimizu (1982)	Diptera	aderido a troncos	dois, 2,5-3,5 x 0,7-1,2 mm	discoide, 3-4 mm, lateralmente cônica, ostíolos evidentes	piriformes, 620-700 x 200-250 µm	filiformes, 5-6 µm diam.	-	cilíndricos, 6-9 x 1 µm, truncados	-	-
<i>O. cf. discoideicapitata</i> (F. Ihara)	Diptera	aderido a região inferior de troncos	dois, 4-7 x 0,7-1,5 mm	2-2,3 x 3-4 mm, lateralmente cônica, ostíolos pouco evidentes	piriformes, 890 x 360 µm	-	520-570 x 2 µm, 64 <i>part-spores</i>	fusoides, 8-13 x 2,4 µm; maiores nas extremidades, 11,5-16,5 x 2,4 µm.	-	-
<i>O. aff. discoideicapitata</i>	Diptera	ramo	dois, 4-5 x 1 µm	discoide, 1,2 x 1,8-2,2 mm	piriformes, 650-700 x 200-250 µm	filiformes, 350-450 x 5 µm	-	fusoides, 8-14 x 2 µm	filiforme, 3 x 0,3 mm	globosos, 4-5 x 3-5 µm, presentes em estromas juvenis

*dados obtidos posterior a publicação

Filogenia molecular

O alinhamento final da matriz de ITS resultou em 749 pares de base. O melhor modelo de substituição estimado, assim como a frequência de bases e parâmetros foi TVM+I+G, com frequência de A=0,29, C=0,2, G=0,21 e T=0,3, com proporção de invariáveis de 0,15 e proporção de variação gamma estimada em 1.

O conjunto de dados de ITS inclui sequências de 84 espécimes (10 táxons) do GenBank somado a oito sequências geradas neste trabalho, a partir de exemplares morfológicamente relacionados a *O. dipterigena*, de coletas do Brasil (tabela 2). Não há dados moleculares do holótipo de *O. dipterigena* e, como dados de referência, foram utilizados sequências obtidas a partir de espécimes de *O. dipterigena* da Tailândia, disponíveis no Genbank. Como *outgroup* foi utilizado *Metacordyceps taii* (Z.Q. Liang & A.Y. Liu) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, por ser a espécie tipo do gênero e um táxon filogeneticamente relacionado a *Ophiocordyceps*. Neste trabalho são analisados e discutidos filogeneticamente somente os clados relacionados a *O. dipterigena* e o espécime de *O. aff. discoideicapitata*.

O filograma gerado a partir de Máxima Verossimilhança apresentou topologia similar ao gerado a partir de Análise Bayesiana, sendo o segundo escolhido para ser apresentado neste trabalho (Fig. 10), devido ao melhor suporte estatístico na maioria dos clados. São apresentados os valores de suporte dos ramos de ambas as análises.

O filograma gerado (Fig. 10) apresentou dois clados mais inclusivos (100 BS e 1 PP), *O. dipterigena* clade e *O. sphecocephala* clade. O primeiro é composto por 11 espécimes, previamente determinados como *O. dipterigena* s.l., sendo quatro sequências de *O. dipterigena sensu* Luangsa-ard et al. (2008) (Tailândia), seis de *Ophiocordyceps* sp. 1 e uma de *Ophiocordyceps* sp. 4. Este clado inclusivo é tratado aqui como “clado *O. dipterigena* s.l.” (90 BS e 1 PP). O segundo, denominado “clado *O. sphecocephala*” (- BS e 0,70 PP) é composto pelo restante dos espécimes incluídos na filogenia juntamente com a sequência de um espécime de *Ophiocordyceps* aff. *discoideicapitata*, obtida neste trabalho. Este espécime é o único do complexo que não se agrupou no clado *O. dipterigena*.

O clado *O. dipterigena* s.l. apresentou três linhagens distintas bem suportadas sendo a primeira composta por espécimes de *Ophiocordyceps* sp. 1 (100 BS e 1 PP), a segunda por quatro espécimes de *Ophiocordyceps dipterigena* do Genbank, provenientes de materiais da Tailândia (100 BS e 1 PP) e a terceira por um espécime de

Ophiocordyceps sp. 4. O clado formado por *Ophiocordyceps* sp. 1 formou um grupo irmão do clado formado por *O. dipterigena* (89 BS e 0,97 PP). Em um ramo separado ficou posicionado o único exemplar de *Ophiocordyceps* sp. 4 obtido. Outros grupos estudados e apresentados nessa dissertação não foram testados nessa análise filogenética por não ter sido possível a obtenção de sequências ITS dos espécimes representantes. O clado *O. sphecocephala* apresentou a formação de diversos clados inclusivos com alto valor de suporte nos ramos terminais, mas com baixo valor nos ramos mais internos. *Ophiocordyceps* aff. *discoideicapitata* formou um ramo relacionado com *O. australis* (73 BS e 0,99 PP).

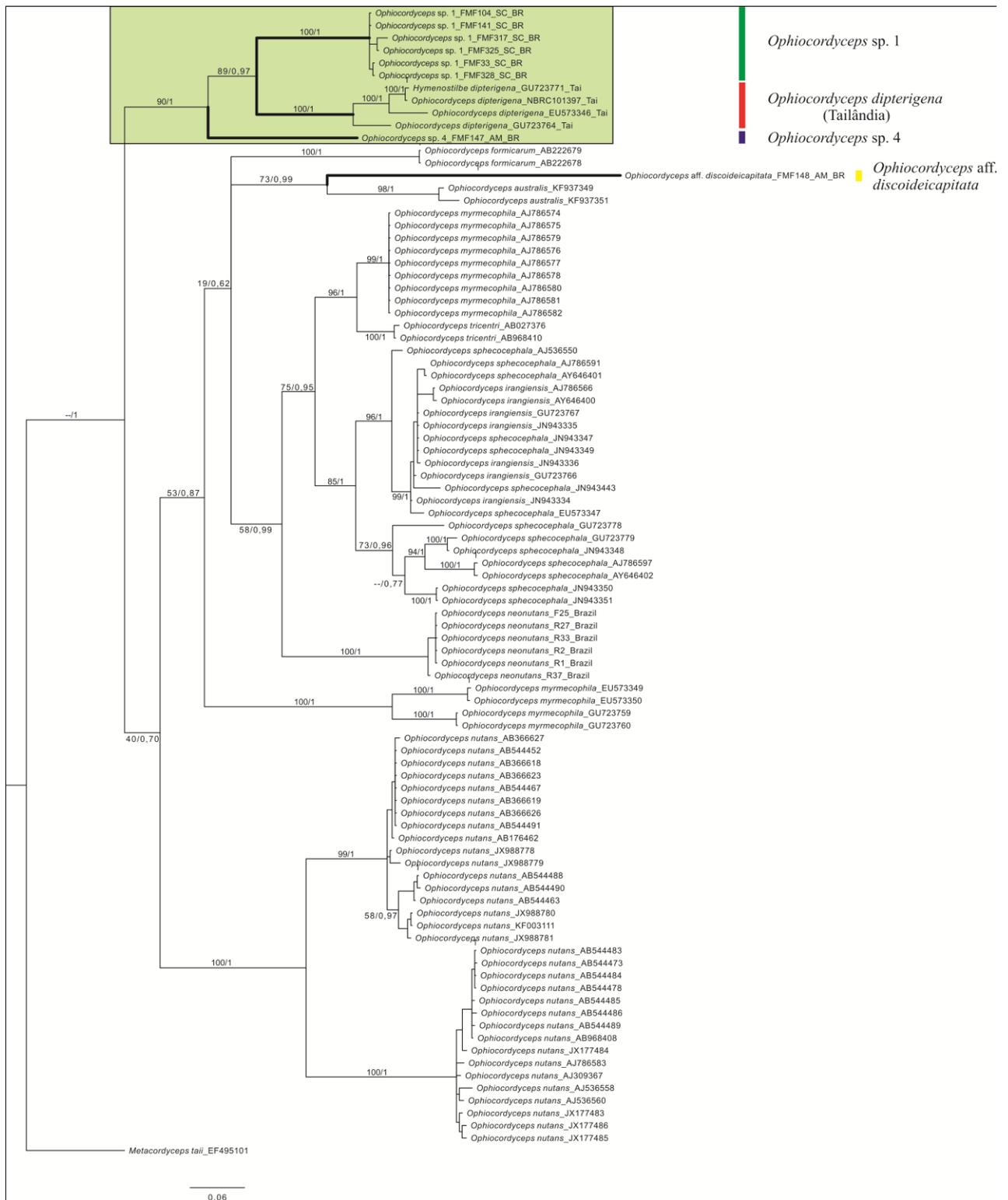


Figura 9. Árvore filogenética gerada a partir do marcador ITS, com topologia baseada na análise de Inferência Bayesiana. Os números nos ramos representam os valores de BS / PP. Os ramos destacados em negrito indicam a posição dos espécimes de fungos entomopatígenos parasitas de moscas e morfologicamente relacionados a *O. dipterigena* (clado *O. dipterigena*; destacado em verde). O outro clado é composto por representantes do clado “*O. sphecocephala*” sensu Quandt et al. (2014), bem como um espécime de *O. aff. discoideicapitata*, ambos em destaque.

Discussão geral

Os espécimes de *O. dipterigena* da Tailândia se agruparam em um clado, como já era esperado, devido à proximidade geográfica. Contudo, estes apresentaram uma variação molecular significativa, formando três linhagens distintas no filograma. Os espécimes deste clado (Tailândia) não puderam ser analisados morfológicamente e não existem dados morfológicos a respeito dos mesmos. Assim sendo, apesar das evidências filogenéticas apresentadas nestas análises, os espécimes deste clado foram considerados, *a priori*, a mesma espécie, porém o clado *Ophiocordyceps dipterigena* da Tailândia não pode ser considerada como de referência de *O. dipterigena* s.s. Luangsa-ard et al. (2008) apresentam uma descrição de *O. dipterigena* a partir de espécimes exclusivamente da Tailândia, que parasitam diferentes hospedeiros (moscas das famílias *Asilidae* e *Calliphoridae*) e com ampla variação morfológica da região fértil (globosa a discoide) contudo, apesar de não haver uma ligação direta entre os espécimes utilizados em nossas análises moleculares e os espécimes utilizados nas descrições de Luangsa-ard et al. (2008), apresentam evidências de que os espécimes da Tailândia identificados como *O. dipterigena* correspondam a mais de um táxon.

