



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES**

**CULTIVO EXPERIMENTAL DE *Cordyceps* (Ascomycota: Cordycipitaceae)
DISTRIBUIDO EN EL PARQUE NACIONAL DESIERTO DEL CARMEN,
ESTADO DE MÉXICO, COMO ESTRATEGIA PARA SU
APROVECHAMIENTO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

LORENA LÓPEZ RODRÍGUEZ

COMITÉ DE TUTORES:

Dra. Cristina Burrola Aguilar

Dra. María Elena Estrada Zúñiga

Dr. Roberto Garibay Orijel

El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Abril 2022

Resumen

Cordyceps sensu lato (s.l.) es un grupo parafilético de hongos ascomicetos que han evolucionado interactuando como parásitos de insectos, arañas, hongos y gramíneas, mientras que algunos son saprótrofos y/o endófitos. En países asiáticos, varias especies de dichos ascomicetos son aprovechadas como alimentos funcionales, ya que el micelio y los estromas producen moléculas con actividad biológica. Las especies de mayor importancia cultural y económica son *Cordyceps militaris* y *Ophiocordyceps sinensis*, cuya forma de aprovechamiento es, principalmente, a través de su cultivo. En México se han registrado 30 especies del grupo *Cordyceps* s.l., de las cuales, *Cordyceps militaris* presenta la mayor distribución geográfica y el mayor número de registros, sin embargo, no ha sido estudiado su potencial alimenticio y medicinal de estromas recolectados, micelio o estromas obtenidos por cultivo experimental. En Desierto del Carmen, Estado de México se ha registrado una alta diversidad de estos hongos, de las cuales *Cordyceps* sp. affinis *militaris* presenta alta abundancia, sin embargo su identificación se ha basado en taxonomía tradicional. Por lo tanto, los objetivos de esta investigación fueron: determinar la biología y relaciones filogenéticas de esta especie; y determinar las cepas y condiciones nutrimentales en cultivo experimental (*in vitro* y artificial) que influyen en la producción de biomasa y desarrollo de estromas. Para ello, se realizaron recolectas de septiembre a noviembre de 2018 a 2019 en el Desierto del Carmen, Tenancingo, Estado de México. La determinación de la especie se realizó utilizando taxonomía integral: caracterización morfológica, identificación de hospedero y análisis filogenético de máxima verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (BI) con los locus ITS, 28S, RPB1, RPB2 y TEF. Se realizaron aislamientos de esporas sexuales, se obtuvieron y caracterizaron cepas y se seleccionaron para su cultivo experimental. Se seleccionaron las cepas que producían mayor biomasa en medio líquido PD (papa dextrosa). En las cepas seleccionadas se evaluó la producción de biomasa en diferentes medios de cultivo: Agar agar (AA), Agar arroz (AAr), Agar trigo (AT), Agar papa dextrosa (PDA), Agar extracto de malta (EMA), Agar papa dextrosa levadura (SDAY), en condiciones de oscuridad a 25°C por 45-60 días. Posteriormente se realizaron cruces entre cepas y al mismo tiempo se cultivó cada cepa en sustrato de arroz para seleccionar aquellas cruces o cepas que eran viables para fructificar. Por último se realizaron bioensayos de fructificación en las cepas seleccionadas (aquella que producían mayor biomasa y desarrollaban primordios en sustrato). Los bioensayos de fructificación se realizaron en diferentes sustratos: arroz blanco (Ab), arroz integral (Ai), maíz palomero (Mp), arroz con larvas de *Comadia redtenbacheri* (ACr) y arroz

con larvas de *Tenebrio molitor* (ATm). Como resultados, se obtuvo la descripción de una nueva especie: *Cordyceps mexicana* sp. nov., parásita de *Paradirphia* sp., la cual representa el clado hermano de *Cordyceps militaris*, con quien presenta alta similitud morfológica. Se obtuvieron 20 cepas, las cuales produjeron la mayor biomasa en los medios ricos en nutrientes: EMA y SDAY. El sustrato con invasión más rápida fue arroz blanco. El desarrollo de primordios se observó en las cepas C1, C3, C5, C8, C10, C13 y C19 en sustrato de Ab, ATm, ACr, sin embargo, no se desarrollaron estromas. Esta es la primer investigación en México que aborda de manera integral la descripción de una especie de *Cordyceps* y realiza el cultivo experimental *in vitro* y artificial, lo cual indica la importancia de iniciar investigación multidisciplinaria con enfoque nutricional, metabólica y de cultivo experimental para el aprovechamiento futuro de *Cordyceps mexicana*.

Abstract

Cordyceps sensu lato (s.l.) is a paraphyletic group of ascomycete fungi that exhibit associations as insects, spiders, fungi, and grasses pathogens, and some are saprotrophic and/or endophytes. In Asian countries, several species of these ascomycetes are used as functional foods, since the mycelium and stromata produce molecules with biological activity. The species of greatest cultural and economic importance are *Cordyceps militaris* and *Ophiocordyceps sinensis*, whose sustainable use is mainly through its cultivation. In Mexico, 30 species have been recorded. *Cordyceps militaris* has the largest geographical distribution and the largest number of records, however, its nutritional and medicinal potential of collected stromata, mycelium or stromata has not been studied by experimental cultivation. In Desierto del Carmen, State of Mexico, a high diversity of these fungi has been recorded, of which *Cordyceps* sp. affin *militaris* is highly abundant, however its identification has been based on traditional taxonomy. Therefore, the objectives of this research were: to determine the biology and phylogenetic relationships of this species; and determine the strains and nutritional conditions in experimental culture (*in vitro* and artificial) that influence biomass production and stromal development. For this, collections were conducted from September to November 2018 and 2019 in Desierto del Carmen, Tenancingo, State of Mexico. The determination of the species was performed using integral taxonomy: morphological characterization, host identification and phylogenetic analysis of maximum likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI). Five loci were amplified: ITS, 28S, RPB1, RPB2 and TEF. Isolates of sexual spores were made from 20 different specimens. Strains were obtained, characterized, and selected for experimental cultivation. The strains that produced the highest biomass on liquid PD medium (potato dextrose) were selected. Biomass production was evaluated in different culture media: Agar agar (AA), Rice Agar (AAr), Wheat Agar (AT), Potato dextrose agar (PDA), Malt extract agar (EMA), Potato dextrose yeast agar (SDAY), in dark conditions at 25°C for 45 to 60 days. Subsequently, crosses between strains were performed and the same time each strain was cultivated in rice substrate to select those crosses or strains that were viable to fruiting. Finally, fruiting bioassays were performed on the selected strains (strains that produced the highest biomass and developed primordia in substrate). Fruiting bioassays were carried out on different substrates: white rice (Ab), brown rice (Ai), popcorn (Mp), rice with *Comadia redtenbacheri* larvae (ACr) and rice with *Tenebrio molitor* larvae (ATm). As results, the description of a new species was obtained: *Cordyceps mexicana* sp. nov., parasite of *Paradirphia* sp., which represents the sister clade of

Cordyceps militaris, with whom it presents high morphological similarity. Twenty strains were obtained, which produced the highest biomass on EMA and SDAY media. The substrate with the fastest invasion was white rice. The development of primordia was observed in strains C1, C3, C5, C8, C10, C13 and C19 on Ab, ATm, ACr, substrate, but no stromata developed. This is the first research in Mexico that approach comprehensively the description of *Cordyceps* species and performs experimental *in vitro* and artificial cultivation, which indicates the importance of initiating multidisciplinary research with a nutritional, metabolic and experimental cultivation approach for the use future of *Cordyceps mexicana*.

Agradecimientos

A mi comité tutorial

Agradezco a la Dra. Cristina Burrola Aguilar, Dra. María Elena Estrada Zúñiga y Dr. Roberto Garibay Orijel, por su tiempo, por compartir sus conocimientos, por su acompañamiento en mi trayectoria académica, por su solidaridad y respeto en todo momento.

A las instituciones

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado durante mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Recursos Bióticos, en especial a la Dra. Yolanda Arana Gabriel, Dra. Griselda Chávez Aguilar y Biól. María Raziel Hernández Azotea por el apoyo profesional, lo cual permitió siempre mejorar este proyecto.

Al Dr. Roberto Garibay Orijel, responsable del Laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por aceptarme en el curso de Biología Molecular de Hongos y posteriormente aceptarme para realizar una estancia académica, la cual permitió realizar los análisis moleculares técnicos e informáticos. También agradezco al Dr. Andrés Argüelles Moyao y Dra. Olivia Ayala Vásquez, quienes me brindaron su apoyo profesional y compartieron experiencia en los procedimientos de análisis filogenéticos.

A mis profesores

A mis profesores de posgrado, especialmente a la Dra. Marlín Pérez Suárez y al Dr. Ángel Rolando Endara Agramont, quienes siempre me aportaron críticas constructivas que permitieron fortalecer cada etapa de este proyecto.

A mi familia

A mi hijo Ian, aunque él lo desconoce, es uno de mis mayores impulsores.

A mi mamá por su cariño, motivación, regaños y apoyo incondicional.

A mi papá (*qepd*), por sus valores, enseñanzas y fortaleza enseñada. Por abrazarme y acompañarme siempre.

A Juan Alberto por su acompañamiento y apoyo en mi caminar.

A mis hermanos y cuñadas por su apoyo y cariño.



Universidad Autónoma del Estado de México

Formato 1

Formato liberación de tesis

Toluca, México a 21 de marzo de 2022

**COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
PRESENTE**

Por medio de la presente me dirijo a Usted, para hacer de su conocimiento que la tesis: "Cultivo experimental de Cordyceps (Ascomycota: Cordycipitaceae) distribuido en el Parque Nacional Desierto del Carmen, Estado de México, como estrategia para su aprovechamiento" que presenta la C. Lorena López Rodríguez egresada del Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, de la Facultad de Ciencias, No. matrícula 0926207, ha sido revisada y se ha comprobado que la información y datos contenidos como originales y verdaderos, no copiados de ningún otro trabajo ya existente con excepción de los aportes que las propias fuentes bibliográficas han arrojado y que se encuentran debidamente registradas en la presente y que a nuestro juicio cumple con todos los requisitos metodológicos y de contenido, para que pueda ser sometida a examen de grado. Sin otro particular, envío un cordial saludo

ATENTAMENTE

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2022, Celebración de los 195 Años de la Apertura de las Clases en el Instituto Literario"

Dra. Cristina Burrola Aguilar
Directora de tesis

Dr. Roberto Garibay Orijel
Tutor adjunto

Dra. María Elena Estrada Zúñiga
Tutora adjunta

Contenido

MARCO TEÓRICO	1
Introducción general	1
Revisión de literatura	4
<i>Cordyceps sensu lato</i> y sus hospederos	4
Sistemática de <i>Cordyceps</i> s.l.....	4
Cordycipitaceae: Familia más compleja del Orden Hypocreales	7
Ciclo de vida.....	9
Importancia medicinal	10
Principales metabolitos extraídos	11
Cultivo <i>in vitro</i> y artificial.....	14
Aprovechamiento de <i>Cordyceps</i> en países Asiáticos	16
Justificación	18
Hipótesis	20
Objetivos	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos.....	21
Material y método	22
Resultados	23
Capítulo 1. Artículo de divulgación: ¡Hongos que comen insectos!... ¿Por qué consumirlos?	23
Resumen	24
Los hongos parásitos	25
Y de estos hongos llamados <i>Cordyceps</i> ¿Cuántos existen en el mundo y quiénes son sus víctimas?.....	25
¿Por qué son importantes estos hongos?	27
¿Estos hongos se pueden comer como las setas y los champiñones?.....	28
¿Cuáles son las propiedades medicinales que le dan valor a estos hongos?.....	29
Perspectivas del estudio de estos interesantes hongos.....	30
Conclusión.....	30
Lecturas recomendadas	31
Referencias específicas	31

Capítulo 2. Artículo de revisión: Estado actual del conocimiento de <i>Cordyceps sensu lato</i> en México	32
Abstract	33
Resumen	34
Introduction	35
Material and Methods	36
Results and Discussion	37
Conclusions	48
Acknowledgements	49
References	49
Capítulo 3. Artículo de investigación: <i>Cordyceps mexicana</i> sp. nov., parasita de polillas <i>Paradirphia</i> sp.; una nueva especie hermana del complejo <i>Cordyceps militaris</i>, distribuida en bosques mixtos de <i>Quercus-Pinus</i> en el Centro de México	60
Abstract	61
Introduction	62
Materials and methods	63
Results	71
Taxonomy	71
Discussion	80
Conclusions	83
Acknowledgments	84
Literature cited	84
Supplementary material	91
Capítulo 4. Artículo de investigación: Caracterización de crecimiento micelial y producción de biomasa en cultivo <i>in vitro</i> y artificial de <i>Cordyceps mexicana</i>	92
Introducción	93
Material y métodos	95
Resultados y Discusiones	98
Conclusiones	107
Referencias	109
Conclusión general	113
Perspectivas	115
Referencias bibliográficas	116

Lista de figuras

▪ MARCO TEÓRICO

FIGURA 1. Tipos de ascosporas desarrolladas en especies del complejo *Cordyceps* s.l.