Ophiocordyceps sp. 1 é proposta aqui como uma espécie nova, similar a *O. dipterigena*, porém distinta por apresentar estromas robustos e região fértil hemisférica, parasitando moscas grandes da família *Muscidae*, presas a ramos, com distribuição até o momento conhecida somente para a Mata Atlântica do Sul do Brasil, restrito a área de Floresta Ombrófila Densa. Em ambas as análises o clado de *Ophiocordyceps* sp. 1 está relacionado aos espécimes provenientes da Tailândia. Como mencionado anteriormente, não há dados morfológicos associados às sequências dos espécimes de *O. dipterigena* da Tailândia, mas, de acordo com as descrições de Luangsa-ard et al. (2008), os espécimes desta localidade parasitam moscas de *Asilidae* ou *Calliphoridae*, usualmente encontradas aderidas à região abaxial de folhas.

Ophiocordyceps sp. 4 aparece como um grupo irmão dos demais espécimes de *O. dipterigena* clade. Este espécime apresenta um hospedeiro distinto (mosca da família *Syrphidae*), coletado na Floresta Amazônica. Apesar dos dados moleculares, sobre hospedeiro e de distribuição serem evidências para uma possível nova espécie, apenas um material foi coletado e este apresenta os dois estromas e o sinêmio bastante degradados, o que inviabilizou a obtenção de dados

morfológicos. Consequentemente, é inviável propor uma delimitação precisa desta espécie bem como tratá-la neste trabalho como grupo, sendo novas coletas imprescindíveis para propormos essa hipótese de espécie.

Ophiocordyceps aff. *discoideicapitata* é representada por um único espécime, coletado em região de Floresta Amazônica, associado a uma mosca da família *Muscidae*, encontrada aderida a um ramo. O material apresenta estromas curtos com estipes robustos e conídios globosos. O conjunto destes caracteres distingue este espécime de todos os grupos do complexo *O. dipterigena* apresentados neste trabalho, inclusive de *O. discoideicapitata* s.s. No filograma, o espécime aparece associado a *O. australis*, relacionado ao clado *O. sphecocephala*, porém este táxon em nada se assemelha a *O. aff. discoideicapitata*, tanto em relação a sua ecologia, patógeno de formigas (*Hymenoptera*), quanto morfologicamente (estipe filiforme negro, com região fértil fusiforme e vermelho alaranjado. Contudo, este espécime apresentou um ramo longo o que evidencia a distância filogenética entre eles. Não há sequências de espécimes de referência de *O. discoideicapitata* s.s. disponíveis no GenBank, nem foi possível obter dados moleculares a partir das coleções de herbário revisadas.

Considerações e Conclusões

Sob o nome *Ophiocordyceps dipterigena* foram apresentadas diferentes espécies, sendo possível que, com o estudo continuado deste complexo taxonômico, sejam confirmadas mais novidades científicas. O uso de ferramentas moleculares aliado à descrição morfológica detalhada e a identificação do hospedeiro fornecem dados suficientes para discriminar as espécies do complexo. Contudo, é imprescindível que dados a respeito do habitat reprodutivo não sejam ignorados, bem como seja dada atenção necessária às descrições microscópicas, em especial à mensuração padronizada de peritécios, à coleta de ascósporos através da esporada e à descrição detalhada de seus *part-spores* e conídios.

Alguns autores vêm afirmando que as relações de especificidade entre parasita e hospedeiro, sendo esta construída através da história evolutiva de ambos, são mais importantes para o reconhecimento das espécies do que se esperava tradicionalmente (Sung et al 2007, Evans et al. 2011). Nos grupos do complexo *O. dipterigena* que apresentaram maior amostragem (*C. muscicola*, *Ophiocordyceps* sp. 1 e

Ophiocordyceps sp. 2) é possível observar que os espécimes de fungo foram encontrados sempre na mesma morfoespécie de hospedeiro, mesmo não sendo possíveis identificar algumas delas até espécie. Como consequência, a determinação dos hospedeiros deve contribuir na identificação do fungo, bem como ajudar no melhor entendimento das relações ecológicas existentes entre eles.

Petch (1932) descreveu o conjunto de caracteres macroscópicos mais frequentes nos espécimes registrados no Sri Lanka como “*Ceylon form*” (dois estromas no tórax e um sinêmio na região posterior do abdômen do hospedeiro). Apesar desta ser aparentemente a forma mais representativa em espécimes de *O. dipterigena* s.l. de diferentes localidades do mundo (Petch 1932, Tzean 1997, Luangsa-ard et al. 2008) e também ter sido observada em alguns exemplares coletados na região Neotropical (Petch 1932), esta não foi a forma mais frequente nos materiais coletados no presente trabalho.

A forma e o tamanho dos conídios foram determinantes na delimitação de algumas espécies, como *O. aff. discoideicapitata* e *Ophiocordyceps* sp. 3. Petch (1932) observou que espécimes de *O. dipterigena* de diferentes localidades apresentavam padrões de conídios diferentes. Com base no observado, no presente trabalho, fica evidente a necessidade de revisar as coleções estudadas por Petch, visto que é possível que estas representem táxons diferentes dentro do complexo *O. dipterigena*.

A forma da região fértil se mostrou também um caráter importante na delimitação das espécies, entretanto alguns grupos, como *Ophiocordyceps* sp. 2, apresentaram uma variação morfológica relativamente grande para este caráter ao longo do seu desenvolvimento. Isso reforça a necessidade da descrição da estrutura de acordo com a ontogenia destes organismos, bem como uma amostragem maior de espécimes deste táxon.

A forma discoide da região fértil foi descrita para *O. dipterigena* em diversas ocasiões, como em *C. ouwensii* (sinônimo de *O. dipterigena*) (Höhnelt 1909) e em espécimes de *O. dipterigena* da Tailândia (Luangsa-ard et al. 2008). Este estado do caráter também foi observado no grupo *C. muscicola* (Sul do Brasil) e nos espécimes dos EUA (FH 5077 e FH 5068). Apesar dessa morfologia ter sido observada em vários dos grupos apresentados aqui, outras características não foram compartilhadas entre os grupos, mostrando que talvez essa característica isoladamente não serve para a discriminação das espécies do complexo. Este, dentre outros estados de caráter, deve ser utilizado com cuidado,

levando em consideração o estágio de desenvolvimento, em conjunto com outros dados taxonômicos.

No Brasil, espécimes foram coletados do início da primavera até final do verão, entre o final de Setembro até meados de Março. Muitos dos materiais encontrados em Setembro estavam em estágio juvenil, apresentando apenas estruturas assexuais bem desenvolvidas. Este parece ser um período importante para estudo de algumas espécies do complexo, visto que outros grupos apresentaram padrões de ocorrência similares, como o grupo *O. dipterigena sensu* Kubayasi & Shimizu (1978), que ocorre no verão, ou ainda *O. discoideicapitata*, que, apesar de poder ser observado ao longo de todo ano, só atinge a maturidade sexual no verão.

Tanto espécimes do Brasil quanto do Japão, similares a *O. discoideicapitata*, necessitam ser reavaliados quanto aos *status affinis* e *conferatus*, respectivamente. Novas coletas de exemplares provenientes do Brasil possibilitarão a obtenção de mais dados morfológicos, como a esporada, e de dados moleculares, o que contribuirá para a delimitação das espécies.

Este trabalho reúne informações sobre espécimes morfológica e filogeneticamente relacionados a *O. dipterigena*, bem como inclui novos dados sobre distribuição deste complexo; e apresenta novidades científicas, como o primeiro registro de moscas das famílias Micropezidae sendo parasitadas por fungos entomopatógenos.

Até o momento, não é possível afirmar que o *O. dipterigena* s.s. de fato ocorra no Brasil, ou mesmo nas Américas. De acordo com os espécimes revisados ainda é necessário revisão de material de referência, seja de material tipo ou de espécimes coletados na localidade do tipo. Ainda, é necessário que estes materiais sejam coletados em estágio de desenvolvimento adequado para obtenção de esporos, visto que as características micromorfológicas desta estrutura são de extrema importância nas descrições e circunscrição das espécies do complexo. Ainda com os esporos, seria possível a obtenção de culturas, que além de fornecerem novos caracteres morfológicos aos táxons, possibilitam a obtenção de material genético mais facilmente para as análises moleculares, bem como possibilitam a preservação de culturas dos *vouchers*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Ms. J. Araújo pelos espécimes fornecidos e pelas contribuições ao longo do trabalho. Ao Dr. L.C. Pinho (UFSC) e Dr. C.J.C. Pinto (UFSC) pelas identificações dos hospedeiros até nível de família. Aos técnicos do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC pelas imagens de MEV. Ao Dr. Mateus Arduvino Reck pelas contribuições durante as análises moleculares. Aos integrantes do Micolab pelas contribuições em discussões e trabalhos de campo. F. Ihara e curadores dos herbários solicitados pelos empréstimos das exsiccatas, descrições e fotos. Aos gestores de unidades de conservação pela concessão de autorizações de visita e coletas. CAPES e ao CNPq pelas bolsas de estudos concedidas (PPGFAP/UFSC).

Referências

- ARIYAWANSA, H.A.; HAWKSWORTH, D.L.; HYDE, K.D.; JONES, E.B.G.; MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; MANAMGODA, D.S.; THAMBUGALA, K.M.; UDAYANGA, D.; CAMPORESI, E.; DARANAGAMA, A.; JAYAWARDENA, R.; LIU, J-K.; MCKENZIE, E.H.C.; PHOOKAMSAK, R.; SENANAYAKE, I.C.; SHIVAS, R.G.; TIAN, Q.; XU, J.-C. 2014. Epitypification and neotypification: guidelines with appropriate and inappropriate examples. *Fungal Diversity*, 69(1): 57-91.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.
- EVANS, H.C. 1982. Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems: an appraisal. *Ecological Entomology*, 7: 47-60.
- EVANS, H.C.; ELLIOT, S.L.; HUGHES, D.P. 2011. Hidden Diversity Behind the Zombie-ant Fungus *Ophiocordyceps unilateralis*: Four New Species Described from Carpenter Ants in Minas Gerais, Brazil. *PLoS one*, 6(3): 1-9.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.
- HÖHNEL, F.X.R. von. 1909. Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe. *Fragmente zur Mykologie*, 118: 275-452.
- JAPANESE SOCIETY OF CORDYCEPS RESEARCH. 2014. Guide to ecology of Japanese *Cordyceps*. 303pp.
- JOHNSON, D.; SUNG, G.-H.; HYWEL-JONES, N. L.; LUANGSARD, J.J.; BISCHOFF, J.F.; KEPLER, R.M.; SPATAFORA, J.W. 2009. Systematics and evolution of the genus *Torrubiella* (Hypocreales, Ascomycota). *Mycological Research*, 113(3): 279-289.