FIGURA 2. Tipos de arreglos conidiales observados en *Cordyceps* s.l. A. tipo-*Acremonium*, B. tipo-*Evlachovaea*, C. tipo-*Isaria*, D. tipo-*Lecanicillium*, E. tipo-*Mariannaea*. Imagen obtenida de Mongkolsamrit et al. (2020).

FIGURA 3. Ciclo de vida pleomórfico de *Cordyceps militaris*.

FIGURA 4. Estructura química de la cordicepina y adenosina. Tomado de Tuli et al. (2014).

FIGURA 5. Esquema que representa la introducción de cordicepina, lo cual inhibe la transcripción. Tomado de Tuli et al. (2014).

FIGURA 6. Diagrama de la metodología general llevada a cabo en esta investigación.

▪ CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Ejemplo de *Cordyceps* sp. parasitando una pupa de palomilla. Colectado en Tenancingo, Estado de México. Fotografía de Lorena López Rodríguez, 2018.

FIGURA 2. Ejemplo de *Ophiocordyceps* sp. parasitando a un grillo. Colectado en Tenancingo, Estado de México. Fotografía de Lorena López Rodríguez, 2018.

▪ CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Illustration of a “rare animal-plant” made by Rio de la Loza in 1864. A. Larva-nymph, the branches that emerge from the head have a rounded termination; B. Ramifications ending in a cauliflower formation, emerging from the posterior part of the thorax; C. Dissected lateral view of a larva-nymph; D. Serrated leg of the insect used to excavate the soil.

FIGURA 2. *Cordyceps* s.l. studies in Mexico timeline.

FIGURA 3. Cordycipitaceae geographic distribution in Mexico.

FIGURA 4. Ophiocordycipitaceae geographic distribution in Mexico.

▪ CAPÍTULO 3

FIGURA 1. Phylogenetic relationships of Cordycipitaceae inferred from Maximum Likelihood and Bayesian Analyses. Analysis were performed with a concatenated alignment of the ITS, 28S, RPB1, RPB2 and TEF loci. *Purpureocillium lilacinum* was used as the outgroup. Numbers in the branches indicate the Bayesian probability (PP) and the Bootstrap support (ML). The yellow shaded part highlights the clade *Cordyceps mexicana* sp. nov. The yellow branches highlight the clade *Cordyceps sensu stricto*.

FIGURA 2. (a) *Cordyceps mexicana* sp. nov. emerging from the pupae of *Paradirphia* sp. (Lepidoptera: Saturniidae), Bar=20 mm, (b) subovoid perithecia, Bar=200 μ m, (c) conidiophore, Bar=10 μ m (d) release of irregular sub-fusiform structures through the ostiole, Bar=10 μ m, (e) conidiospores, Bar=15 μ m, (f) segment of asci with disarticulated ascospores in part-spores, Bar=20 μ m, (g) subglobose forked cap, Bar=20 μ m, (h) colony growth on Sabouraud dextrose agar medium (SDAY), Bar=5 μ m, (i) immature asci (above), mature asci (below) in which filiform ascospores in part-spores are observed, Bar=20 μ m.

FIGURA 3. *Paradirphia* sp. (Lepidoptera; Saturniidae; Hemileucinae), host of *Cordyceps mexicana*. (a) pupae, Bar=10 mm (b) male with bipectinate antennae, Bar=30 mm, (c) female with filiform antennae, Bar=20 mm.

FIGURA 4. Life cycle and hypothesis of *Cordyceps mexicana* infection.

• CAPÍTULO 4

FIGURA. 1. Cepas de *Cordyceps mexicana* en medio PDA. A. Se observan tonalidades amarillas y anillos de crecimiento. B. Se observa una coloración blanquecina.

FIGURA. 2. Cepa 2 y algunas de sus cruza. En ninguna cruza se observo desarrollo de primordios.

FIGURA. 3. Desarrollo de primordios en *Cordyceps mexicana* en sustrato de arroz.

FIGURA. 4. Cepas de *Cordyceps mexicana* en diferentes medios de cultivo.

FIGURA. 5. Base de las cepas de *Cordyceps mexicana* en diferentes medios de cultivo, donde se observa la coloración amarilla predominante en medio SDAY.

Lista de tablas

▪ MARCO TEÓRICO

Tabla 1. Géneros de la Familia Cordycipitaceae y hospederos.

Tabla 2. Variables que influyen en el crecimiento, pigmentación, producción de biomasa y concentración de cordicepina en cultivo de *Cordyceps militaris*.

▪ CAPÍTULO 2

Table 1. Cordycipitaceae Species recorded in Mexico.

Table 2. Ophiocordycipitaceae Species recorded in Mexico.

▪ CAPÍTULO 3

Table 1. DNA sequences used in the phylogenetic analysis. Species, host, distribution, collection name and Genbank accessions of the different loci are indicated.

Table 2. Morphological comparison of similar species and *Cordyceps militaris* complex.

Table 3. *Cordyceps militaris* complex hosts and distribution.

• CAPÍTULO 4

Tabla 1. Características de sustratos evaluados en bioensayos de fructificación.

Tabla 2. Características de las cepas de *Cordyceps mexicana* en medio PDA.

Tabla 3. Formación de primordios en *Cordyceps mexicana* en medio de arroz blanco.

Tabla 4. Producción de biomasa seca en medio PDA de cepas que desarrollan primordios.

Tabla 5. Producción de biomasa en diferentes medios de cultivo.

Tabla 6. Tiempo de invasión y desarrollo de primordios en bioensayos de fructificación de *Cordyceps mexicana*.

MARCO TEÓRICO

Introducción general

Los hongos son organismos muy interesantes que forman un Reino llamado Fungi, que incluye eucariotas heterótrofos que se conocen como mohos, hongos, líquenes y levaduras, están presentes en diferentes hábitats incluyendo el suelo, agua, organismos y presentan historias de vida notablemente diversas (Stajich *et al.*, 2009; Blackwell 2011). Actualmente tienen funciones esenciales en la biosfera, la industria humana, la medicina y la investigación (Stajich *et al.*, 2009).

A través del tiempo se han realizado diversas estimaciones de la cantidad de especies de hongos que existen, desde 1.5 millones considerando una proporción de 6:1 entre plantas y hongos (Hawksworth 1991), 5.1 millones considerando métodos moleculares (Blackwell 2011) hasta 10 millones (Hawksworth & Lucking 2017). La última estimación consideró las tasas con la que se han publicado nuevas especies desde 1750, las especies crípticas agrupadas en complejos de morfo especies o que presentan alta similitud morfológica, las zonas “hot spot” de los trópicos que albergan una gran diversidad, pero que contienen áreas no exploradas, la proporción hongos-plantas 9.8:1, material no revisado que se encuentra en colecciones e información genética de muestras ambientales, por lo que sugiere existen de 2.2 a 3.8 millones de especies (Hawksworth & Lucking 2017). Hasta 2018 se habían registrado 144,000 especies, lo cual indica que conocemos el 3.8%, considerando una diversidad de 3.8 millones (Hawksworth & Lucking 2017; Willis *et al.*, 2018). Estas cifras son uno de los indicadores de la necesidad e importancia de realizar investigaciones de diversidad en hongos.

Dentro del Reino Fungi se encuentra el Phylum Ascomycota, que alberga el 64% de los hongos conocidos (Sugiyana *et al.*, 2006) e incluye especies con diferentes formas de vida, como saprobios, mutualistas que forman líquenes con algas o ectomicorrizas con plantas leñosas y parásitos (Syajich *et al.*, 2009). Dentro de este Phylum se encuentra el grupo *Cordyceps sensu lato* (s.l.), que corresponde a tres familias monofiléticas: Cordycipitaceae, Clavicipitaceae y Ophiocordycipitaceae.

Cordyceps s.l. incluye hongos parásitos de artrópodos, principalmente (Sung *et al.*, 2007a; 2007b), comprende más de 1300 especies (Wang *et al.*, 2020), muchas de las cuales presentan

complejos crípticos debido a su similitud morfológica, asociación con el mismo grupo taxonómico de hospederos y a su diferente morfología en estado sexual y asexual, por lo tanto el estudio de estos hongos debe incluir su asociación con hospedero, descripción morfológica, crecimiento asexual y análisis filogenéticos (Araújo *et al.*, 2018; Mongkolsamrit *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021).

La importancia biológica de *Cordyceps s.l.* es ecológica, ya que controlan de manera natural la densidad poblacional de sus hospederos. Sin embargo, algunas especies como *Ophiocordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris*, *C. pruinosa* y *Tolypocladium ophioglossoides* son ampliamente apreciadas en la medicina tradicional asiática (Ng y Wang, 2005) como alimentos funcionales (López-Rodríguez & Burrola Aguilar 2019), los cuales son alimentos que afectan de forma positiva una o más funciones del organismo, no importando el contenido nutrimental, por lo que su consumo promueve la salud y/o reduce el riesgo de contraer alguna enfermedad, específicamente cáncer y trastornos cardiovasculares (Arai 2002; Trigos & Suárez-Medellín 2010).

Ophiocordyceps sinensis es una de las especies más valorada y ha sido comercializada hasta en 60,000 US/kg (Lei *et al.*, 2015). Esta alta apreciación económica es consecuencia de una larga historia cultural de los pobladores del Tíbet (Shrestha *et al.*, 2011), que a su vez está directamente relacionadas con las propiedades medicinales atribuidas, entre las que destacan propiedades afrodisiacas, anti-inflamatorias, anti-oxidantes, anti-microbianas, inmunoestimulantes, anti-tumorales, anti-metástasis, anti-virales, hipolipemiantes, hipoglucémicas, entre otras (Patel & Ingalhalli 2013; Mehra *et al.*, 2017). Sin embargo, esta alta apreciación ha tenido consecuencias negativas en la abundancia de *Ophiocordyceps sinensis* en el Himalaya (Shrestha *et al.*, 2011) y actualmente se encuentra como especie vulnerable por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza por la IUCN (International Union for Conservation of Nature) (Yang 2020). Por lo tanto, se ha implementado el cultivo *in vitro* y artificial de diferentes especies de *Cordyceps s.l.* como una forma de aprovechamiento sustentable (Qin *et al.*, 2018).

En México, los estudios del grupo *Cordyceps s.l.* han sido realizados con lapsos muy amplios, dirigidos al registro de presencia de especies en diferentes localidades y estados del país (Pérez-Silva 1977; 1978; Pérez-Silva *et al.*, 1996; Rubio-Bustos *et al.*, 1996; Pérez-Villamares *et al.*, 2017), su uso como control biológico de insectos plaga que afectan cultivos de importancia comercial (Pérez-González *et al.*, 2015) y de vectores que transmiten enfermedades (Vázquez-Martínez *et al.*, 2017). El uso comestible se ha registrado para dos especies hipogeas,

Tolypocladium capitatum y *T. ophioglossoides*, consumidas en rituales de los nahuas del Centro de México (Guzmán, 2008) y de una especie afín a *Isaria cicadae* que consumían los aztecas (Pérez-Silva 1979). El cultivo *in vitro* sólo se ha realizado para una especie de *Cordyceps*, la cual produce cordicepina, un metabolito con propiedades medicinales (López-Rodríguez 2017). Sin embargo, el conocimiento filogenético, las condiciones óptimas del cultivo *in vitro*, cultivo artificial, propiedades nutricionales, medicinales y farmacológicas de especies silvestres de México son inexploradas y en algunos casos nacentes.

Actualmente en México, *Cordyceps militaris* es la especie con mayor distribución geográfica, mayor número de registros y recolectas, ha sido documentada en diferentes tipos de vegetación, parasitando pupas y larvas de diferentes familias de lepidópteros, así como en adultos de coleópteros (Pérez-Silva, 1977, 1978; Rubio-Bustos *et al.*, 1999; Guzmán *et al.*, 2001; Pérez-Villamares *et al.*, 2017); recientemente se reportó en asociación con *Paradirphia lasiocampina* (Lepidoptera) para bosques de Encino-Pino del Estado de México (Pérez-Villamares *et al.*, 2017). Sin embargo, esta especie presenta características distintivas macroscópicas, microscópicas, de conidiación, asociación con hospedero y distribución geográfica que nos hicieron preguntar su verdadera identidad. Por lo tanto, los objetivos de esta investigación fueron dilucidar la posición filogenética de esta especie y analizar algunos aspectos de su biología, tal como su morfología, hospedero, conidiación, ciclo de vida y distribución geográfica y posteriormente, evaluar los factores que optimizan su cultivo *in vitro* y artificial, para su consecuente aprovechamiento.

Esta tesis se organiza por Capítulos. El Capítulo 1 es un artículo de divulgación enviado a la Revista Ciencia que permite un acercamiento amigable para conocer la biología e importancia comestible y medicinal de *Cordyceps* s.l., dirigido a público no especializado en hongos. El Capítulo 2 es un artículo de revisión enviado a la Revista Mexicana de Micología, Scientia Fungorum, donde se plasma una revisión bibliográfica del estado del conocimiento de *Cordyceps* s.l. en México, donde se aborda la historia, diversidad, asociación con hospederos, usos y distribución geográfica. El Capítulo 3 es un artículo de investigación enviado a la Revista Mycologia donde se describe una nueva especie, *Cordyceps mexicana* sp. nov., el cual incluye la morfología, hospedero, ciclo de vida y relaciones filogenéticas. El Capítulo 4 es un artículo que será enviado a una revista especializada en el tema y aborda el cultivo *in vitro* y artificial de *Cordyceps mexicana*.

Revisión de literatura

Cordyceps sensu lato y sus hospederos

Cordyceps sensu lato (s.l.) es un complejo parafilético de ascomicetos con asociaciones saprobias, endófitas y parásiticas con insectos, arácnidos, hongos, nemátodos y rotíferos (Sung *et al.*, 2007a, 2007b; Shrestha *et al.*, 2016, 2019; Gazis *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2021).

El 60% de las especies se han registrado en estadios inmaduros de lepidópteros y coleópteros (Shrestha *et al.*, 2016). Los arácnidos son otro grupo ampliamente parasitado, con un registro de 86 especies de hongos de *Cordyceps* s.l. (Shrestha *et al.*, 2019). También se pueden encontrar en estadios inmaduros o adultos de otros ordenes de insectos como Hymenoptera, Orthoptera, Diptera, Blattodea, Mantodea, Dermaptera, Odonata y Phasmatodea (Shrestha *et al.*, 2016). También parasita a su mismo Reino, trufas que pertenecen a 20 especies del género *Elaphomyces* y pocas especies crecen en rotíferos y nemátodos (Yu *et al.*, 2021).

Esta asociación con diferentes hospederos los hace muy atractivos para investigar su evolución. Se han planteado diferentes hipótesis de acuerdo con análisis filogenéticos, la primera hipótesis menciona que estos hongos presentaron un salto de entomopatógenos a micoparásitos, debido a que las cícadas parasitadas por *Cordyceps* comparten el mismo nicho ecológico que los hongos del grupo *Elaphomyces* (Nikoh & Fukatsu 2000). Posteriormente, utilizando más genes y taxones se encontró que la ecología ancestral fue la asociación con trufas y que ha habido múltiples cambios a patogenicidad con insectos (Gazis *et al.*, 2014). Sin embargo, se realizó el análisis con el genoma completo de dos especies micoparásitas y dos entomopatógenas, por lo que la asociación ancestral fue de entomopatógeno a micopatógeno con salto entre Reino (Quandt *et al.*, 2018), lo cual coincide con Nikoh & Fukatsu (2000).

Sistemática de *Cordyceps* s.l.

Cordyceps s.l. contiene especies que están comprendidas en tres Familias, Clavicipitaceae, Cordycipitaceae y Ophicordycipitaceae (Sung *et al.*, 2007b).

Este grupo pertenece al Phylum Ascomycota, debido a que cuando se reproducen sexualmente forman estructuras especializadas llamadas ascas y ascosporas, a la Clase

Sordariomycetes y al Orden Hypocreales por el desarrollo de estructuras especializadas llamadas peritecios que tienen la función de contener las ascas (Sung *et al.*, 2007a, 2007b). Los peritecios se clasifican en cuatro tipos de acuerdo a su posición en el estroma, superficial, medio inmerso, verticalmente inmerso y oblicuamente inmerso. Sus ascas son cilíndricas con una tapa apical engrosada y presentan tres tipos de ascosporas (FIG 1) (Tian *et al.*, 2010); ascosporas filiformes que se desarticulan en partes de esporas como en *C. militaris* (Sung *et al.*, 2007b) ascosporas que no se desarticulan presentes en *Blackwellomyces cardinalis* y *B. pseudomilitaris* (Sung & Spatafora 2004) y bola-ascosporas presentes en *C. ninchukispora* (Su & Wang 1986).

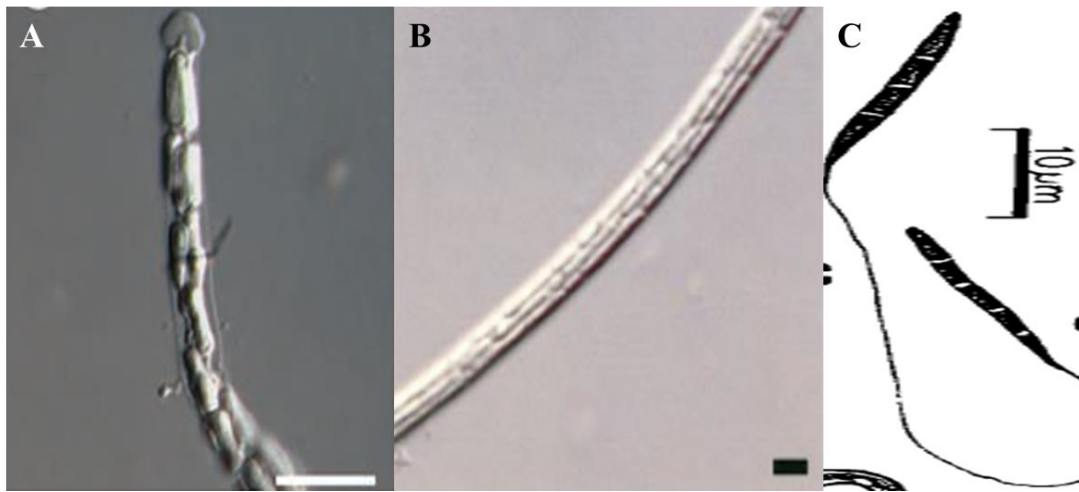


FIG. 1. Tipos de ascosporas desarrolladas en especies del complejo *Cordyceps* s.l. A. Ascosporas filiformes que se desarticulan en partes de esporas, por ejemplo *Ophiocordyceps variabilis*. B. Ascosporas que no se desarticulan, por ejemplo *Blackwellomyces cardinalis*. C. Bola-ascosporas, por ejemplo *Cordyceps ninchukispora*. Escala: 10µm.

La clasificación de las especies anteriormente se basaba en caracteres morfológicos de acuerdo con Masse (1895), Mains (1957, 1958) y Kobayasi (1941, 1982) los cuales consideraban el color del estroma de la parte fértil, la forma de los peritecios, su disposición en el estroma, la forma de ascas y ascosporas y en algunos casos se consideraba el orden al que pertenecía su hospedero.

Posteriormente, debido a la compleja morfología macroscópica y microscópica de las especies se ha modificado su taxonomía, de una Familia, Clavicipitaceae (Kobayasi, 1941, 1982; Mains, 1957, 1958) a tres familias Cordycipitaceae, Ophiocordycipitaceae y Clavicipitaceae, estas familias corresponden a tres grandes linajes monofiléticos, obtenidos con análisis de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana utilizando los locus LSU, SSU, RPB1, RPB2, TEF y mtATP6.

Actualmente, la identificación de especies, prueba de hipótesis evolutivas, especiación, separación de especies crípticas, arreglos de nomenclatura y unión de fases sexuales con asexuales, consideran caracteres genéticos mediante análisis filogenéticos (Sung *et al.*, 2007b; Quandt *et al.*, 2014, 2018; Kepler *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020). A pesar de que la morfología en algunos casos presenta patrones bien diferenciados entre especies, en las especies crípticas es difícil su separación utilizando sólo esta información (Mongkolsamrit *et al.*, 2018, 2020; Chen *et al.*, 2021). Actualmente, la taxonomía de *Cordyceps* s.l. considera la caracterización detallada de la morfología macro y microscópica (Hu *et al.*, 2021); el tipo de arreglo conidial (FIG. 2) (Mongkolsamrit *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021), ya que al parecer es una característica diagnóstica (Mongkolsamrit *et al.*, 2018, 2020) y el hospedero, el cual se define como el nicho ecológico (Sanjuan 2015; Araújo & Hughes 2016).

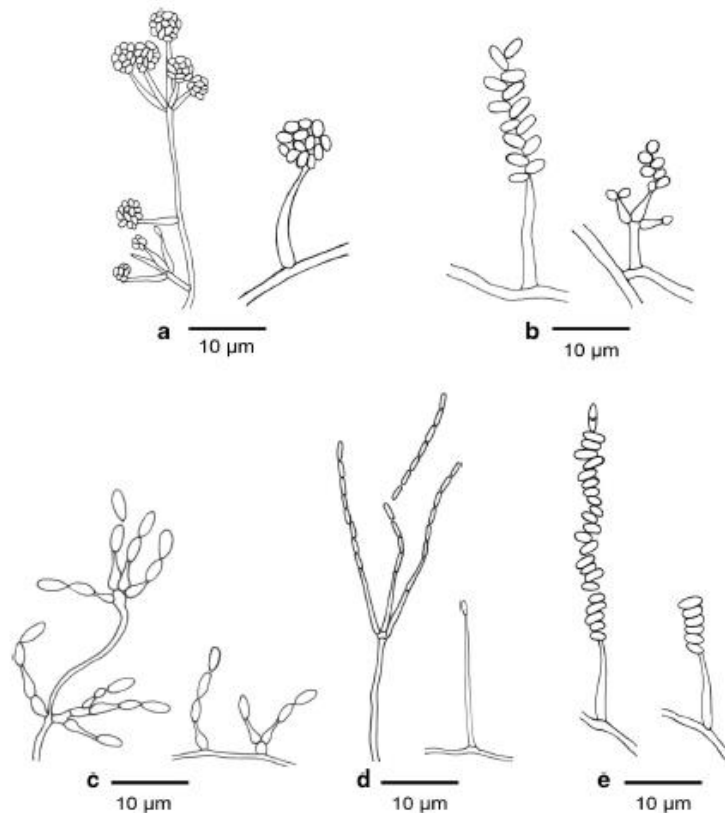


FIG. 2. Tipos de arreglos conidiales observados en *Cordyceps* s.l. A. tipo-*Acremonium*, B. tipo-*Evlachovaea*, C. tipo-*Isaria*, D. tipo-*Lecanicillium*, E. tipo-*Mariannaea*. Imagen obtenida de Mongkolsamrit *et al.* (2020).

Cordyceps s.l. es el grupo más complejo de Hypocreaceae ya que presenta alta variabilidad morfológica, un amplio rango de hospederos y bastantes problemas taxonómicos (Wang *et al.*, 2020). Sin embargo, de acuerdo con múltiples estudios, la sistemática actual es la siguiente:

Familia Cordycipitaceae incluye géneros parásitos de insectos y arácnidos principalmente: *Akanthomyces*, *Ascopolyporus*, *Beauveria*, *Blackwellomyces*, *Cordyceps sensu stricto*, *Engyodontium*, *Hevansia*, *Hyperdermium*, *Gibellula*, *Parengyodontium*, *Simplicillium*, *Torrubiella* (Kepler *et al.*, 2017), *Samsoniella* (Mongkolsamrit *et al.*, 2018), *Flavocillium*, *Liangia* (Wang *et al.*, 2020) y *Pleurodesmospora* (Chen *et al.*, 2021).

Familia Clavicipitaceae, incluye saprobios, endoparásitos y parásitos de pastos, insectos y rotíferos, tal como: *Balansia*, *Claviceps*, *Epichloë*, *Hypocrella*, *Keithmyces*, *Marquandomyces*, *Metapochonia*, *Metarhizium*, *Moelleriella*, *Parametarhizium*, *Papiliomyces*, *Pochonia*, *Purpureomyces*, *Rotiferophthora*, *Samuelsia*, *Sungia* y *Yosiokobayasia* (Sung *et al.*, 2007b; Chaverrí *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2021).

Familia Ophiocordycipitaceae incluye especies saprobias, endófitas, parásitas de insectos, hongos y nemátodos. Incluye los siguientes géneros: *Drechmeria*, *Harposporium*, *Hirsutella*, *Ophiocordyceps*, *Polycephalomyces*, *Purpureocillium* y *Tolypocladium* (Sung *et al.*, 2007b; Gazis *et al.*, 2014; Quandt *et al.*, 2014; Spatafora *et al.*, 2015).

Cordycipitaceae: Familia más compleja del Orden Hypocreales

Cordycipitaceae es la Familia que comparte un ancestro con Hypocreaceae, ancestro en el cual se presentó una desviación de nutrición basada en plantas, a una especializada sobre animales y hongos (Spatafora *et al.*, 2007). Dentro del orden Hypocreales, esta Familia presenta la mayor variabilidad en características morfológicas, parasita un amplio rango de hospederos y presenta especies crípticas (Wang *et al.*, 2020). Adicionalmente, presenta especies con formas asexuales y sexuales que a través del tiempo se registraron con nomenclatura dual, por lo que ha presentado una problemática taxonómica muy compleja que se ha ido resolviendo a través de múltiples estudios filogenéticos (Sung *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 2007a, 2007b; Kepler *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020, 2021; Hu *et al.*, 2021).