- KATOH, K.; STANDLEY, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772-780.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJIES, P.; DRUMMOND, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647-1649.
- KOBAYASI, Y.; SHIMIZU, D. 1978. *Cordyceps* species from Japan. *Bulletin of the National Museum*, 4: 43-63.
- LLOYD, C.G. 1916. Mycological notes No. 43. *Mycological Writings*, 5: 589-604.
- LUANGSA-ARD, J.J.; TASANATHAI, K.; MONGKOLSAMRIT, S.; HYWEL-JONES, N. 2008. Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand. Volume 2. 75 pp.
- LUANGSA-ARD, J.J.; RIDKAEW, R.; TASANATHAI, K.; THANAKITPIPATTANA, D.; HYWEL-JONES, N. 2011. *Ophiocordyceps halabalaensis*: a new species of *Ophiocordyceps* pathogenic to *Camponotus gigas* in Hala Bala Wildlife Sanctuary, Southern Thailand. *Fungal biology*, 115: 608-614.
- MAINS, E.B. 1950. Entomogenous Species of Acanthomyces, *Hymenostilbe* and *Insecticola* in North America. *Mycological Society of America*, 42(4): 566-589.
- MAINS, E.B. 1958. North American Entomogenous Species of *Cordyceps*. *Mycological Society of America*, 50(2): 169-222.
- MAINS, E.B. 1959. *Cordyceps* species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 86(1): 46-58.
- MARSHALL, S.A. 2011. A review of the genus *Hoplocheiloma* Cresson (Diptera: Micropezidae). *Zootaxa*, 2806: 1-23.

MÖLLER, A. 1901. Phycomyceten und Ascomyceten. Untersuchungen aus Brasilien. *Botanische Mittheilungen aus den Tropen*, 9: 1-319.

PETCH, T. 1932. Notes on entomogenous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 16(4): 209-245.

QUANDT, C.A.; KEPLER, R.M.; GAMS, W.; ARAÚJO, J.P.M.; BAN, S.; EVANS, H.C.; HUGHES, D.P.; HUMBER, R.; HYWEL-JONES, N.; LI, Z.; LUANGSA-ARD, J.J.; REHNER, S.A.; SANJUAN, T.; SATO, H.; SHRESTHA, B.; SUNG, G.-H.; YAO, Y.-J.; ZARE, R.; SPATAFORA, J.W. 2014. Phylogenetic-based nomenclatural proposals for *Ophiocordycipitaceae* (*Hypocreales*) with new combinations in *Tolypocladium*. *IMA Fungus*, 5(1): 121-134.

SANJUAN, T.; TABIMA, J.; RESTREPO, S.; LÆSSØE, T.; SPATAFORA, J.W.; FRANCO-MOLANO, A.N. 2014. Entomopathogens of Amazonian stick insects and locusts are members of the *Beauveria* species complex (*Cordyceps sensu stricto*). *Mycologia*, 106(2): 260-275.

SHIMIZU, D. 1997. Illustrated Vegetable Wasps and Plant Worms in Colour. *Tokyo: Ie-No-Hikari Association*, 446 pp.

STAMATAKIS, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*.

SUNG, G.; HYWEL-JONES, N.L.; SUNG, J.-M.; LUANGSA-ARD, J.J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J.W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, 57: 5-59.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.

THIERS, B. (atualizado continuamente). Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. *New York Botanical Garden's Virtual Herbarium*. Disponível em: <<http://sweetgum.nybg.org/ih/>>

TULASNE, L.R.; TULASNE, C. 1865. *Selecta Functorum Carpologia*. V. 3. Nectriei. Phacidiei. Pezizei. *Parisiis, Imperatoris Jussu, In Imperiali Typographeo Excudebatur*. 260 pp.

TZEAN, S.S., HSIEH, L.S.; WU, W.J. 1997. *Atlas of Entomopathogenic Fungi from Taiwan*. *Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan, Republic of China*, 215 pp. ISBN 957-97217-6-9.

CAPÍTULO II - ESTUDO TAXONÔMICO E NOMENCLATORIAL
DE *CORDYCEPS MUSCICOLA* MÖLLER

Estudo taxonômico e nomenclatural de *Cordyceps muscicola* Möller

FERNANDO MAFALDA FREIRE^{1*}, ELISANDRO RICARDO DRECHSLER-SANTOS¹

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Campus Universitário, Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

*fmfbio@gmail.com**

RESUMO – *Ophiocordyceps dipterigena* é um fungo entomopatígeno, parasita de diferentes espécies de moscas adultas. Facilmente reconhecido em campo e com distribuição pantropical. Atualmente, este táxon possui cinco sinônimos heterotípicos, entre eles *Cordyceps muscicola*. No presente trabalho, que teve por objetivo revisar *C. muscicola*, discorda-se da sinonímia de *O. dipterigena*, a partir de caracteres morfológicos e aspectos ecológicos. O holótipo deste táxon foi destruído durante a Segunda Guerra Mundial, sendo aqui proposta a lectotipificação do desenho do protólogo de *C. muscicola* e a epitipificação de um espécime coletado recentemente na localidade do tipo (Mata Atlântica de Blumenau, Brasil). Também é proposta a combinação da espécie em *Ophiocordyceps*.

Palavras chaves: epitipificação, *Hypocreales*, lectotipificação, *Ophiocordyceps*, *Ophiocordycipitaceae*, taxonomia

ABSTRACT - According to the literature, *Ophiocordyceps dipterigena* is an entomopathogenic fungus that parasitizes different species of adult flies, easily recognized in the field and with pantropical distribution. Currently, this taxon has five synonyms, including *Cordyceps muscicola*. This work aimed to study *C. muscicola* removing the species from the synonym of *O. dipterigena*, mainly using morphological and ecological characters. The holotype of this taxon was destroyed during the Second World War, being proposed here to lectotipificação the protologue drawing *C. muscicola* and epitipificação of a newly collected specimen in the type locality (Atlantic Rain Forest of Blumenau, Brazil). It is also proposed the combination of the species in *Ophiocordyceps*.

Key words: Epitypification, lectotypification, taxonomy, *Hypocreales*, *Ophiocordyceps*, *Ophiocordycipitaceae*

Introdução

Ophiocordyceps dipterigena (Berk. & Br.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora é um táxon de fungos patógenos de moscas, que possui ampla distribuição e plasticidade morfológica e ecológica (Petch 1932, Mains 1958, Kobayasi & Shimizu 1978, Luangsa-ard et al. 2008). Atualmente possui sete sinônimos propostos (<http://indexfungorum.org>), *Cordyceps dipterigena* Berk. & Br., *Cordyceps muscicola* Möller, *Cordyceps opposita* P. Syd., *Cordyceps ouwensii* Höhn., *Cordyceps surinamensis* Henn., *Cordyceps thwaitesii* Lloyd, *Hymenostilbe dipterigena* Petch, sendo que seis destes são sinônimos heterotípicos.

Cordyceps muscicola foi descrito pelo pesquisador alemão Alfred Möller (Möller 1901) a partir de materiais coletados em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. Petch (1932), ao revisar a descrição da espécie proposta por Möller, sugere a sinonimização deste táxon em *Cordyceps dipterigena* Berk. & Br. (\equiv *Ophiocordyceps dipterigena*). Entretanto, o autor salienta que ficou em dúvida se aceitaria ou não esta sinonimização, pois os espécimes descritos por Möller (1901) apresentavam hospedeiros diferentes e seis estromas crescendo do hospedeiro, ao invés de dois estromas e uma forma conidial (sinêmio), que é a forma mais comum encontrada nos materiais do Sri Lanka, localidade do holótipo de *O. dipterigena*. Contudo, Petch (1932) observou que materiais previamente determinados como *C. dipterigena* de coleções da Guiana e do Panamá também apresentavam grandes variações no número de estromas (de dois a nove), o que indicaria plasticidade do caráter.

A sinonimização proposta por Petch (1932) foi amplamente aceita por diversos autores (Mains 1950, Mains 1958, Mains 1959, Kobayasi & Shimizu 1978, Sung et al. 2007), todavia nenhuma revisão dos materiais analisados por Möller (1901) foi realizada.

No protólogo de *C. muscicola*, Möller (1901) não designou um holótipo e não há indicação de coleção onde os materiais utilizados para descrever a espécie foram depositados. Os principais herbários da Alemanha (Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem, Freie Universität Berlin; Herbarium Haussknecht, Friedrich Schiller University Jena), entre outros Europeus onde, teoricamente, o holótipo poderia estar não apresentam material de referência de *C. muscicola*. De acordo com Friederichsen (1977) as coleções de A. Möller realizadas no Brasil, possivelmente daquelas amostras de *C. muscicola*, foram depositadas no Herbário Haussknecht (Alemanha).

Friederichsen (1977) apresenta uma lista dos materiais estudados Möller que ainda existes na coleção do Haussknecht, confirmando a perda dos vouchers de *C. muscicola* entre outros espécimes. Uma suposta explicação para a perda destes espécimes seria que estes já haviam sido incorporados pelo Herbário na Alemanha antes de 1943 e que foram destruídos durante a Segunda Guerra Mundial, assim como aconteceu com diversas coleções de herbários daquele país (Poppendieck 2001).

A falta de espécimes tipo impede a revisão taxonômica deste sinônimo de *O. dipterigena*, embora exista um desenho do hospedeiro e estromas do fungo no protólogo de *C. muscicola*. Este desenho se mostra limitado quanto à identificação do hospedeiro e caracterização morfológica das estruturas reprodutivas do fungo, o que impede também a confirmação da sinonímia em *O. dipterigena* ou do resgate de *C. muscicola* como espécie distinta. Ainda, desde a descrição de Möller não há registros de novas coletas de fungos entomopatígenos de moscas na localidade do tipo, Blumenau. Sendo assim, com o objetivo de revisar taxonômicamente *C. muscicola* foram realizadas expedições de campo em áreas de Unidades de Conservação da Mata Atlântica em Blumenau para coletar espécimes de fungos parasitas de moscas adultas, morfológicamente semelhantes à *O. dipterigena* s.l. Neste trabalho, além da lectotipificação do desenho do protólogo e epitificação de um espécime recentemente coletado na localidade do tipo, é considerado *C. muscicola* como uma espécie distinta de *O. dipterigena*, bem como é proposta a nova combinação do táxon em *Ophiocordyceps*, *O. muscicola*, com base na morfologia e aspectos ecológicos (hospedeiro, habitat reprodutivo e distribuição).

Material e Métodos

Foram realizadas expedições de coletas entre outubro de 2012 a fevereiro de 2015, em áreas de Mata Atlântica do Sul do Brasil, priorizando Unidades de Conservação na localidade do tipo de *Cordyceps muscicola*. O Parque Nacional da Serra do Itajaí (PARNA SI) e o Parque Municipal São Francisco de Assis, localizados no município de Blumenau, foram as áreas de coleta prioritárias. Também foi sedido um espécime proveniente de São Francisco do Sul, coletado a partir de uma expedição independente.

O processo para amostragem consistiu na inspeção cuidadosa de ramos e folhas de plantas ao longo das áreas de coleta, em busca de moscas parasitadas por fungos entomopatígenos similares a *C.*

musvicola. Os espécimes encontrados foram fotografados em campo, coletados e mantidos úmidos. Em Laboratório, os espécimes foram acondicionados em câmara úmida. Esta consistiu em um microambiente com condições de umidade e sombreamento similares do ambiente natural do organismo. Lamínulas de vidro foram posicionadas abaixo da região fértil dos estromas para obtenção da esporada, utilizada para análise dos ascósporos e *part-spores* em microscopia de luz.

Um dos espécimes estudados (FMF 345) foi mantido em campo, pois estava em estágio imaturo, para observação do seu desenvolvimento em ambiente natural durante quatro semanas, até atingir a maturidade sexual e iniciar a esporulação.

A descrição morfológica dos espécimes seguiu o procedimento mais abrangente e detalhado possível, com base nos trabalhos de Petch (1932), Kobayasi & Shimizu (1978), Mains (1958) e Evans et al. (2011). Para a descrição macromorfológica foram mensurados e descritos os estromas, o estipe, a região fértil e os sinêmios. Das estruturas microscópicas, foram analisados peritécios, ascos, ascósporos, *part-spores*, células conidiogênicas e conídios. Estas foram coradas com lactofucsina e observadas entre lâmina e lamínula utilizando o microscópio de luz Olympus CX21.

Após as descrições e a coleta de esporos, os materiais foram desidratados com o auxílio de sílica e armazenados em recipientes hermeticamente fechados. Os espécimes coletados neste trabalho foram depositados no Herbário FLOR. Além dos espécimes coletados, foram revisadas coleções do herbário FH.

Resultados

Foram coletados 62 espécimes parasitando moscas, morfológicamente similares a *O. dipterigena*. Destes, sete apresentam morfologia e aspectos ecológicos similares aos apresentados no protólogo de *C. musvicola*. Estes espécimes foram encontrados parasitando sempre a mesma espécie de mosca da família *Muscidae*, que não foi possível determinar níveis taxonômicos inferiores à família. As moscas parasitadas foram encontradas geralmente aderidas à região abaxial de folhas e eventualmente a troncos ou ramos perpendiculares ao solo. Estas informações e a caracterização morfológica particular permitiu a distinção de *C. musvicola* de *O. dipterigena*, assim como da nova combinação em *Ophicordcypes*, como apresentado a seguir no item Taxonomia.

Taxonomia

Ophiocordyceps muscicola (Möller) Mafalda-Freire & Drechsler-Santos comb. nov. Ad int. (Fig. 1)

Lectótipo (*designatus hic*): figura 88, p. 221 de Möller, (1901).

Epítipo (*designatus hic*): BRASIL, Santa Catarina: Blumenau, PARNA Serra do Itajaí, em mosca adulta (*Diptera; Muscidae*) sob folha, 17 de março de 2015, F. Mafalda-Freire FMF 345 (FLOR).

Micélio marrom acinzentado recobrimdo o hospedeiro, com exceção de pernas e asas, que permanecem usualmente bem preservadas. *Estromas* capitados, dois a seis, emergindo do tórax do hospedeiro, raramente ramificados. *Estipe* cilíndrico, 9-13 x 0,5-1 mm, flexível e carnoso quando fresco (quebradiço quando desidratado), liso, amarelo claro no ápice se tornando mais escuro em direção à base. Maturação dos estromas acontece em diferentes momentos. *Região fértil* terminal, discoide, 2-4 x 1-1,2 mm, de coloração amarelo vibrante, passando a amarelo castanho e então a marrom alaranjado ao longo do seu desenvolvimento; *ostíolos* evidentes, levemente proeminentes, marrom claros. *Peritécios* totalmente imersos, piriformes, 850-920 x 230-360 µm, levemente curvados em direção à superfície da região fértil, facilmente destacáveis do estroma. *Ascospores* filiformes, 550-700 x 5 µm, hialinos. *Cap do asco* hemisférico, 5-6 µm diam., hialino. Esporulação ocorre à noite (observação em laboratório). *Ascóspores* filiformes, 650-700 x 2 µm, hialinos, com 64 *part-spores* que se separam facilmente após sua liberação. *Part-spores* terminais do ascósporo (o primeiro e o último) cilíndricos e mais alongados do que os outros segmentos, (11) 12-13 (14) x 2 µm; *part-spores* intermediários fusoides, raramente cilíndricos, 8-10 x 2 µm.

Estado anamórfico do tipo *Hymenostilbe*. *Sinêmios* cilíndricos, 10 x 0,5 mm, marrom acinzentados, solitários, desenvolvem-se no abdômen do hospedeiro; superfície formada por uma camada de células conidiogênicas, clavoides, verrucosas, hialinas, pseudoparenquimáticas. *Conídios* estreitamente obovoides, 7-10 (13) x 2-3 µm, hialinos, delicadamente verrucosos (observado somente em MEV). Ausência de células conidiogênicas e conídios em estromas juvenis.

Hospedeiro, habitat reprodutivo e distribuição: Parasita de moscas adultas da família *Muscidae* (Diptera), usualmente encontrados

aderidos à região abaxial de folhas de diversas espécies, eventualmente a troncos ou ramos perpendiculares ao solo. Até o momento a espécie apresenta registros de ocorrência somente na Mata Atlântica do estado de Santa Catarina, em regiões de floresta ombrófila densa, todos de períodos do final de primavera até meados de verão. A maior parte dos espécimes foi coletada no PARNA da Serra do Itajaí, contudo um material foi coletado em Santo Amaro da Imperatriz (ACM 467) e outro na região urbana de São Francisco do Sul (FMF 340).

Espécimes examinados: BRASIL, Santa Catarina: Santo Amaro da Imperatriz, Hotel Caldas da Imperatriz, Trilha das Cachoeiras, 30 Outubro 2012, *Magnago* ACM 467 (FLOR); Ibidem, São Francisco do Sul, centro urbano, 15 Dezembro de 2014, *Mafalda-Freire* FMF 340 (FLOR); Ibidem, Blumenau, PARNA Serra do Itajaí, 17 Janeiro 2015, *Bittencourt* FB 331 (FLOR); Ibidem, 17 Janeiro 2015, *Bittencourt* FB 332 (FLOR); Ibidem, 17 Janeiro 2015, *Bittencourt* FB 333 (FLOR); ibidem, 17 Fevereiro 2015, *Mafalda-Freire* FMF 345 (FLOR); Ibidem, 17 Fevereiro 2015, *Mafalda-Freire* FMF 346 (FLOR).

Espécimes adicionalmente examinados: BOLÍVIA: La Paz, San Jeronimo, 7 Fevereiro 1956, *R. Singer* 979 (MICH 274612); BRASIL: Paraná, Morro do Canal, 4 Setembro 2013, *Linhares* FTF 78 (FLOR); Santa Catarina, Águas Mornas, Sítio Portal, 26 Dezembro 2013, *Mafalda-Freire* FMF 141 (FLOR); Blumenau, Parque das Nascentes, 22 Fevereiro 2012, *Drechsler-Santos* DS 785 (FLOR); PARNA Serra do Itajaí, 17 Janeiro 2015, *Bittencourt* FB 325 (FLOR); *Bittencourt* FB 326 (FLOR); *Bittencourt* FB 327 (FLOR); *Bittencourt* FB 328 (FLOR); *Bittencourt* FB 329 (FLOR); *Bittencourt* FB 330 (FLOR); 17 Fevereiro 2015, *Mafalda-Freire* FMF 347 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 348 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 349 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 350 (FLOR); Valparaíso, 22 Novembro 2014, *Bittencourt* FB 273 (FURB 45200); Florianópolis, 2010, *Mafalda-Freire* FMF 33 (FLOR); Itapoá, Reserva Volta Velha, *Linhares* FTF 55 (FLOR); Ituporanga, Rio do Norte, 19 Outubro 2014, *Bittencourt* FB 242 (FURB 45177); *Bittencourt* FB 243 (FURB 45178); *Bittencourt* FB 244 (FURB 45179); *Bittencourt* FB 245 (FURB 45180); *Bittencourt* FB 246 (FURB 45181); Joaçaba, Parque Ecológico Municipal Rio do Peixe, 10 Março 2010, *Mafalda-Freire* FMF 104 (FLOR); 24 Janeiro 2014, *Mafalda-Freire* FMF 331 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 332 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 333 (FLOR); 27 Setembro 2014, *Mafalda-Freire* FMF 294 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 295 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 296 (FLOR);

Mafalda-Freire FMF 297 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 298 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 299 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 300 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 304 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 305 (FLOR); 28 Setembro 2014, *Mafalda-Freire* FMF 309 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 310 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 311 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 312 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 313 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 314 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 315 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 316 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 317 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 318 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 319 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 320 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 321 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 322 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 323 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 324 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 325 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 326 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 327 (FLOR); *Mafalda-Freire* FMF 328 (FLOR); Santo Amaro da Imperatriz, Trilha das Cachoeiras, 21 Março 2014, *Mafalda-Freire* FMF 232 (FLOR); EUA: North Carolina, Cranberry, Agosto 1887, *R. Thaxter*, Reliquiae Farlowianae 612 (FH 5086); *R. Thaxter*, Reliquiae Farlowianae 612 (FH 5077); *R. Thaxter*, Reliquiae Farlowianae 612 (MICH 274593); JAPÃO: Ibaraki, Gozenyama, 29 Julho 2001, *F. Ihara* 01021; 26 Julho 2002, *F. Ihara* 02024; *F. Ihara* 02025; 7 Agosto 2004, *F. Ihara* 04063; 23 Julho 2007, *F. Ihara* 07044; *F. Ihara* 07045; Iwate, Morioka, 18 Julho 2007, *F. Ihara* 07031; *F. Ihara* 07032; 11 Agosto 2007, *F. Ihara* 07116; *F. Ihara* 07117; *F. Ihara* 07118; Kyushu, Julho 1950, MICH 274571; PANAMÁ: Porto Bello, 15 Fevereiro 1911, *E.A. Schwarz* (MICH 274589); TRINIDADE, 11 Fevereiro 1913, *R. Thaxter* (FH 2544).