La mayoría de los teleomorfos desarrollan estromas carnosos con coloraciones amarillas y naranjas brillantes, aunque algunos también presentan coloraciones pálidas. Pocas especies presentan estípites reducidos o subiculados (Sung *et al.*, 2007b).

La asociación con hospederos es con diferente nivel jerárquico, pasando por orden, familia, género hasta especie (Tabla 1). Las dinámicas evolutivas de los hongos y sus hospederos son usualmente descritas por coevolución o por salto de hospederos (Chen *et al.*, 2020). El salto de hospederos comúnmente se da con nuevos hospederos que son evolutivamente distantes pero que comparten un nicho ecológico similar (Vega *et al.*, 2009; Nikoh & Fukatsu 2000).

Tabla 1. Géneros de la Familia Cordycipitaceae y hospederos.

Género	Hospederos	Referencias
<i>Akanthomyces</i>	Araneae Hemiptera Lepidoptera	Mongkolsamrit <i>et al.</i> (2020), Chen <i>et al.</i> (2021)
<i>Ascopolyporus</i>	Plantae	Mongkolsamrit <i>et al.</i> (2020), Chen <i>et al.</i> (2021)
<i>Beauveria</i>	Blattodea Coleoptera Lepidoptera Orthoptera Phasmatoptera	Mongkolsamrit <i>et al.</i> (2020), Chen <i>et al.</i> (2021)
<i>Blackwellomyces</i>	Coleoptera Lepidoptera	Mongkolsamrit <i>et al.</i> (2020)
<i>Cordyceps</i>	Araneae Diptera Hemiptera Hymenoptera Coleoptera Lepidoptera	Tian <i>et al.</i> (2010), Mongkolsamrit <i>et al.</i> (2020), Chen <i>et al.</i> (2021)
<i>Engyodontium</i>	Araneae	Mongkolsamrit <i>et al.</i> (2020), Chen <i>et al.</i> (2021)
<i>Hevansia</i>	Araneae	Mongkolsamrit <i>et al.</i> (2020), Chen <i>et al.</i> (2021)
<i>Hyperdermium</i>	Hemiptera	Mongkolsamrit <i>et al.</i> (2020), Chen <i>et al.</i> (2021)
<i>Gibellula</i>	Araneae	Mongkolsamrit <i>et al.</i> (2020), Chen <i>et al.</i> (2021)
<i>Lecanicillium</i>	Saprótrofo encontrados en suelo Micoparásito de agaricales	Mongkolsamrit <i>et al.</i> (2020), Chen <i>et al.</i> (2021)
<i>Neotorrubiella</i>	Orthoptera	Mongkolsamrit <i>et al.</i> (2020), Chen <i>et al.</i> (2021)
<i>Parengyodontium</i>	Saprótrofo Oportunista sobre heridas en piel humana	Tsang <i>et al.</i> (2016)
<i>Simplicillium</i>	Saprótrofo Micoparásito	Mongkolsamrit <i>et al.</i> (2020)
<i>Torrubiella</i>	Lepidoptera	Mongkolsamrit <i>et al.</i> (2020)
<i>Samsoniella</i>	Coleoptera Hymenoptera Lepidoptera Fungi	Chen <i>et al.</i> (2020), Chen <i>et al.</i> (2021)
<i>Flavocillium</i>	Lepidoptera	Wang <i>et al.</i> (2020)
<i>Liangia</i>	Crece sobre hongo entomopatógeno	Wang <i>et al.</i> (2020)

Ciclo de vida

El ciclo de vida de hongos entomopatógenos es complejo, sin embargo, de manera general presenta tres fases, infección, parasitismo y saprofitismo (Pal & Misra 2018). La infección ocurre cuando *Cordyceps* spp. infecta al huésped a través de ascosporas, conidiosporas o blastoconidios, las cuales son liberadas al aire por los cuerpos fructíferos y germinan al tener contacto con el insecto, aunque en algunos casos la infección ocurre con la ingesta de alimentos contaminados (Tuli *et al.*, 2013; Baral *et al.*, 2015). La etapa parasitaria ocurre posterior a la infección. En especies parásitas de larvas como *Ophiocordyceps sinensis* y *Cordyceps militaris*, el micelio se nutre del intestino del huésped, posteriormente el hongo invade todo el organismo, se convierte en una masa interna llamada endoesclerocio, dejando intacto el exoesqueleto; por último, la etapa saprofita sucede cuando las condiciones ambientales de temperatura son óptimas, el endoesclerocio germina, se desarrolla el estroma y empieza a liberar las esporas (Tuli *et al.*, 2013; Baral *et al.*, 2015).

El ciclo de vida de muchas especies de *Cordyceps* s.l. es pleomórfico (FIG. 3). En el estado asexual se pueden observar conidiosporas, blastoconidios o clamidosporas; en contraste, el teleomorfo (estado sexual) presenta reproducción por heterotalismo bipolar y en algunas ocasiones homotalismo (Shrestha *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2012).

El tiempo de invasión de las especies de *Cordyceps* s.l. varía entre las especies, por ejemplo, *Ophiocordyceps unilateralis* infecta hormigas de 3 a 6 y 7 días después de la muerte de su hospedero emerge el estroma (Mongkolsamrit *et al.*, 2012). En contraste, *Ophiocordyceps sinensis* presenta un ciclo de vida inusual de varios meses, la infección inicia en larvas de la familia Hepialidae durante otoño, después en invierno desarrolla un primordio muy pequeño y finalmente en primavera desarrolla completamente el estroma (Zhang *et al.*, 2012).

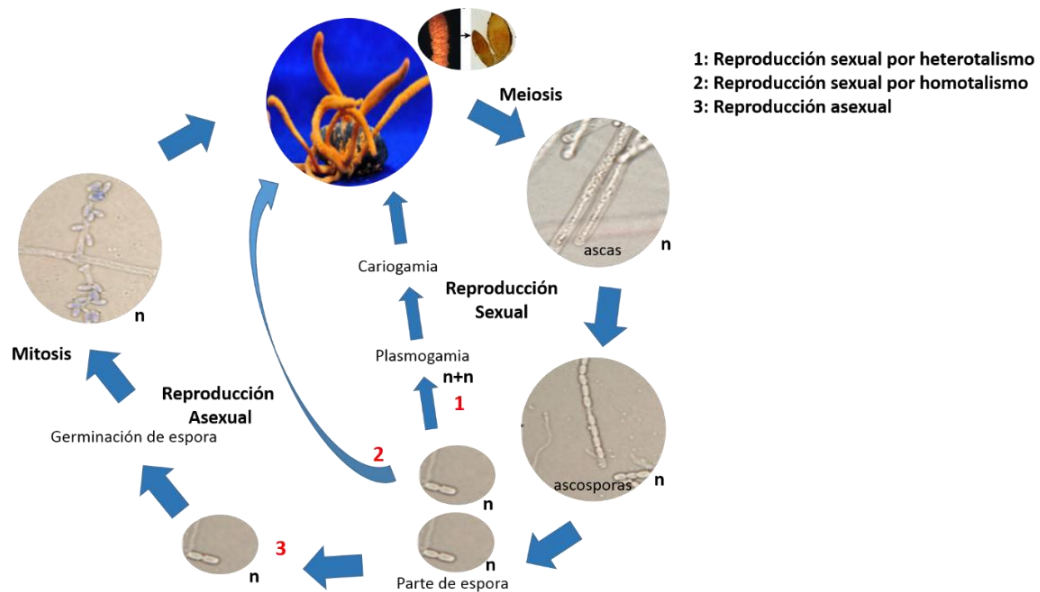


FIG. 3. Ciclo de vida pleomórfico de *Cordyceps militaris*.

Las condiciones ambientales también influyen en el tiempo de infección y virulencia, tal como la humedad relativa, temperatura, luz, aire, nutrientes y estado del hospedero (Padmini & Padmaja 2010), por ejemplo, en *Beauveria bassiana* en humedad de 90-100% y una temperatura de 30°C causan la máxima mortalidad de larvas de mosca (Mishra *et al.*, 2015). En cultivo *in vitro* de *Cordyceps militaris* es necesaria luz de 500 a 1000 lux y humedad relativa de 70-90% para inducir la fructificación (Shrestha *et al.*, 2012).

Importancia medicinal

Diferentes especies de *Cordyceps* son muy apreciadas y usadas en la medicina tradicional como alimentos funcionales o nutraceuticos debido a las propiedades afrodisiacas, anti-cancerígenas, inmunomoduladoras, anti-oxidantes, anti-microbianas, anti-tumorales, anti-metástasis, hipolipemiantes e hipoglucémicas, principalmente, las cuales le confieren importantes aplicaciones farmacológicas (Ng & Wang 2005; Patel & Ingalhalli, 2013; Kuo *et al.*, 2015; Mehra *et al.*, 2017). Algunas especies usadas tradicionalmente para tratar enfermedades o afecciones cardiovasculares, renales, nerviosas, gastrointestinales, hepáticas, inmunológicas, respiratorias y sexuales son *C. militaris*, *C. pruinosa*, *Isaria cicadae*, *Tolypocladium ophioglossoides* y *Ophiocordyceps sinensis* (Rusell & Paterson 2008; Xu *et al.*, 2016).

Ophiocordyceps sinensis es la especie más apreciada de Asia, es endémica del Himalaya (Winkler 2009) y se encuentra en ecosistemas alpinos de Bhutan, China, Nepal, Tibet e India (Zhang *et al.*, 2016). Su nombre común en China es “DongChongXiaCao”, en el Tibet “YartsaGumbu” que significa “gusano de invierno-hierba de verano” y en India “Keera Jhar” o “Keera ghas” que significa “insecto hierba” (Sharma 2004; Winkler 2009). Actualmente es la especie de hongo más cara en el mundo y esta denominada como el Hongo Nacional de China (Zhang *et al.*, 2012) en categoría vulnerable ya que los especímenes han sido sobreexplotados, debido a la gran demanda en el mercado, su limitada distribución y dificultad de cultivo (Yang 2020).

Cordyceps militaris es conocido como “hongo caterpillar naranja”, presenta una distribución cosmopolita y parasita un amplio rango de hospederos, tiene propiedades similares a *Ophiocordyceps sinensis* y ha sido fácilmente cultivado, por lo que se considera un buen sustituto de *O. sinensis* (Shrestha *et al.*, 2012).

En México, a pesar de que no se han realizado trabajos etnomicológicos del género *Cordyceps*, Guzmán (2008) menciona que los nahuas utilizaban a *Tolypocladium capitatum* y *T. ophioglossoides*, con fines medicinales y alucinógenos, que actualmente pertenecen al género *Tolypocladium*.

Principales metabolitos extraídos

Estos hongos producen una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios como proteínas, péptidos, aminoácidos, poliaminas, nucleósidos, polisacáridos, esteroides, esteroides y ácidos grasos que han sido asociados a diferentes propiedades farmacológicas (Patel & Ingahlalli 2013; Mehra *et al.*, 2017).

Un metabolito que ha recibido mucha atención es la cordicepina (3'-deoxyadenosina) (FIG. 4), debido a su amplio espectro en actividades biológicas (Tuli *et al.*, 2014). Este metabolito es un nucleósido análogo a la adenosina, que no presenta un grupo –OH en el carbono 3 de la pentosa (Xiang *et al.*, 2014). La cordicepina fue extraída por primera vez por Cunningham *et al.* (1950) y puede ser sintetizada químicamente, sin embargo, su rendimiento es bajo y el proceso es complicado, alternamente su extracción de estromas colectados es muy costosa (Guo *et al.*, 1998),

por lo tanto, el micelio se cultiva en medios sólidos o líquidos para extraerla con menor costo económico (Hung *et al.*, 2009).

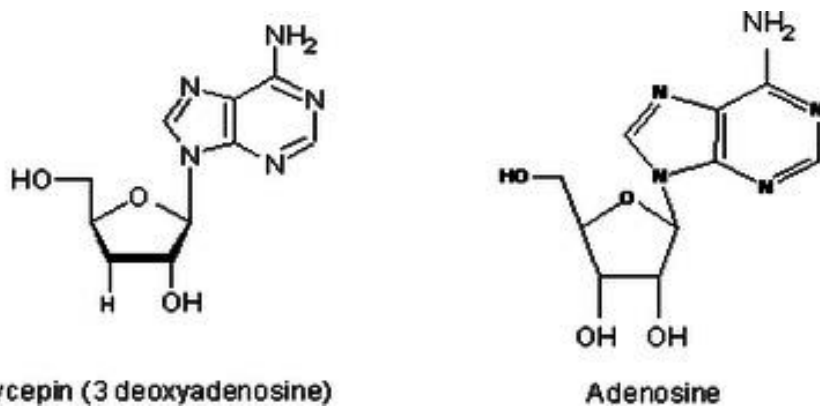


FIG. 4. Estructura química de la cordicepina y adenosina. Tomado de Tuli *et al.* (2014).