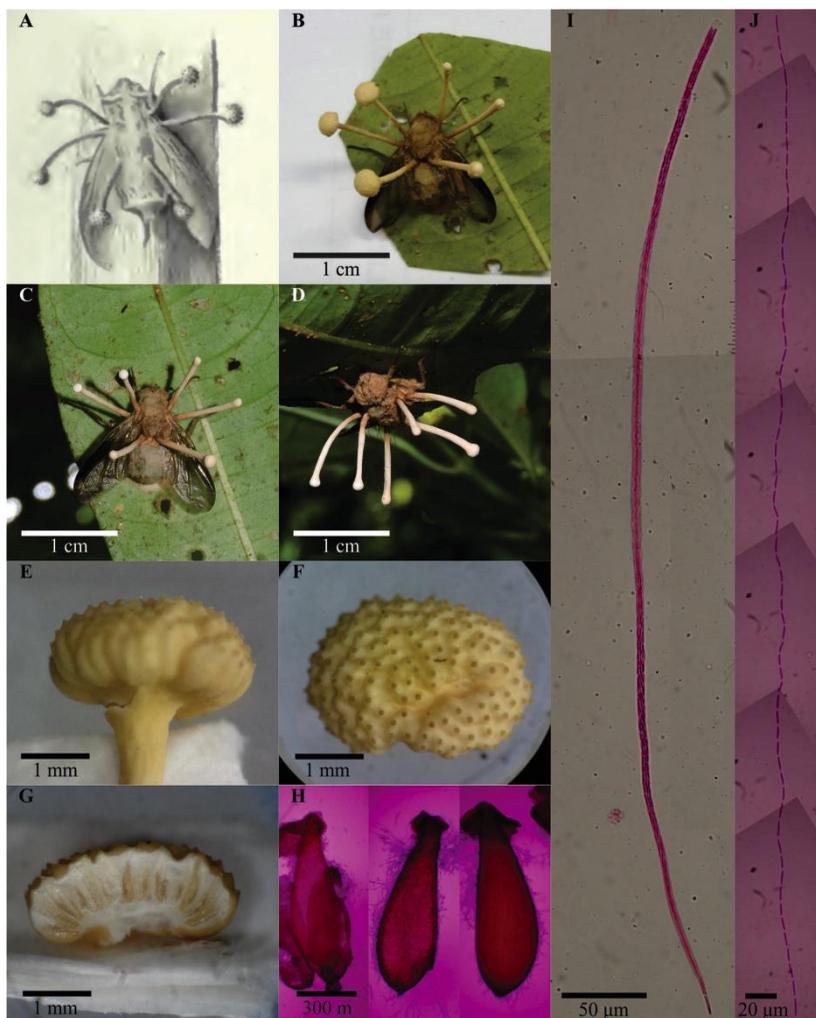


Figura 1. *Ophiocordyceps muscicola*. **A.** Detalhe de uma prancha da obra “Phycomyceten und Ascomyceten. Untersuchungen aus Brasilien” (1901) mostrando um desenho de *C. muscicola*; **B.** Epítipo de *O. muscicola*; **C-D.** Epítipo de *O. muscicola* em campo, ainda imaturo, mostrando por dois diferentes ângulos a posição em que este táxon é comumente encontrado no ambiente; **E-F.** Visão lateral e superior da região fértil, com ostíolos evidentes; **G.** Região fértil em corte longitudinal; **H.** Peritécios; **I.** Asco com *cap* evidente; **J.** Ascósporos com 64 *part-spores*.

Discussão

Durante as incursões a campo em diversas localidades da Mata Atlântica em Santa Catarina, foram encontrados exemplares com morfologia similar ao conceito amplo de *O. dipterigena*: patógenos de moscas, com estromas filiformes, capitados e de coloração amarela a marrom alaranjada (Petch 1932, Mains 1958, Kobayasi & Shimizu 1978, Luangsa-ard et al. 2008). Entre os materiais coletados alguns apresentaram um padrão morfológico que, associado à aspectos ecológicos, possibilitou relacionar esses materiais aos dados do protólogo de *Cordyceps muscicola*. Esses espécimes apresentam perfeito estado de preservação dos hospedeiros (presença de pernas, asas e cerdas), que é encontrado envolvido pelo micélio, presença de grande número de estromas, com estipe delgado e região fértil discoide. Este conjunto de caracteres distingue *O. muscicola* de outras espécies/grupos de *O. dipterigena* s.l.

Dentre os sete espécimes identificados como *O. muscicola*, quatro apresentaram seis estromas, semelhante ao observado no lectótipo (Fig. 1A). Na literatura existem poucos relatos de espécimes do complexo *O. dipterigena* s.l. com seis ou mais estromas (Petch 1932, Möller 1901), sendo a forma mais comum apenas dois estromas no tórax e um sinêmio no abdômen (Massei 1895, Petch 1932, Kobayasi & Shimizu 1982, Luangsa-ard et al. 2008).

O micélio que recobre o hospedeiro é uma característica aparentemente rara e particular de *O. dipterigena* s.l., no entanto observada apenas por Möller (1901) em *C. muscicola* e por Mains (1950) em espécimes dos EUA. Foram revisadas coleções similares às estudadas por Mains (1950), da mesma localidade e pelo mesmo coletor. Uma grande diferença entre os espécimes de *O. muscicola* e dos EUA foi observada, visto que os espécimes Norte Americanos parasitam uma espécie de hospedeiro distinta (confirmado por especialistas). Embora não tenha sido possível identificar as espécies de hospedeiros é possível observar que são menores (5 mm). Adicionalmente, os espécimes fúngicos apresentam número de estromas reduzido (um a dois) e a região fértil é discoide e marrom escura. Não foi possível obter autorização para fazer cortes nem obter pequenos fragmentos das coleções dos EUA, o que impediu a obtenção de dados micromorfológicos bem como moleculares.

Cinco dos sete espécimes foram encontrados aderidos à região adaxial de folhas, evidenciando um comportamento padrão do hospedeiro de *O. muscicola*, mas que não foi mencionada na descrição

original de Möller (1901). Dois materiais foram encontrados aderidos a troncos de árvores vivas, sendo este hábito diferente do que ocorre com *O. dipterigena* (Massee 1895, Lloyd 1921), que é usualmente registrado aderido a região abaxial de folhas de árvores vivas.

Um grupo apresentou semelhanças como *O. muscicola* devido ao seu hospedeiro (grandes moscas da família *Muscidae*) e ao grande número de estromas (usualmente quatro). Este grupo, denominado *Ophiocordyceps* sp. 1 (descrito detalhadamente no Capítulo I) apresenta hospedeiro inteiramente danificado (ausência de cerdas, pernas, asas), porém seu corpo não é recoberto por micélio. Diferentemente do que é observado em *O. muscicola*, que apresenta estromas delicados e quebradiços, os espécimes de *Ophiocordyceps* sp. 1 apresentam estromas robustos e resistentes, que mantêm suas características mesmo após a desidratação. A forma da região fértil também é um caráter que o distingue de *Ophiocordyceps* sp. 1, por ser hemisférica e com base aplanada, uma grande porção de medula, branca e algodonosa, facilmente visível, com peritécios distribuídos ao longo de toda a estrutura, dispostos de forma radial, com ostíolos inconspícuos, em contraste ao observado em *O. muscicola* que apresenta região fértil discoide, com região medular reduzida ou ausente, com peritécios dispostos quase paralelamente entre si, com ostíolos bem pronunciados, formando pequenos cumes.

Com a confirmação da perda do holótipo (Friederichsen 1977), o desenho apresentado no protólogo de *C. muscicola* Möller (1901) (Fig. 1A) foi aqui lectotipificado, de acordo com o Art. 9.2, do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (McNeill et al. 2012). Nesse caso, além do processo de lectotipificação, se faz necessário eleger um tipo representativo, um epítipo (Art. 9.8), visto que o desenho é pouco resolutivo e passível de interpretações ambíguas, não demonstrando claramente características importantes para a determinação do hospedeiro e de alguns caracteres morfológicos do fungo. A proposição de um epítipo é fortemente recomendada pelo código, pois através deste seria possível a obtenção de dados moleculares, que atualmente se revelam importantes tanto na compreensão da história evolutiva de grandes grupos, quanto na discriminação de espécies crípticas (Ariyawansa et al. 2014). Com isso (lectotipificação e epítipificação), geráramos um cenário ideal, visando disponibilizar um espécime passível de extração de DNA para ser utilizado em estudos moleculares, importantes para verificação das relações filogenéticas desta espécie com as outras dentro do complexo *O. dipterigena* ou ainda em outro clado. Além disso, são apresentados dados morfológicos e

aspectos ecológicos mais claros, necessários para o entendimento e delimitação deste táxon.

Ophiocordyceps é um gênero caracterizado por conter espécies com estromas filiformes e resistentes, muitas vezes pigmentados, região fértil variando de terminal a intermediária, mas sempre bem definida e duas formas anamórficas *Hymenostilbe* ou *Hirsutella* (Sung et al. 2007). Como esperado, estudos moleculares envolvendo espécimes de *O. dipterigena* s.l. demonstraram a relação filogenética destes espécimes com *Ophiocordyceps*, especialmente com os exemplares do clado *O. sphecocephala* (Luangsa-ard et al. 2008, Quandt. et al. 2014). Neste trabalho é proposta a nova combinação de *Cordyceps muscicola* em *Ophiocordyceps* devido às características macromorfológicas e por apresentar a forma anamórfica do tipo *Hymenostilbe*.

Agradecimentos

Ao Dr. L.C. Pinho (UFSC) e Dr. C.J.C. Pinto (UFSC) pelas identificações dos hospedeiros até nível de família. Ao Dr. Jörn Hentschel, curador Curador do Herbário Haussknecht, na Alemanha, pela ajuda no rastreamento dos espécimes utilizados nos trabalhos de Möller (1901). Ao Felipe Bittencourt que ajudou na logística e nas coletas durante as expedições em Blumenau, bem como coletou diversos espécimes. Aos integrantes do Micolab pelas contribuições em discussões e trabalhos de campo. F. Ihara e curadores dos herbários solicitados pelos empréstimos das exsicatas. Aos gestores de unidades de conservação pela concessão de autorizações de visita e coletas em especial ao do PARNA SI. CAPES e ao CNPq pelas bolsas de estudos concedidas (PPGFAP/UFSC).