La cordicepina presenta propiedades anticancerígenas e inmunomodulatorias (Takahasi *et al.*, 2012). Este nucleósido inhibe la actividad de enzimas pirofosfocinasas y amidotransferasas que participan en la síntesis *de novo* de purinas (Wong *et al.*, 2010), interfiere en la replicación de DNA de células tumorosas (Holliday & Cleaver 2008), interviene en la síntesis de RNA/DNA (FIG. 5) (Holbein *et al.*, 2009) y se ha determinado su actividad anti proliferativa de células cancerosas (Tuli *et al.*, 2014).

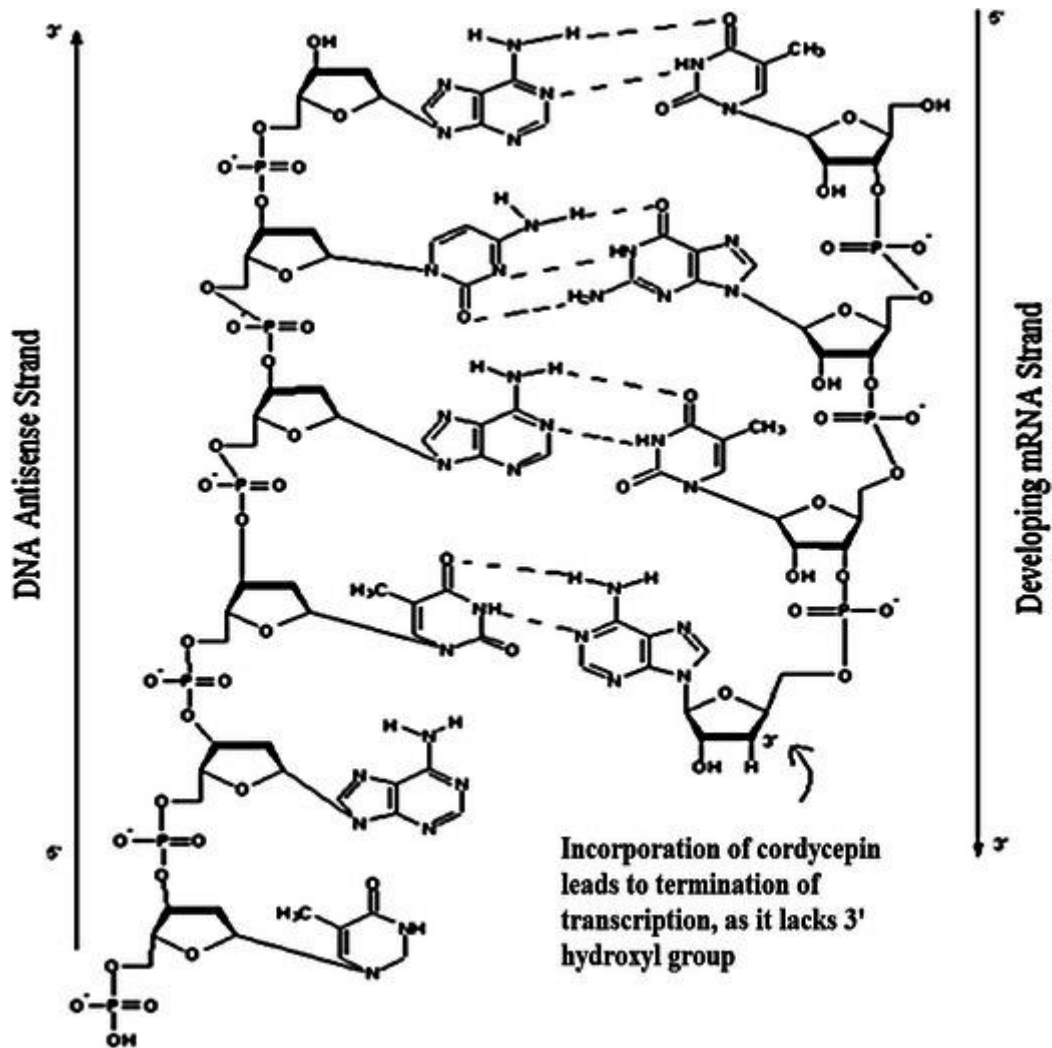


FIG. 5. Esquema que representa la inhibición de la transcripción, por incorporación de cordicepina en la hebra de RNA. Tomado de Tuli *et al.* (2014).

Existen diferentes enzimas involucradas en la biosíntesis de cordicepina, tal como la adenilato cinasa, 5' nucleotidasa y ribonucleotido reductasa (Lennon 1976). Los genes de estas enzimas presentan un alto número de copias en especies de importancia medicinal como *Cordyceps militaris* y *Ophiocordyceps sinensis*. En especies sin importancia comestible-medicinal como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* presentan un menor número de copias de estas enzimas y una copia de la enzima inhibidor ribonucleótido reductasa (RNR in), la cual inhibe la síntesis de cordicepina (Kuo *et al.*, 2015).

La cordicepina presenta múltiples propiedades medicinales, sin embargo, su función en el proceso de infección ha sido poco estudiada. En infecciones inducidas en laboratorio, *Cordyceps militaris* causa la muerte de larvas y posterior a 96-120 hrs. se activan genes implicados en la

biosíntesis de cordicepina en cuerpos grasos y cutícula; al mismo tiempo modifica la expresión de genes de la larva, tal como disminución de expresión de genes que codifican proteínas cuticulares y de genes inhibidores de serina proteasa, adicionalmente, aumenta la expresión de genes que codifican proteínas cuticulares, lo cual permite el crecimiento del hongo dentro del huésped (Kato *et al.*, 2021).

El tipo y concentración de metabolitos varía de acuerdo con diferentes factores como son especie (Kuo *et al.*, 2015), medio de cultivo, pH, temperatura (Adnan *et al.*, 2017), cantidad de luz (Dong *et al.*, 2013), fase de crecimiento de los estromas (Oh *et al.*, 2019), concentración de oxígeno (Suparmin *et al.*, 2017, 2019) y procedencia de estromas (hábitat natural o cultivados artificialmente) (Zhou *et al.*, 2019). En *Cordyceps militaris* se obtiene una alta producción de biomasa y cordicepina con una longitud de onda de 1/3: 450-460 + 2/3: 620-630 nm (Dong *et al.*, 2013). Los medios de cultivo adicionados con fuentes de nitrógeno, pH de 5.5 y temperatura de 25°C optimizan la producción de cordicepina (Adnan *et al.*, 2017). La fase de senescencia produce la mayor cantidad de cordicepina y manitol (Oh *et al.*, 2019). Las condiciones de hipoxia permiten mayor producción de cordicepina (Suparmin *et al.*, 2017, 2019). Adicionalmente, se ha encontrado que existen metabolitos propios de especie y su producción no depende del sustrato (Chiriví-Salomón *et al.*, 2017).

Cultivo *in vitro* y artificial

El cultivo artificial de *Cordyceps militaris* inició con Bary (1867). Posteriormente el cultivo *in vitro* comenzó con estudios de control biológico de plagas, donde se describió la morfología de conidiosporas y blastoconidios (Carilli & Pacioni 1977).

La mayoría de los estudios de cultivo en *Cordyceps s.l.* se han realizado en *C. militaris*, sin embargo, la investigación de otras especies ha aumentado debido a su potencial medicinal y farmacológico, tal como *Ophiocordyceps sinensis* (Holliday 2017), *O. unilateralis* (Wongsa *et al.*, 2005), *Cordyceps kyuusyuensis* (Zhao *et al.*, 2019), *C. pruinosa* (Meng *et al.*, 2014), *C. nidus* (Chiriví-Salomón *et al.*, 2017), *Blackwellomyces cardinalis* (Sung *et al.*, 2010), entre otras.

En el cultivo de *C. militaris* se optimiza la producción de biomasa y metabolitos, por lo que se han evaluado factores químicos y físicos como fuentes de carbono, nitrógeno, factores de crecimiento, minerales, temperatura, pH, agitación, luz y cepas, en cultivo sólido (Kumar *et al.*,

2006; Shrestha *et al.*, 2006), líquido (Hung *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2017) y en sustrato (Sung *et al.*, 2006; Shrestha *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2019; Raethong *et al.*, 2020) (Tabla 2).

Hasta el momento se ha encontrado que los cuerpos fructíferos de *C. militaris* producen mayor cantidad de cordicepina y adenosina cuando se cultivan en medios de arroz a comparación de medios de crisálidas de gusano de seda o medio de trigo. Al mismo tiempo se ha observado que los cuerpos fructíferos cultivados producen mayor cantidad de cordicepina a comparación de *Ophiocordyceps sinensis* silvestre; y el contenido del micelio de *C. militaris* es similar a los cuerpos fructíferos de *O. sinensis* (Huang *et al.*, 2009). También se ha determinado que se obtienen diferentes tipos de polisacáridos de acuerdo con el medio de cultivo empleado (Wu *et al.*, 2012). El maíz palomero es de los últimos sustratos evaluados, en el cual se encontró un rápido crecimiento y una producción alta de cordicepina (Raethong *et al.*, 2020).

Otros factores que influyen en obtener una óptima fructificación son la humedad relativa del 90%, intensidad de luz de 500 a 1000 lux., así como la selección de cepas con la mayor velocidad de crecimiento y producción de biomasa (Tabla 2) (Sung *et al.*, 2006; Shrestha *et al.*, 2012) y la cruce de cepas ya que se reproducen por heterotalismo bipolar (Shrestha *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2011).

Tabla 2. Variables que influyen en el crecimiento, pigmentación, producción de biomasa y concentración de cordicepina en cultivo de *Cordyceps militaris*.

Variables	Cultivo <i>in vitro</i> sólido o superficial	Cultivo artificial
Medios de cultivo	-Mayor pigmentación amarilla en medios ricos de nitrógeno como SDAY, SMAY, CZYA (Shrestha <i>et al.</i> , 2006). -Mayor crecimiento en medio agar papa dextrosa levadura (Kumar <i>et al.</i> , 2006) -Relacion óptima para crecimiento micelial de 12.7:1 (C:N) (Raethong <i>et al.</i> , 2020)	-Desarrollo de estromas en medio de arroz integral adicionado con pupas de gusano de seda (Sung <i>et al.</i> , 2006; Shrestha <i>et al.</i> , 2012). -Mayor producción de cordicepina en arroz integral (Adnan <i>et al.</i> , 2017). -Otros medios utilizados son trigo, avena (Adnan <i>et al.</i> , 2017), pupas de lepidópteros, larvas de coleopteros (Sato <i>et al.</i> , 2002) y maíz palomero (Raethong <i>et al.</i> , 2020).
Fase de crecimiento	-A los 21 días se producen la mayor producción de cordicepina (Adnan <i>et al.</i> , 2017)	-Fase de senescencia produce mayor cantidad de cordicepina, manitol y glucosa (a las 10 semanas después de la inoculación) (Oh <i>et al.</i> , 2019) -Desarrollo de estromas a los 45 días (Sung <i>et al.</i> , 2006; Shrestha <i>et al.</i> , 2012; Oh <i>et al.</i> , 2019)
Luz	-Mayor pigmentación amarilla con presencia de luz	-Mayor bioeficiencia y producción de carotenoides y cordicepina con luz rosa (1/3; 450–460 + 2/3,620–630 nm) (Dong <i>et al.</i> , 2013)

	-Mayor velocidad de crecimiento en oscuridad	-Mayor producción de adenosina con luz roja (620–630 nm) (Dong <i>et al.</i> , 2013)
	-Mayor densidad micelial en oscuridad	-500lux (Sato <i>et al.</i> , 2002) y 1000lux para desarrollar cuerpos fructíferos (Oh <i>et al.</i> , 2019)
Temperatura	-Mayor crecimiento a 25°C (Kumar <i>et al.</i> , 2006; Adnan <i>et al.</i> , 2017)	-25° es óptima para invasión de sustrato e inducción de fructificación (Oh <i>et al.</i> , 2019)
Humedad	-Humedad ambiental (no la modifican)	-90%, óptima para producir cuerpos fructíferos (Oh <i>et al.</i> , 2019)
pH	-Óptimo 5.5 (Kumar <i>et al.</i> , 2006; Adnan <i>et al.</i> , 2017)	-
Minerales	-Mayor crecimiento con Cloruro de sodio y sulfato de manganeso (Kumar <i>et al.</i> , 2006)	-
Reguladores de crecimiento	-Mayor crecimiento micelial con ácido giberelico (Kumar <i>et al.</i> , 2006) y flouururo (Li <i>et al.</i> , 2021)	-
Azucares	-Mayor radio de crecimiento en medios adicionados sacarosa (Raethong el al., 2020)	.

Aprovechamiento de *Cordyceps* en países Asiáticos

En el mundo algunas compañías en biotecnología cultivan y comercializan alrededor de una docena de especies de *Cordyceps* s.l. para su aprovechamiento en sectores farmacológicos y nutracéuticos (Holliday 2017). En Asia las especies bien conocidas y comercializadas son *Ophiocordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris*, *C. guangdongensis* e *Isaria cicadae* (Dong *et al.*, 2015).

Ophiocordyceps sinensis es considerado el oro del Himalaya, ya a través de los años en diferentes ciudades de Asia ha sido valorado en más de 100,000 US por kilogramo, por lo que presenta un valor mayor que el oro (Lo *et al.*, 2013; Holliday 2017). Esta especie tiene importancia cultural, sin embargo, su cultivo es complicado debido a la especificidad de hospedero, condiciones ambientales y geográficas (Xia *et al.*, 2016). Debido a la alta valoración cultural, sobreexplotación en su hábitat e importancia medicinal se han estudiado otras especies de hongos etomopatógenos con similitud en propiedades (Holliday 2017).

La especie mayormente estudiada, cultivada y comercializa en Asia es *Cordyceps militaris* debido a sus propiedades biológicas y bioquímicas similares a *Ophiocordyceps sinensis* y a su fácil y bajo costo en cultivo artificial (Dong *et al.*, 2015; Jedrejko *et al.*, 2021). Los productos comercializados en el mercado son muy variables, son denominados “Mycoproductions” y son obtenido mediante cultivo *in vitro* de medio sólido, liquido o por cultivo artificial. Los productos como tabletas y cápsulas son comercializados por aproximadamente 110 empresas con licencia

(Dong *et al.*, 2015). Sin embargo, también se comercializan los cuerpos fructíferos deshidratados o frescos como alimentos saludables (Pinthatong *et al.*, 2021).

Por último, los desechos del cultivo de *Cordyceps* spp. presentan componentes biofuncionales como nucleósidos, alcaloides, vitaminas, péptidos y ácidos orgánicos, por lo que se está estudiando la viabilidad de su uso en cosméticos y cosmeceúticos, con un enfoque sostenible (Pinthatong *et al.*, 2021).

Justificación

Actualmente a nivel global, las sociedades presentan problemáticas económicas, geopolíticas, alimentarias, de salud, pérdida de biodiversidad, crisis de fuentes naturales, escasez de agua, contaminación, entre otras (ODS 2015; The Global Risks Report 2022). Por lo cual es necesario desarrollar estrategias que mitiguen y ayuden a ir construyendo soluciones multi e interdisciplinarias que involucren estos aspectos.

Los hongos son organismos con características físicas, químicas y biológicas que impactan de manera positiva en la mayoría de estas problemáticas por lo que su investigación debe ser prioritaria a nivel internacional. Desde 2004 se mencionó que la producción-consumo de hongos comestibles, funcionales y medicinales representan una actividad primaria de gran relevancia social, económica y ecológica (Chang *et al.*, 2004).

A nivel mundial se cultivan industrialmente 15 especies de hongos comestibles, sin embargo, en México solo se cultivan tres especies a pequeña y gran escala: *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus* (setas) y *Lentinula* (shiitake) (Martínez-Carrera 2018), de las 371 especies comestibles registradas para el país (Garibay-Orijel & Ruan-Soto 2014).

En México la producción de alimentos es una actividad vulnerable que requiere especial atención debido al crecimiento poblacional, la explotación de los recursos naturales y un ambiente cambiante. Por lo tanto, el cultivo artificial de un mayor número de especies de hongos silvestres de diferentes regiones geográficas es una estrategia que permitirá diversificar las fuentes de alimentos, conservar los recursos en su hábitat, su diversidad, variabilidad genética y aprovechar los recursos de manera sostenible.

Al mismo tiempo la incidencia de enfermedades crónicas como el cáncer, diabetes, entre otras va en aumento y el consumo de alimentos funcionales tiene un efecto benéfico a la salud. Entre los recursos fúngicos con potencial de ser aprovechados como alimentos funcionales que se encuentran en México y de los cuales su conocimiento es incipiente se encuentra *Cordyceps* s.l.

En México estos hongos tienen sus primeros reportes hace 158 años como “animales-planta raros”. Hasta el 2018 se había registrado una diversidad de 17 especies, donde *Cordyceps militaris*

presentaba la mayor distribución geográfica y número de registros para el país, sin embargo, no se había estudiado con enfoque de aprovechamiento biotecnológico.

Adicionalmente, en 2018 se realizaron estudios en posgrado sobre el cultivo *in vitro* a nivel de cepa y producción de cordicepina en cultivo líquido de una especie silvestre de *Cordyceps* distribuida en el Estado de México, la cual presentaba características morfológicas y de cultivo similares a *Cordyceps militaris* (López-Rodríguez 2018). Debido a estas características y considerando la complejidad taxonómica de estos hongos se planteó investigar las relaciones filogenéticas, reproducción y variables que optimizan el cultivo *in vitro* y artificial, lo cual permitirá conservar el recurso y aprovecharlo.

Hipótesis

“*Cordyceps militaris* ha sido erróneamente considerada conespecífica con otras especies por la similitud macroscópica y la asociación con el orden Lepidoptera, sin embargo, las características interespecies que las diferencian son genéticas, de asociación específica con hospedero, conidiación y distribución geográfica. Por lo tanto, *Cordyceps* aff. *militaris* asociada a estadios inmaduros de lepidópteros distribuida para México corresponde a una especie críptica”

“Si *Cordyceps* aff. *militaris* es cercana filogenéticamente a *Cordyceps militaris* presentara una similitud en tipo de reproducción y crecimiento micelial”

“Las condiciones nutrimentales ricas en C/N en medios de cultivo tendrán una correlación positiva con la mayor producción de biomasa”

“El aumento de la relación (C/N) en sustratos permitirá el desarrollo de primordios y la mayor eficiencia biológica”

Objetivos

Objetivo general

Determinar las relaciones filogenéticas y las condiciones nutrimentales que optimizan la producción de biomasa y eficiencia biológica de una especie similar a *Cordyceps militaris* que se distribuye en el Centro de México, para su posible aprovechamiento como alimento funcional.

Objetivos específicos

- Comparar la biología y relaciones filogenéticas de *Cordyceps* sp. distribuida en el Centro de México con especies hermanas.
- Determinar el tipo de reproducción de esta especie.
- Establecer las cepas y las condiciones nutrimentales en medios de cultivo sólido que optimizan la producción de biomasa.
- Determinar los sustratos que optimizan la eficiencia biológica, mediante bioensayos de fructificación.

Material y método

De manera general la metodología se representa en la figura 6. La descripción detallada con las técnicas y referencias se menciona en cada capítulo.

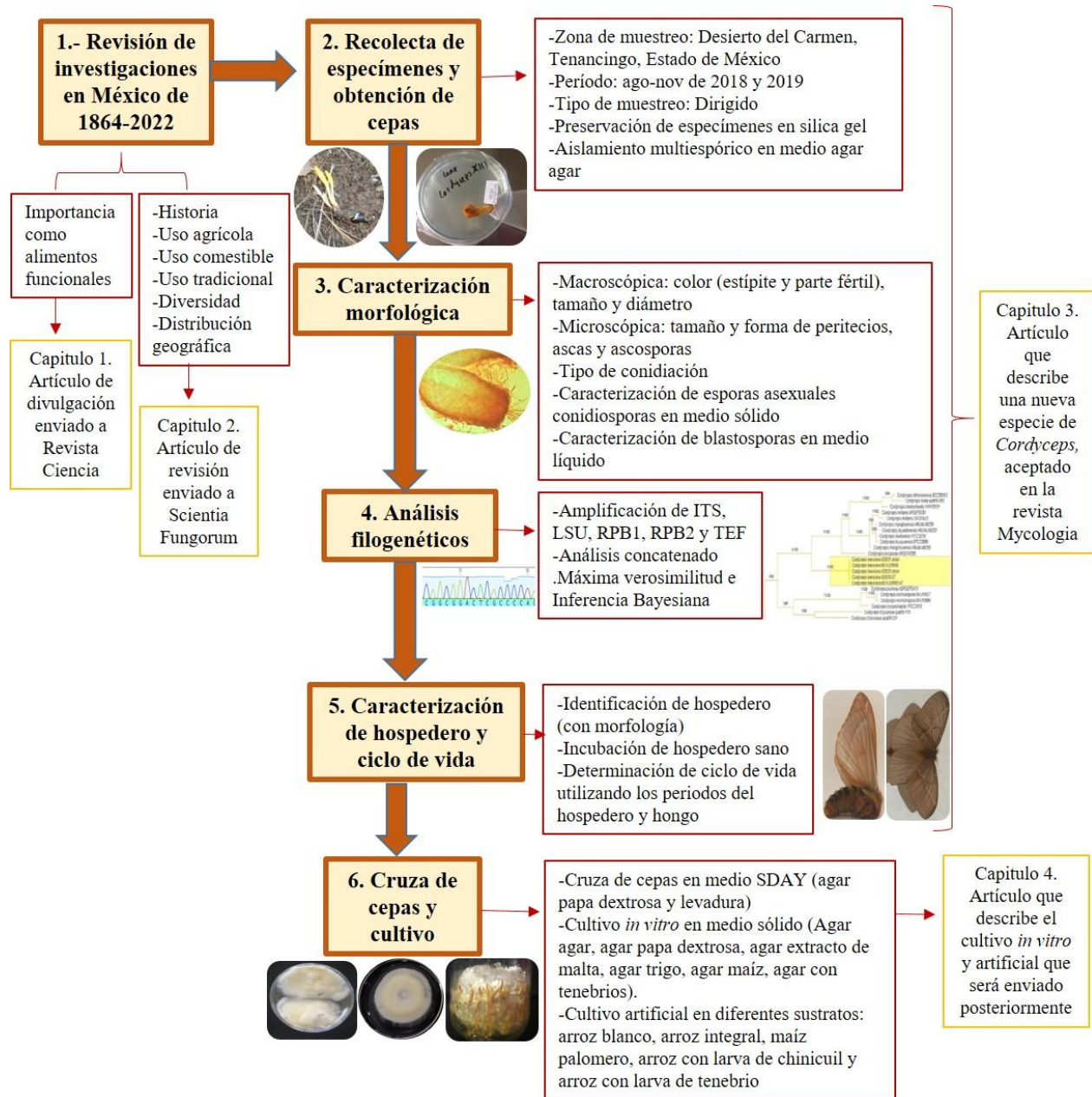


FIG. 6. Diagrama de la metodología general llevada a cabo en esta investigación.

Resultados

Capítulo 1. Artículo de divulgación: ¡Hongos que comen insectos!... ¿Por qué consumirlos?

Artículo de divulgación dirigido a público general, estudiantes de nivel medio superior y superior, en el cual se describen las características morfológicas, asociaciones parasíticas con insectos e importancia medicinal y alimenticia de *Cordyceps* s.l.

El escrito fue enviado a la revista Ciencia de la Academia Mexicana de Ciencias. En las siguientes figuras se muestra la evidencia del envío y del folio de seguimiento, respectivamente.

De: Cristina Burrola Aguilar
Enviado: lunes, 17 de mayo de 2021 06:56 p. m.
Para: rciencia@unam.mx <rciencia@unam.mx>
Asunto: ARTÍCULO PARA POSIBLE PUBLICACIÓN

Estimado Dr. Alonso Fernández Guastí

Enviándole un cordial saludo, por medio de la presente, quiero poner a su consideración el artículo de divulgación ¡Hongos que comen insectos!... ¿Por qué consumirlos? para su evaluación y posible publicación en la Revista Ciencia. El escrito está desarrollado para incluirse en la Sección de Actualidad.

Como archivos adjuntos se anexan:

- 1) Carta de presentación
- 2) Manuscrito
- 3) Figura 1
- 4) Figura 2

Agradeciendo de antemano la atención a la presente, quedo de usted



Dra. CRISTINA BURROLA AGUILAR
Centro de Investigación en Recursos Bióticos
Facultad de Ciencias, UAEMéx
Tel: +52 722 296 55 53

Re: ARTÍCULO PARA POSIBLE PUBLICACIÓN



rciencia <rciencia@unam.mx>

Lun 21/03/2022 03:47 PM

Para: Usted; jfemand@cinvestav.mx

CC: CRISTINA BURROLA

Buenas tardes:

El artículo está en la etapa de evaluación por especialistas y le estamos dando seguimiento con el número de identificación 1388.

Le comento que estamos trabajando de manera intermitente y los procesos llevan más tiempo de lo normal; la publicación de las novedades científicas tiene un tiempo de espera aproximado de 24 meses. Gracias por su paciencia y comprensión.