Referências

- ARIYAWANSA, H.A.; HAWKSWORTH, D.L.; HYDE, K.D.; JONES, E.B.G.; MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; MANAMGODA, D.S.; THAMBUGALA, K.M.; UDAYANGA, D.; CAMPORESI, E.; DARANAGAMA, A.; JAYAWARDENA, R.; LIU, J-K.; MCKENZIE, E.H.C.; PHOOKAMSAK, R.; SENANAYAKE, I.C.; SHIVAS, R.G.; TIAN, Q.; XU, J-C. 2014. Epitypification and neotypification: guidelines with appropriate and inappropriate examples. *Fungal Diversity*, 69(1): 57-91.
- MCNEILL, J; TURLAND, N.J.; BARRIE, F.R.; BUCK, W.R.; DEMOULIN, V.; GREUTER, W.; HAWKSWORTH, D.L.; HERENDEEN, P.S.; KINAPP, S.; MARHOLD, K. PRADO, J; PRUD'HOMME VAN REINE, W.F.; SMITH, G.F.; WIERSEMA, J.H. 2012. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. (Regnum Vegetabile No. 154). *Königsten: Koeltz Scientific Books*. 240 pp.
- FRIEDERICHSEN, I. 1977. Das Schicksal der von A. Möller in Brasilien (1890–1895) gesammelten Pilze sowie eine Liste der noch vorhandenen Sammlungsstücke. *Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg*, 15: 99-104.
- JOHNSON, D.; SUNG, G.-H.; HYWEL-JONES, N. L.; LUANGSA-ARD, J.J.; BISCHOFF, J.F.; KEPLER, R.M.; SPATAFORA, J.W. 2009. Systematics and evolution of the genus *Torrubiella* (*Hypocreales*, *Ascomycota*). *Mycological Research*, 113(3): 279-289.
- KOBAYASI, Y.; SHIMIZU, D. 1978. *Cordyceps* species from Japan. *Bulletin of the National Museum*, 4: 43-63.
- LLOYD, C.G. 1921. Mycological Notes nº 65. *Mycological Writings*, 6: 1-1101.
- LUANGSA-ARD, J.J.; TASANATHAI, K.; MONGKOLSAMRIT, S.; HYWEL-JONES, N. 2008. Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand. Volume 2. 75 pp.

- MAINS, E.B. 1950. Entomogenous Species of *Akanthomyces*, *Hymenostilbe* and *Insecticola* in North America. *Mycological Society of America*, 42(4): 566-589.
- MAINS, E.B. 1958. North American Entomogenous Species of *Cordyceps*. *Mycological Society of America*, 50(2): 169-222.
- MAINS, E.B. 1959. *Cordyceps* species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 86(1): 46-58.
- MASSEE, G. 1985. A revision of genus *Cordyceps*. *Annals of Botany*, 9: 1-44.
- MÖLLER, A. 1901. Phycomyceten und Ascomyceten. Untersuchungen aus Brasilien. *Botanische Mittheilungen aus den Tropen*, 9: 1-319.
- PETCH, T. 1932. Notes on entomogenous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 16(4): 209-245.
- POPPENDIECK, H-H. 2001. A Botanical Odyssey: the evacuation of the Hamburg Herbarium 1943-1990. *Biological collections and biodiversity. Linnean Society Occasional Publications*, 3: 43-50.
- QUANDT, C.A.; KEPLER, R.M.; GAMS, W.; ARAÚJO, J.P.M.; BAN, S.; EVANS, H.C.; HUGHES, D.P.; HUMBER, R.; HYWEL-JONES, N.; LI, Z.; LUANGSA-ARD, J.J.; REHNER, S.A.; SANJUAN, T.; SATO, H.; SHRESTHA, B.; SUNG, G.-H.; YAO, Y.-J.; ZARE, R.; SPATAFORA, J.W. 2014. Phylogenetic-based nomenclatural proposals for *Ophiocordycipitaceae* (*Hypocreales*) with new combinations in *Tolypocladium*. *IMA Fungus*, 5(1): 121-134.
- SUNG, G.; HYWEL-JONES, N. L.; SUNG, J-M.; LUANGSA-ARD, J.J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J.W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in mycology*, 57: 5-59.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ophiocordyceps dipterigena é um complexo taxonômico e determinações futuras devem levar em consideração todos os caracteres abordados no presente trabalho, especialmente os caracteres mais importantes na delimitação e diferenciação das espécies. O táxon possui ainda quatro sinônimos heterotípicos (*C. surinamensis* Henn., *C. ouwensii* Höhn, *C. thwaitesii* Lloyd, *C. opposita* Syd.) que devem ter seus materiais tipos revisados criticamente e se possível utilizados em estudos moleculares. Assim como novas coletas em áreas ainda não exploradas são recomendadas, tendo em vista a potencial diversidade ainda inexplorada que o complexo compreende.

O holótipo de *O. dipterigena* está desaparecido e. Não há dados moleculares do holótipo de *O. dipterigena*, sendo a obtenção destes dados um fator crucial na delimitação precisa do que é s.s. Caso seja confirmada a perda do espécime tipo, seria necessária neotipificação de uma material da localidade do tipo para que fosse possível a obtenção de DNA.

Tailândia é a localidade mais próximo do Sri Lanka que apresenta espécimes de *O. dipterigena* s.l. com dados moleculares disponíveis. Os resultados das análises moleculares sugerem a existência de mais de uma espécie no clado formado pelos espécimes desta localidade. Estes exemplares não apresentam descrições morfológicas que poderiam ser utilizadas para discutir os resultados e compará-las com o que existe no protólogo da espécie. Portanto, não é possível afirmar que algum dos espécimes deste clado seja *O. dipterigena* s.s.

A partir dos dados apresentados no presente trabalho não há evidências de que *O. dipterigena* s.s. esteja restrito ao Sri Lanka. Porém, apenas com os dados existentes na literatura o conceito do táxon gera ambiguidade e deve ser explorado com cautela. É necessário que sejam feitas novas coletas na localidade onde o holótipo foi coletado a fim de obter espécimes que possibilitem a identificação do hospedeiro e que sejam descritos de forma detalhada especialmente a morfologia da região fértil e características micromorfológicas dos ascósporos e conídios.

Estudos moleculares utilizando diferentes marcadores, RPB1, RPB2, Tef 1-alfa, LSU, SSU, entre outros, podem ajudar a compreender as relações entre as espécies do complexo e corroborar como novidades científicas aqueles grupos que não foram aqui apresentados como espécies novas.

Os caracteres assexuais foram de extrema importância na discriminação de espécies nesse trabalho. Assim sendo, uma maior atenção deve ser voltada a esses caracteres, como já foi feito por Petch (1932) ao relacionar diferentes morfologias de conídios a diferentes grupos de espécimes de *O. dipterigena* de áreas distintas. A padronização da forma de mensurar peritécios é proposta neste trabalho, porém é necessário que esta seja aplicada em estudos futuros possibilitando a comparação deste caráter entre diferentes espécimes. A descrição detalhada da morfologia de ascósporos e *part-spores* ajudaram na discriminação das espécies do complexo, porém tal detalhamento só é possível a partir da coleta da esporada, que exige que os espécimes sejam mantidos em câmara úmida. Esta é uma prática que demanda cuidado e dedicação, porém deve ser priorizados em trabalhos futuros.

Como já esperado, a determinação do hospedeiro é de fundamental importância para discriminação das espécies, sendo este um marcador que não deve ser renegado pelos taxonomistas de *Cordyceps* s.l., principalmente para a resolução de complexos taxonômicos. Contudo, neste trabalho, a identificação de alguns hospedeiros foi dificultada devido a estes estarem altamente danificados pela ação do fungo e dos intempéries inerente à exposição prolongada no ambiente. Talvez coletas e identificação de moscas, no mesmo habitat e no mesmo período do ano onde são coletados os espécimes parasitados, possam auxiliar na determinação dos hospedeiros. A partir da identificação das espécies de mosca parasitadas seria possível, baseado em dados de distribuição do hospedeiro, estimar novas localidades onde estes fungos podem ocorrer.

Embora não seja o tema central deste trabalho, *O. aff. discoideicapitata* apresenta evidências de ser uma espécie nova e em trabalhos futuros o aumento da amostragem poderá confirmar esta hipótese. Outras espécies de fungos entomopatogênicos de *Ophiocordyceps* que apresentam características morfológicas e/ou ecológicas relacionadas às espécies do complexo *O. dipterigena*, como *O. discoideicapitata*, *C. sakishimensis*, *C. nelumboides*, *C. pseudonelumboides*, *O. ditmarii*, *O. forquignoni*, *O. odonatae*, *O. lloydii*, *O. pseudolloydii*, devem ser incluídas em estudos moleculares futuros e materiais de referência destas espécies devem ser revisados morfológicamente.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J.; EVANS, H.C.; GEISER, D.M.; MACKAY, W.; HUGHES, D.P. 2015. Unravelling the diversity behind the *Ophiocordyceps unilateralis* (*Ophiocordycipitaceae*) complex: Three new species of zombie-ant fungi from the Brazilian Amazon. *Phytotaxa*, in press.
- ARIYAWANSA, H.A.; HAWKSWORTH, D.L.; HYDE, K.D.; JONES, E.B.G.; MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; MANAMGODA, D.S.; THAMBUGALA, K.M.; UDAYANGA, D.; CAMPORESI, E.; DARANAGAMA, A.; JAYAWARDENA, R.; LIU, J.-K.; MCKENZIE, E.H.C.; PHOOKAMSAK, R.; SENANAYAKE, I.C.; SHIVAS, R.G.; TIAN, Q.; XU, J.-C. 2014. Epitypification and neotypification: guidelines with appropriate and inappropriate examples. *Fungal Diversity*, 69(1): 57-91.
- STAMATAKIS, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*.
- CHEN, J.-Y.; CAO, Y.-Q.; YANG, D.-R.; LI, M.-H. 2011. A new species of *Ophiocordyceps* (*Clavicipitales*, *Ascomycota*) from southwestern China. *Mycotaxon*, 115(1): 1-4.
- CHEN, Z.-C. 1978. Note on New Formosan Forest Fungi VI. Genus *Cordyceps* in Their Distribution in Taiwan. *Taiwania*, 23(1): 153-172.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.
- DE MEIJER, A.A.R. 2006. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná. *Boletim do Museu Botânico Municipal de Curitiba*, 68: 4-55.
- DE MEIJER, A.A.R. 2010. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná: corrections and updating. *Boletim do Museu Botânico Municipal de Curitiba*, 72: 1-9.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