Paula Buzo Zarzosa
asistente editorial

¡Hongos que comen insectos!... ¿Por qué consumirlos?

Lorena López-Rodríguez¹, Cristina Burrola-Aguilar^{2*} y Roberto Garibay-Orijel³

^{1,2}Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex). ²Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

*Autor de correspondencia: cba@uaemex.mx

Resumen

Actualmente, la humanidad se enfrenta a diversas problemáticas, tal como seguridad alimentaria y enfermedades infeccioso-degenerativas. Sin embargo, existen recursos naturales que permiten disminuir estas problemáticas. Entre estos recursos se encuentran los hongos. Particularmente, los hongos parásitos de insectos del grupo taxonómico *Cordyceps*, son poco conocidos en México, pero múltiples investigaciones sobre la ecología, genética, relaciones filogenéticas, bioquímica y biotecnología colocan a estos hongos con potencial como alimentos funcionales debido a sus extraordinarias propiedades comestibles y medicinales.

Palabras clave: *Cordyceps*, parásitos, alimento funcional

A nivel mundial la seguridad alimentaria y la prevención de enfermedades son objetivos del desarrollo sostenible (ODS), lo que indica que es prioritario realizar investigaciones que involucren estos temas. Actualmente, la producción de alimentos es una actividad vulnerable que requiere especial atención debido al crecimiento poblacional, la explotación de los recursos naturales y un ambiente cambiante, por lo que el cultivo artificial de un mayor número de especies es una estrategia que permite diversificar las fuentes de alimentos, conservar los recursos en sus hábitats, así como su diversidad y variabilidad genética. Al mismo tiempo, la incidencia de enfermedades crónicas e infecciosas como el cáncer, diabetes, COVID-19, entre otras está aumentando. En consecuencia, el consumo de alimentos funcionales también ha crecido gracias a sus efectos benéficos en la salud. Entre los alimentos funcionales se encuentran los hongos silvestres. Estos presentan en su pared celular un esteroide llamado ergosterol y proteo-beta-glucanos que presentan propiedades antitumorales, y en algunas especies efectos antiinfecciosos e inflamatorios, entre otros. Dentro de las especies de hongos silvestres medicinales con mayor importancia se encuentra

un grupo de hongos denominados *Cordyceps sensu lato*, de los cuales en México sólo se han registrado 17 especies, y de los cuales destacaremos su importancia funcional.

Los hongos parásitos

Cuando visitas un bosque o una selva, seguramente has observado la presencia de hongos, estos son seres vivos muy diversos ya que tienen una gran variedad de tamaños, formas, colores y desarrollan una gran variedad de funciones en la naturaleza. Los hongos que se alimentan de materia orgánica en descomposición son llamados saprobios y los podemos encontrar sobre hojarasca, troncos en descomposición, excremento y otras superficies ricas en materia orgánica. Otros hongos llamados micorrízicos tienen relación de mutuo beneficio con las plantas, ya que los hongos les suministran minerales, aminoácidos y agua, y estas les suministran azúcares y vitaminas. Además, hay algunas especies de hongos parásitos que crecen, se desarrollan y reproducen en otros organismos, afectando el desarrollo o sobrevivencia de estos. Este es el caso de los hongos del género *Cordyceps* que parasitan diferentes grupos de insectos, arañas, otros hongos e incluso pastos. Estos hongos son muy peculiares cuando los encontramos en los bosques, ya que la forma de su fructificación llamado estroma no es como los champiñones o las setas, estos comúnmente tienen forma clavada con o sin ramificaciones, con coloraciones amarillas, rojas, naranjas, cafés, negras y blanquecinas, con tonalidades brillantes hasta opacas dependiendo del género o la especie (Sung y cols., 2007) y su tamaño es variable, pero se caracterizan por ser muy pequeños. Por ejemplo, *Ophiocordyceps halabalaensis* especie que parasita a hormigas, mide de 6.5 a 18 mm, en contraste *Cordyceps nidus*, especie que parasita nidos de tarántulas, mide de 10 a 42 mm.

Y de estos hongos llamados *Cordyceps* ¿Cuántos existen en el mundo y quiénes son sus víctimas?

Estos hongos llamados científicamente *Cordyceps* pertenecen a un complejo denominado *Cordyceps sensu lato (s.l.)*, el cual es un grupo taxonómico que contiene aproximadamente 400 especies, las cuales pertenecen a diferentes géneros, entre los más conocidos están *Metarhizium*, *Beauveria*, *Ophiocordyceps*, *Tolypocladium* y *Cordyceps*. La mayoría de éstos han evolucionado como parásitos, sin embargo, algunas especies son endófitas (se encuentran dentro de las plantas).

Los géneros *Cordyceps* (Figura 1) y *Ophiocordyceps* (Figura 2) parasitan en su mayoría a insectos, sin embargo, también se han encontrado en arañas y en nidos de tarántulas tal como *C. nidus*, una especie distribuida en Colombia y *Tolyocladium* que parasita algunos hongos que se encuentran enterrados en el suelo. En general parasitan a diversos grupos de insectos, en su mayoría mariposas, polillas y escarabajos, pero también se pueden observar en abejas, avispas, hormigas, pulgones, cigarras, chinches, saltamontes, grillos, langostas, moscas, mosquitos, cucarachas, mantis, tijerillas, libélulas, insectos palo, insectos hoja, entre otros.



FIG. 1. Ejemplo de *Cordyceps* sp. parasitando una pupa de palomilla. Colectado en Tenancingo, Estado de México. Fotografía de Lorena López Rodríguez, 2018.



Fig 2. Ejemplo de *Ophiocordyceps* sp. parasitando a un grillo. Colectado en Tenancingo, Estado de México. Fotografía de Lorena López Rodríguez, 2018.

¿Por qué son importantes estos hongos?

Esta característica biológica de ser parásitos tiene la función de controlar las poblaciones de insectos que a veces son plaga. Un caso muy estudiado es el de *Ophiocordyceps unilateralis*, especie que parasita hormigas y causa el efecto conocido como “hormiga zombi”. Esta infección inicia cuando una espora se adhiere al exterior de la hormiga, la espora germina, penetra a la hormiga y se desarrollan hifas que absorben nutrientes. En este proceso de infección, el hongo induce un cambio en el comportamiento de la hormiga, ya que ésta se desvía del camino, sube sobre el tallo de una planta y muerde el envés de una hoja; curiosamente esto permite al hongo tener un microclima adecuado para fructificación y dispersión aérea de las esporas.

Por lo cual, la cualidad de ser parásitos ha permitido la utilización de algunas especies en la agroindustria, para controlar insectos plaga que dañan cultivos o insectos vectores de enfermedades de importancia médica. Por ejemplo, *Metarhizium anisopliae* ha sido utilizado en África para controlar los mosquitos vectores de malaria, enfermedad que afecta de 300 a 500 millones de personas cada año, de las cuales de 1.5 a 2 millones fallecen.

En México, se han realizado estudios en laboratorio donde se prueba la eficiencia de *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana* para controlar a *Aedes aegypti*, mosquito que transmite dengue, enfermedad emergente más importante del continente americano que afecta de 50 a 100 millones de personas cada año. Estos experimentos han encontrado un porcentaje de infección del 90% en 5 días con las dos especies, lo cual indica que estos hongos son una alternativa ecológica con efecto positivo para el control de mosquitos transmisores de enfermedades (García-Munguía y cols., 2015).

Aunado a la importancia ecológica y agrícola que tienen estos increíbles hongos, también presentan un alto valor medicinal y alimenticio, debido a que producen una gran cantidad de metabolitos con actividad biológica benéfica para la salud. Por ejemplo, en el cultivo de *C. nidus* se ha encontrado una alta diversidad de componentes, con hasta 3,744 metabolitos en extractos acuosos, entre los que se encuentran péptidos, vitaminas, ácidos orgánicos y azúcares, algunos de estos son bioactivos como por ejemplo la cordisinina con actividad antiviral y la fitosfingosina con actividad antibacteriana, antiinflamatoria y anticancerígena (Chiriví y cols., 2017).

¿Estos hongos se pueden comer como las setas y los champiñones?

Actualmente, especies como *Ophiocordyceps sinensis* y *Cordyceps militaris* son altamente valorados como alimentos medicinales y son aprovechadas en países asiáticos como China y Corea. Hasta ahora de las más de 400 especies de *Cordyceps s.l.* que han sido descritas, 36 han sido cultivadas artificialmente para la producción de fructificaciones, de las cuales *C. militaris* es la que presenta el periodo más corto de producción.

Diferentes especies de *Cordyceps* contienen un amplio rango de nutrientes como son aminoácidos esenciales, vitamina E, K, B₁, B₂, B₁₂, muchos tipos de azúcares, proteínas, esteroides, nucleósidos, macro y microelementos como potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro, zinc, selenio, aluminio, cromo, entre otros, no obstante, su alta valoración como alimento está más relacionada con el efecto medicinal que tiene su consumo.

La especie más valorada en el continente asiático, denominada “El oro del Himalaya” es *Ophiocordyceps sinensis*, se encuentra en primer lugar como la especie de hongo más cara en el mundo, con un costo en 2015 de hasta 60,000 USD/Kg. Esta especie tiene una distribución restringida al Tibet a una altitud de 3000 a 5000 m, y debido a su alta valoración se han presentado problemáticas sociales por la obtención del recurso, así como una disminución de su población debido a su sobreexplotación. Su cultivo artificial para la obtención de cuerpos fructíferos a gran escala se ha logrado lentamente, a partir de estudios sobre su biología, hospedero y la simulación del entorno alpino en el que se encuentra y ha alcanzado rendimientos anuales de 2.5, 5 y 10 toneladas en 2014, 2015 y 2016. Como alternativa de *O. sinensis* se han cultivado en laboratorio otras especies de *Cordyceps* similares en la composición de biomoléculas, tal como *C. militaris*, por lo que la producción anual de las diferentes especies de *Cordyceps* es de 83.2 a 182.5 toneladas por año.

Cordyceps militaris, infecta principalmente capullos de palomillas y se ha reportado en diferentes partes del mundo. El aprovechamiento de esta especie esencialmente es como alimento funcional, sin embargo, también se obtienen productos de salud y medicamentos con sus fructificaciones y micelio. Las fructificaciones se utilizan para cocinar sopas o guisados con pollo, pato o cerdo, o bien se preparan té o café. Su uso en sopas es muy popular en China en donde se recomienda una dosis segura de 2.5 g/Kg de peso corporal. Con el micelio se elaboran productos como líquidos orales, cápsulas, vinos, vinagres, té, yogurts y salsa de soja, por lo que la

presentación de *C. militaris* para su consumo es muy variable, encontrando en los mercados asiáticos más de 30 tipos de productos para la salud.

En México, a pesar de que se distribuyen diferentes especies de *Cordyceps* que tienen importancia medicinal en países asiáticos, tales como *Cordyceps militaris*, *C. pruinosa*, *Tolyocladium capitatum* y *T. ophioglossoides*, entre otras, no son aprovechadas como alimentos funcionales debido al escaso estudio dirigido a conocer sus propiedades nutricionales y medicinales. Sin embargo, actualmente estamos trabajando la biología, evolución, cultivo *in vitro* y metabolitos de una especie silvestre mexicana que había sido confundida con *Cordyceps militaris* debido a su alta similitud morfológica. Esto con la perspectiva de aprovecharla como alimento funcional en México. Estas investigaciones las llevamos a cabo en la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex) en colaboración con la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

¿Cuáles son las propiedades medicinales que le dan valor a estos hongos?

Las propiedades medicinales que destacan son anti-tumorales, anti-metástasis, anti-oxidantes, anti-inflamatorias, anti-microbianas, anti-virales e inmunomodulatorias, las cuales son resultado de la actividad biológica de diferentes biomoléculas producidas por estos hongos, como la cordicepina, la didanosina, ergosterol, polisacáridos, glicoproteínas y péptidos. Por ejemplo, los extractos de *C. kyushuensis* regulan la expresión de genes y moléculas involucradas en el crecimiento, proliferación y tumorigénesis de células humanas tumorosas de pulmón. Para el tratamiento farmacológico del VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) es utilizado el fármaco antiretroviral didanosina con el nombre comercial de Videx, que es obtenida de *C. militaris*. Recientemente un estudio computacional evaluó el potencial terapéutico de la cordicepina producida por *Cordyceps militaris*, contra COVID-19, donde se encontró que está inhibió proteínas implicadas en la replicación del virus, por lo que los investigadores sugieren su uso para probar la eficiencia y seguridad en tratamiento de COVID-19.