- EVANS, H.C. 1982. Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems: an appraisal. *Ecological Entomology*, 7: 47-60.
- EVANS, H.C.; ELLIOT, S.L.; HUGHES, D.P. 2011. Hidden Diversity Behind the Zombie-ant Fungus *Ophiocordyceps unilateralis*: Four New Species Described from Carpenter Ants in Minas Gerais, Brazil. *PLoS one*, 6(3): 1-9.
- EVANS, H.C.; SAMSON, R.A. 1982. *Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems I. The *Cephalotes* (Myrmicinae) complex. *Transactions of the British Mycological Society*, 79(3): 431-453.
- EVANS, H.C.; SAMSON, R.A. 1984. *Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems II. The *Camponotus* (Formicinae) complex. *Transactions of the British Mycological Society*, 82(1): 127-150.
- FRIEDERICHSEN, I. 1977. Das Schicksal der von A. Möller in Brasilien (1890–1895) gesammelten Pilze sowie eine Liste der noch vorhandenen Sammlungsstücke. *Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg*, 15: 99-104.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.
- HENNINGS, P. 1902. Einige neue *Cordyceps*-Arten aus Surinam. *Hedwigia*, 41: 169.
- HÖHNEL, F.X.R. von. 1909. Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe. *Fragmente zur Mykologie*, 118: 275-452.
- HUGHES, D.P.; EVANS, H.C.; HYWEL-JONES, N.; BOOMSMA, J.J.; ARMITAGE, S.A.O. 2009. Novel fungal disease in complex leaf-cutting. *Ecological Entomology*, 34: 214-220.

JAPANESE SOCIETY OF CORDYCEPS RESEARCH. 2014. Guide to ecology of Japanese *Cordyceps*. 303pp.

JOHNSON, D.; SUNG, G.-H.; HYWEL-JONES, N. L.; LUANGSARD, J.J.; BISCHOFF, J.F.; KEPLER, R.M.; SPATAFORA, J.W. 2009. Systematics and evolution of the genus *Torrubiella* (*Hypocreales*, *Ascomycota*). *Mycological Research*, 113(3): 279-289.

KATO, K.; STANDLEY, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772-780.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJES, P.; DRUMMOND, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647-1649.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. 2008. Ainsworth & Bisby's dictionary of the Fungi. 10th edition, CAB International.

KOBAYASI, Y.; SHIMIZU, D. 1978. *Cordyceps* species from Japan. *Bulletin of the National Museum*, 4: 43-63.

KOBAYASI, Y. 1981. Revision of the genus *Cordyceps* and its allies 1. *Bulletin of the National Science Museum, Tokyo. Series B, Botany*, 7(1): 1-13.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.

LLOYD, C.G. 1916. Mycological notes No. 43. *Mycological Writings*, 5: 589-604.

LLOYD, C.G. 1921. Mycological Notes n° 65. *Mycological Writings*, 6: 1-1101.

LUANGSA-ARD, J.J.; TASANATHAI, K.; MONGKOLSAMRIT, S.; HYWEL-JONES, N. 2008. Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand. Volume 2. 75 pp.

LUANGSA-ARD, J.J.; RIDKAEW, R.; TASANATHAI, K.; THANAKITPIPATTANA, D.; HYWEL-JONES, N. 2011. *Ophiocordyceps halabalaensis*: a new species of *Ophiocordyceps* pathogenic to *Camponotus gigas* in Hala Bala Wildlife Sanctuary, Southern Thailand. *Fungal biology*, 115: 608-614.

MAINS, E.B. 1950. Entomogenous Species of *Akanthomyces*, *Hymenostilbe* and *Insecticola* in North America. *Mycological Society of America*, 42(4): 566-589.

MAINS, E.B. 1958. North American Entomogenous Species of *Cordyceps*. *Mycological Society of America*, 50(2): 169-222.

MAINS, E.B. 1959. *Cordyceps* species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 86(1): 46-58.

MASSEE, G. 1985. A revision of genus *Cordyceps*. *Annals of Botany*, 9: 1-44.

MCALPINE, D.K. 1998. Review of the Australian stilt flies (Diptera : *Micropezidae*) with a phylogenetic analysis of the family. *Invertebrate Taxonomy* 12(1) 55 - 134.

MCNEILL, J; TURLAND, N.J.; BARRIE, F.R.; BUCK, W.R.; DEMOULIN, V.; GREUTER, W.; HAWKSWORTH, D.L.; HERENDEEN, P.S.; KINAPP, S.; MARHOLD, K. PRADO, J; PRUD'HOMME VAN REINE, W.F.; SMITH, G.F.; WIERSEMA, J.H. 2012. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. (Regnum Vegetabile No. 154). *Königsten: Koeltz Scientific Books*. 240 pp.

MÖLLER, A. 1901. Phycomyceten und Ascomyceten. Untersuchungen aus Brasilien. *Botanische Mittheilungen aus den Tropen*, 9: 1-319.

MUELLER, G.M.; SCHMIT, J.P.; LEACOCK, P.R.; BUYCK, B.; CIFUENTES, J.; DESJARDIN, D.E.; HALLING, R.E.; HJORTSTAM, K.; ITURRIAGA, T.; LARSSON, K.-H.; LODGE, D.J.; MAY, T.W.; MINTER, D.; RAJCHENBERG, M.; REDHEAD, S.A.; RYVARDEN, L.; TRAPPE, J.M.; WATLING, R.; WU, Q. 2007. Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodiversity and Conservation*, 16(1): 37-48.

PETCH, T. 1932. Notes on entomogenous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 16(4): 209-245.

PETCH, T. 1933. Notes on entomogenous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 18(1): 48-75.

POPPENDIECK, H.-H. 2001. A Botanical Odyssey: the evacuation of the Hamburg Herbarium 1943-1990. *Biological collections and biodiversity. Linnean Society Occasional Publications* 3, 43-50.

POSADA, D. 2008. ModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, C.A.; CHEN, W.; FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, 109 (16):6241-6246.

QUANDT, C.A.; KEPLER, R.M.; GAMS, W.; ARAÚJO, J.P.M.; BAN, S.; EVANS, H.C.; HUGHES, D.P.; HUMBER, R.; HYWEL-JONES, N.; LI, Z.; LUANGSA-ARD, J.J.; REHNER, S.A.; SANJUAN, T.; SATO, H.; SHRESTHA, B.; SUNG, G.-H.; YAO, Y.-J.; ZARE, R.; SPATAFORA, J.W. 2014. Phylogenetic-based nomenclatural proposals for *Ophiocordycipitaceae* (*Hypocreales*) with new combinations in *Tolypocladium*. *IMA Fungus*, 5(1): 121-134.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.

SANJUAN, T.; TABIMA, J.; RESTREPO, S.; LÆSSØE, T.; SPATAFORA, J.W.; FRANCO-MOLANO, A.N. 2014. Entomopathogens of Amazonian stick insects and locusts are members

of the *Beauveria* species complex (*Cordyceps* sensu stricto). *Mycologia*, 106(2): 260-275.

SASAKI, F.; MIYAMOTO, T.; YAMAMOTO, A.; TAMAI, Y.; YAJIMA, T. 2012. Relationship between intraspecific variations and host insects of *Ophiocordyceps nutans* collected in Japan. *Mycoscience*, 53: 85-91.

SHIMIZU, D. 1997. Illustrated Vegetable Wasps and Plant Worms in Colour. Tokyo: *Ie-No-Hikari Association*, 446 pp.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; LASTRA, C.C.L.; HUMBER, R.A. 2010. An overview of arthropod-associated fungi from Argentina and Brazil. *Mycopathologia*, 170(1): 61-76.

STAJICH, J.E.; BERBEE, M.L.; BLACKWELL, M.; HIBBETT, D.S.; JAMES, T.Y.; SPATAFORA, J.W.; TAYLOR, J.W. 2009. The fungi. *Current Biology*, 19 (18): R840-R845.

SUNG, G.; HYWEL-JONES, N.L.; SUNG, J-M.; LUANGSA-ARD, J.J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J.W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies In Mycology*, 57: 5-59.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729.

TANAKA, E.; ASHIZAWA, T.; SONODA, R.; TANAKA, C. 2008. *Villosiclava virens* gen. nov., comb. nov. teleomorph of *Ustilaginoidea virens*, the causal agente of rice false smut. *Mycotaxon*, 106: 491-501.

THIERS, B. (atualizado continuamente). Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. *New York Botanical Garden's Virtual Herbarium*. Disponível em: < <http://sweetgum.nybg.org/ih/> >

TULASNE, L.R.; TULASNE, C. 1865. Selecta Fungorum Carpologia. V. 3. Nectriei. Phacidiei. Pezizei. *Parisiis, Imperatoris Jussu, In Imperiali Typographeo Excudebatur*. 260 pp.

TZEAN, S.S., HSIEH, L.S.; WU, W.J. 1997. Atlas of Entomopathogenic Fungi from Taiwan. *Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan, Republic of China*, 215 pp. ISBN 957-97217-6-9.

XIANG, L.; SONG, J.; XIN, T.; ZHU, Y.; SHI, L.; XU, X.; PANG, X.; YAO, H.; LI, W.; CHEN, S. 2013. DNA barcoding the commercial Chinese caterpillar fungus. *FEMS Microbiology Letters*, 347: 156-162.

APÊNDICE A

Tabela 2. Lista de exsicatas revisadas

Táxon	Herbário e n° de acesso	Localidade
<i>Ophiocordyceps muscicola</i>	FLOR (ACM 467)	Brasil
<i>O. muscicola</i>	FLOR (FB 331)	Brasil
<i>O. muscicola</i>	FLOR (FB 332)	Brasil
<i>O. muscicola</i>	FLOR (FB 333)	Brasil
<i>O. muscicola</i>	FLOR (FMF 340)	Brasil
<i>O. muscicola</i>	FLOR (FMF 345)	Brasil
<i>O. muscicola</i>	FLOR (FMF 346)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FURB 45181 (FB 246)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (DS 0785)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 33)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 104)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 141)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 295)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 297)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 298)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 305)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 309)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 310)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 311)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 312)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 313)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 314)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 315)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 316)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 317)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 318)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 319)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 320)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 321)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 322)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 323)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 324)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 331)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 332)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 1	FLOR (FMF 333)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 2	FURB (FB 242)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 2	FURB (FB 243)	Brasil

<i>Ophiocordyceps</i> sp. 2	FURB (FB 244)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 2	FURB (FB 245)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 2	FLOR (FMF 299)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 2	FLOR (FMF 300)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 2	FLOR (FMF 326)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 2	FLOR (FMF 327)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 2	FLOR (FMF 325)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 3	FLOR (FMF 296)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 3	FLOR (FMF 294)	Brasil
<i>Ophiocordyceps</i> sp. 4	FLOR (FMF 147)	Brasil
<i>O. cf. muscicola</i>	FLOR (FMF 145)	Brasil
<i>O. cf. muscicola</i>	FLOR (FMF 146)	Brasil
<i>O. aff. discoideicapitata</i>	FLOR (FMF 148)	Brasil
<i>O. cf. discoideicapitata</i>	NARO (F. Ihara 07031)	Japão
<i>O. cf. discoideicapitata</i>	NARO (F. Ihara 07032)	Japão
<i>O. cf. discoideicapitata</i>	NARO (F. Ihara 07116)	Japão
<i>O. cf. discoideicapitata</i>	NARO (F. Ihara 07117)	Japão
<i>O. cf. discoideicapitata</i>	NARO (F. Ihara 07118)	Japão
<i>O. discoideicapitata</i>	NMNS (TNS-F. 181545)	Japão
<i>O. dipterigena</i>	FH 2544	Trindade
<i>O. dipterigena</i>	FH 5077	EUA
<i>O. dipterigena</i>	FH 5068	EUA
<i>O. dipterigena</i>	MICH-F-274571	Japão
<i>O. dipterigena</i>	MICH-F-274589	Panamá
<i>O. dipterigena</i>	MICH-F-274593	EUA
<i>O. dipterigena</i>	MICH-F-274612	Bolivia
<i>O. dipterigena</i>	NARO (F. Ihara 01021)	Japão
<i>O. dipterigena</i>	NARO (F. Ihara 02024)	Japão
<i>O. dipterigena</i>	NARO (F. Ihara 02025)	Japão
<i>O. dipterigena</i>	NARO (F. Ihara 04063)	Japão
<i>O. dipterigena</i>	NARO (F. Ihara 07044)	Japão
<i>O. dipterigena</i>	NARO (F. Ihara 07045)	Japão
<i>O. dipterigena</i>	RB 524991	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FB 325)	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FB 326)	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FB 327)	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FB 328)	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FB 329)	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FB 330)	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FMF 55)	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FMF 232)	Brasil

<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FMF 304)	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FMF 328)	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FMF 347)	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FMF 348)	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FMF 349)	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FMF 350)	Brasil
<i>O. dipterigena</i>	FLOR (FTF 78)	Brasil

ANEXO A – Isolamento de DNA total de plantas utilizando-se o método CTAB de Romano & Brasileiro (1998)

1. Cortar um pequeno pedaço do estroma (1-5 mg) e o transferir para um *ependorf* de 1,5 mL contendo nitrogênio líquido. Com o auxílio de um macerador de *ependorf*, pulverize o material até se obter um pó fino.
2. Adicionar 750 µL de tampão CTAB* pré-aquecido a 65°C. Feche o tubo e misture gentilmente até o pó ficar homogeneamente distribuído.
3. Adicione 4 µL de β-mercaptoetanol. Recomenda-se que esta etapa seja feita na capela devido à toxicidade do reagente.
4. Incube as amostras em banho-maria a 60°C por 30min, agitando ocasionalmente o tubo para manter o extrato ressuspendido.
5. Retire o tubo do banho-maria e espere que a mistura atinja a temperatura ambiente. Adicione 750 µL de clorofórmio:álcool isoamílico gelado (24:1; v/v). Feche o tubo e misture manualmente por 10 min. Recomenda-se que esta etapa seja feita na capela devido à toxicidade do reagente.
6. Centrifugue a 14.000 rpm por 10 min à temperatura ambiente, para separar a fase orgânica da aquosa.
7. Transfira a fase aquosa (fase superior) para um tubo novo de 1,5 mL e descarte o *ependorf* antigo. Evite pegar qualquer proteína desnaturada presente na interface. Recomenda-se retirar 150 µL por vez.
8. Repita a extração com clorofórmio:álcool isoamílico mais uma ou duas vezes (etapas de 5 a 7), levando em consideração que mais extrações podem tornar a amostra mais pura, porém com maiores perdas de DNA.
9. Adicione 450 µL de isopropanol a -20°C. Misture suavemente até formar um precipitado. Deixar a -20°C por pelo menos 1 h.
10. Centrifugue a amostra a 10.000 rpm por 20 min. Em uma boa preparação, o DNA não deve estar escuro.
11. Descarte o sobrenadante e lave o precipitado com 450 µL de etanol 70% (v/v).
12. Centrifugue novamente a 14.000 rpm por 3 min.
13. Descarte o sobrenadante e seque o precipitado pela borda do *ependorf*. Coloque o tubo em banho-maria seco a 35°C até secar totalmente.
14. Dissolva o precipitado em 50 µL de água Milli-Q ou tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e incube a 4°C (geladeira)

por meia hora ou mais. A amostra pode ser então armazenada a -20°C (freezer).

***Tampão CTAB**

- CTAB 2% (p/v)
- NaCl 1,4 M
- Tris-HCl 100 mM pH 8,0
- EDTA 20 mM

ANEXO B – Protocolo de Extração utilizando o kit DNA Magnex (adaptado do original)

1. Pesar em um *ependorf* de 1,5 mL aproximadamente 0,15–0,80 mg do material a ser extraído;
(Atenção: não utilizar grandes quantidades de material, pois o rendimento pode ser baixo)
2. Macerar a amostra utilizando nitrogênio líquido e um macerador de *ependorf*;
3. Adicionar 270 μL de Tampão de Lise e 2 μL de Proteinase K;
4. Incubar a 56°C por 1 hora;
5. Adicionar 100 μL do Tampão de Extração e homogeneizar em vórtex;
6. Adicionar 10 μL de resina magnética, homogeneizar em vórtex e incubar a 56°C por 5 minutos;
7. Homogeneizar em vórtex novamente e colocar o tubo na estante magnética. Aguardar 1 minuto e, então, aspirar o líquido com pipeta e descartar;
8. Adicionar 100 μL do Tampão de Lavagem de uso e homogeneizar em vórtex;
9. Colocar o tubo na estante magnética, aguardar 1 minuto, aspirar cuidadosamente o líquido com a pipeta e descartar;
10. Repetir as etapas 8 e 9 duas vezes (totalizando 3 vezes);
11. Deixar o tubo em repouso, com a tampa aberta, durante 15 minutos em temperatura ambiente ou até que todo álcool tenha evaporado;
12. Adicionar 50 μL do Tampão de Eluição, homogeneizar em vórtex e incubar a 70°C por 15 minutos.
13. Homogeneizar em vórtex por alguns segundos e colocar o tubo na estante magnética. Aguardar 1 minuto. Transferir cuidadosamente o líquido contendo o DNA para um novo tubo já identificado.

ANEXO C – Protocolo extração de DNA total de fungos adaptado de Kepler et al. (2011)

Preparação pré-extração: Colocar a amostra em um *ependorf* de 1,5 mL contendo 50-100 µl de CTAB (ver receita abaixo).

*Nota 1: a amostra deve ser um pequeno fragmento, preferencialmente fresco.

*Nota 2: esta amostra pode ser armazenada durante uma a duas semana à temperatura ambiente, alguns meses a 4 °C, ou por anos a -20°C.

1. Adicionar 500 µl de CTAB na amostra previamente preparada;
2. Moer a amostra ou espécime em *ependorf* com pilão de microtubos conectado a uma furadeira elétrica;

*Nota: certifique-se o tecido seja macerado completamente, não mais do que 1 min.

3. Incubar a amostra a 65°C por 30-60 min;
4. Adicionar 500 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1) e homogeneizar suavemente durante 5 min;
5. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 min;
6. Transferir o sobrenadante para um novo *ependorf* de 1,5 mL previamente identificado e adicionar igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1) (Aprox. 500 µl), homogeneizar suavemente por 5 min;
7. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 min;
8. Transferir o sobrenadante para novo *ependorf* de 1,5 mL;
9. Adicionar 1 volume de isopropanol (igual ao sobrenadante) e homogeneizar suavemente
10. Incubar a -20°C por 1 hora ou *overnight*;
11. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 min a 4°C;
12. Verter o sobrenadante cuidadosamente para não perder o *pellet*;
13. Lavar o DNA com 50-100 µl de etanol 70%;
14. Centrifugar a 10.000 rpm por 5 min;
15. Verter o sobrenadante cuidadosamente para não perder o *pellet*;
16. Ressuspender o DNA em 20-50 µl de tampão TE (Tris EDTA) ou em H₂O qq (água ultrapura milliQ). Pode ser ressuspenso a 37°C por 2 horas ou *overnight* a 4°C;
17. Adicionar 1-2 µl de RNase e armazenar a amostra a -20°C.

*Tampão de extração CTAB

1,4 M NaCl; 100mM Tris-HCL (pH 8,0); 20 mM EDTA (pH 8,0); 2% CTAB peso/volume.

ANEXO D – Protocolo de purificação do produto de PCR com PEG

1. Adicionar igual volume de PEG 20% e misturar bem, por up-and-down.
2. Incubar em banho-maria a 37°C por 30 min.
3. Centrifugar por 15 min a 12000 – 13000 rpm.
4. Retirar o máximo possível de sobrenadante com uma pipeta, com cuidado para não encostar a ponteira no fundo do tubo. O pellet é muito pequeno e às vezes não pode ser visto, por isso deve evitar tocar no fundo e nas paredes laterais.
5. Adicionar 125 μ L de etanol 80% gelado e centrifugar por 5 minutos a 12000 – 13000 rpm.
6. Retirar o máximo possível de sobrenadante, revertendo o tubo e secar a borda dos tubos com papel absorvente.
7. Repetir os passos 5 e 6.
8. Deixar os tubos abertos para secar à temperatura ambiente ou em banho-maria a 45°C até que não haja vestígios de etanol.
9. Ressuspender em água milli-Q aproximadamente a mesma quantidade que o volume inicial, ou menos para aumentar a concentração de DNA (Ex: 15 μ L).
10. Colocar em banho-maria a 45°C por 30 min.