Perspectivas del estudio de estos interesantes hongos

La importancia de estos hongos es increíble ya que, debido a sus características biológicas, repercuten en diferentes áreas de importancia humana, tal como la agroindustria, farmacología, medicina y la alimentación, por lo cual su investigación es crucial para poder aprovechar las diferentes especies del grupo *Cordyceps sensu lato*. En México el estudio de las especies silvestres es incipiente y se ha enfocado a citar su presencia en diferentes localidades y su investigación como controladores biológicos, dejando a un lado la investigación sobre su potencial como alimentos funcionales, los cuales son una tendencia mundial, ya que no solo aportan nutrientes, sino tienen un efecto benéfico a la salud del humano. Por lo tanto, es importante priorizar investigaciones sobre su cultivo, sus componentes nutricionales y biofuncionales. Estas investigaciones no solo crearían un nuevo campo de investigación para México, si no que permitirían ampliar el número de alimentos con potencial funcional para la población.

Conclusión

Cuando camines por el bosque tal vez podrás encontrar a estos interesantes hongos parasitando a una pupa o larva de mariposa, a una gallina ciega, un escarabajo, un insecto palo, una araña, un nido de araña, a otro hongo y hasta podrás encontrarlos en pastos. Al mismo tiempo recuerda que tienen un rol importante, no sólo desde el punto de vista ecológico y agrícola como reguladores y controladores biológicos de insectos transmisores de enfermedades emergentes y de insectos plaga, sino en términos alimenticios y farmacológicos, ya que algunas especies son altamente valoradas por su propiedad anticancerígena y antiviral, lo cual, les confiere valoración como alimento funcional, lo que los hace sumamente atractivos para la investigación científica.

Lecturas recomendadas

- Kumar A (2020), “Cordycepin: a bioactive metabolite of *Cordyceps militaris* and polyadenylation inhibitor with therapeutic potential against COVID-19”, *Journal Biomolecular Structure and Dynamics*, 2020: 1-8.
- Iliana C (2007), “*Cordyceps sinensis*, un hongo usado en la medicina tradicional china”, *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 259-262.
- López-Rodríguez, L. y C. Burrola-Aguilar (2019), “Hongos parásitos de insectos y otros hongos: una alternativa de alimento funcional”, *Agroproductividad*, 12: 57-62.
- Pérez-Villamares, J.C., Burrola-Aguilar, C., Aguilar-Miguel, X., Sanjuan, T. y E. Jiménez-Sánchez (2017), “Nuevos registros de hongos entomopatógenos del género *Cordyceps s.l.* (Ascomycota: Hypocreales) del Estado de México”, *Revista Mexicana de Biodiversidad* 88: 773-783.

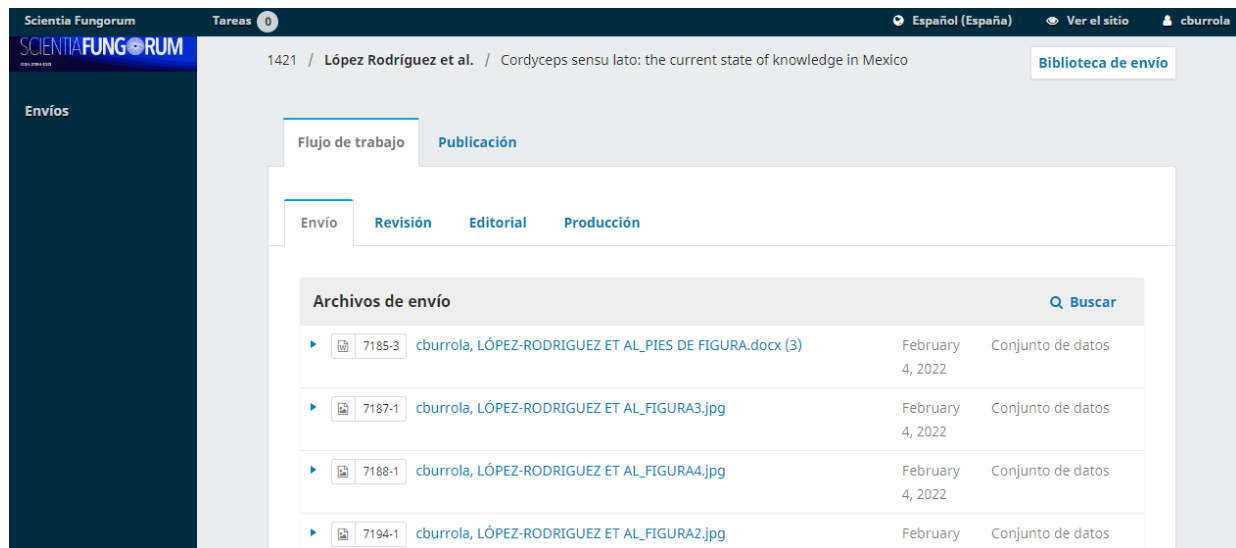
Referencias específicas

- Chiriví, J., Danies, G., Sierra, R., Schauer, N., Trenkamp, S., Restrepo, S. y T Sanjuan (2017), “Metabolomic profile and nucleoside composition of *Cordyceps nidus* sp. Nov. (Cordycipitaceae): A new source of active compounds”, *PloS ONE* 12: 1-27.
- García-Munguía, A.M., Cortez-Madrugal, H., Velázquez-Machuca, M.A., Rebollar-Plata, M. y M. Acosta-Ramos (2015), “Evaluación de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* aislados de la Ciénega de Michoacán, México, para el control de *Aedes aegypti*”, *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 3: 1060-1067.
- Sung, G. H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M., Luangsa-ard, J.J., Shrestha, B. y W. Spatafora (2007), “Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi”. *Studies in Mycology*, 57: 5-59.

Capítulo 2. Artículo de revisión: Estado actual del conocimiento de *Cordyceps sensu lato* en México

Artículo del estado del arte de *Cordyceps* s.l. en México, en el cual se describe la historia del tiempo y enfoque de los principales estudios realizados, la diversidad registrada hasta el momento, su uso agrícola y tradicional, relación con hospederos y distribución geográfica.

El artículo está dirigido a estudiantes e investigadores que quieran conocer acerca de estos hongos o sean su objeto de estudio. Fue enviado a la revista nacional especializada en hongos: Scientia Fungorum.



The screenshot displays the submission interface for the journal Scientia Fungorum. The user is logged in as 'cburrola'. The article title is 'Cordyceps sensu lato: the current state of knowledge in Mexico'. The submission process is shown in a 'Flujo de trabajo' (Workflow) view, with the current stage being 'Publicación'. The 'Archivos de envío' (Submitted Files) section lists four files:

ID	Nombre del archivo	Fecha	Descripción
7185-3	cburrola, LÓPEZ-RODRIGUEZ ET AL_PIES DE FIGURA.docx (3)	February 4, 2022	Conjunto de datos
7187-1	cburrola, LÓPEZ-RODRIGUEZ ET AL_FIGURA3.jpg	February 4, 2022	Conjunto de datos
7188-1	cburrola, LÓPEZ-RODRIGUEZ ET AL_FIGURA4.jpg	February 4, 2022	Conjunto de datos
7194-1	cburrola, LÓPEZ-RODRIGUEZ ET AL_FIGURA2.jpg	February	Conjunto de datos

***Cordyceps sensu lato*: the current state of knowledge in Mexico**
Estado actual del conocimiento de *Cordyceps sensu lato* en México

Lorena López-Rodríguez¹, Cristina Burrola-Aguilar^{2*}, Tatiana Sanjuan³, Roberto Garibay-Orijel⁴, Andrés Arguelles Moyao⁵, María Elena Estrada Zúñiga⁶, María Raziel Hernández Azotea⁷

^{1,2,6,7} Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias, Centro de Investigación en Recursos Bióticos, km 14.5, carretera Toluca-Atlacomulco, 50200, Toluca, Estado de México, México. ³ Universidad Internacional del Trópico Americano-Unitrópico, Ciudadela Universitaria de Casanare, carretera 19 No. 39-40, Yopal, Colombia. ^{4,5} Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Ciudad Universitaria, Circuito exterior s/n, 04510. Ciudad de México, México.

Corresponding author: ² Cristina Burrola Aguilar, cba@uaemex.mx

Abstract

Background: *Cordyceps s.l.* is a paraphyletic group of Ascomycete fungi that mainly parasitize arthropods. In Mexico, these have been little studied and the current state of their diversity is unknown.

Objectives: To describe the history of the records of *Cordyceps s.l.*, and to generate a checklist of the species, detailing their hosts and geographical distribution.

Methods: A literature review was conducted addressing the entomopathogenic fungi of *Cordyceps s.l.* reported in Mexico from 1864 to 2021. A checklist was made of the species, their hosts, and geographical distribution. Geographical distribution maps of Cordycipitaceae and Ophiocordycipitaceae were created in the Arc GIS 10.5 program.

Results and Conclusions: In Mexico, the first record of *Cordyceps* was published in 1864. To date, 29 species of *Cordyceps s.l.* have been recorded, equivalent to 2.9% of the diversity recorded worldwide. The geographical distribution of these species is determined by their hosts and the vegetation. The species with the greatest geographical distribution are: *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps militaris*, *Tolypocladium capitatum*, and *T. ophioglossoides*. *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* are the most studied species due to their pathogenicity to different crop pests.

Keywords: entomopathogens, Hypocreales, insects, pest, *Tolypocladium*

Resumen

Antecedentes: *Cordyceps s.l.* es un grupo parafilético de hongos ascomicetos, principalmente parásitos de artrópodos. En México estos hongos han sido escasamente estudiados y se desconoce el panorama actual de su diversidad.

Objetivos: Describir la historia taxonómica de *Cordyceps s.l.*, realizar un listado de las especies, sus hospederos y distribución geográfica.

Métodos: Se realizó una revisión de literatura de las investigaciones sobre hongos entomopatógenos de *Cordyceps s.l.* registrados en México de 1864 a 2021. Se realizó un listado de las especies, sus hospederos y su distribución geográfica. Se realizaron mapas de la distribución geográfica de la Familia Cordycipitaceae y Ophiocordycipitaceae en el programa Arc GIS 10.5.

Resultados y conclusiones: En México, en 1864 se publicó el primer registro de *Cordyceps*. Hasta el momento se han registrado 29 especies de *Cordyceps s.l.*, lo que equivale al 2.9% de la diversidad registrada a nivel mundial. La distribución geográfica de estas especies está determinada en primer lugar por sus hospederos y consecuentemente por la vegetación. Las especies con mayor distribución geográfica son *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps militaris*, *Tolypocladium capitatum* y *T. ophioglossoides*. *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* son las especies con más estudios, debido a su patogenicidad en diferentes insectos plaga.

Palabras clave: entomopatógenos, Hypocreales, insectos, plagas, *Tolypocladium*

Introduction

Cordyceps sensu lato is a paraphyletic group of Ascomycete fungi comprising approximately 1000 species. The members of the group present multiple lifestyles, since parasitizing arthropods, grasses, and hypogeous fungi (Sung *et al.*, 2007a; Sung *et al.*, 2007 b; Wei *et al.*, 2020), while some are saprotrophs or endophytes (Gazis *et al.*, 2014). These endoparasitic fungi may present host specificity for a certain order, family, or species (Nikoh & Fakatsu 2000; Sasaki 2008; Sanjuan *et al.*, 2014).

Cordyceps s.l. includes fungal species of agricultural importance. The asexual stage is important as a biological control of several pest and vector insects. In Africa, *Metarhizium* has been used to control *Anopheles* mosquitoes, which are the vector of malaria (Scholte *et al.*, 2005). In Latin America, specifically Brazil, *Metarhizium* has been used to control the insect *Aeneolamia varia* ("salivazos"), which affects alfalfa and sugar cane cultivars (Alves *et al.*, 2008). In Colombia, *Akanthomyces sabanensis* parasitizes *Pulvinaria caballeroramosae* females that, in turn, parasitize *Ficus suatensis* (Chiriví-Salomón *et al.*, 2015). In Florida, USA, *Beauveria bassiana* has been used to control the whitefly *Bemisia tabaci* (Sani *et al.*, 2020). This host species is considered by the International Union for Conservation of Nature (IUCN) as an invasive pest in North America that affects crops such as alfalfa, broccoli, cabbage, cotton, tomato, squash, peanut, and watermelon, among others (Quesada-Moraga *et al.*, 2006; SEDECO 2014).

Cordyceps s.l. also comprises species with edible and medicinal properties. Different species of *Cordyceps s.l.*, such as *Cordyceps militaris*, *C. pruinosa*, *C. tenuipes*, *Isaria cicadae*, *Tolyptocladium ophioglossoides*, and *Ophiocordyceps sinensis*, are appreciated as edible and medicinal in Asia, and are considered functional foods since they produce metabolites beneficial to health (Ng & Wang 2005; Zhang *et al.*, 2018). Different species of *Cordyceps s.l.* have antioxidant, anti-cancer, antihyperlipidemic, anti-diabetic, anti-fatigue, anti-aging, anti-depressant, and aphrodisiac properties, since they produce various biomolecules including nucleosides such as cordycepin, sterols, flavonoids, cyclic peptides, phenolic, bioanthracenes, polyketides, and alkaloids (Das *et al.*, 2021). Cordycepin (3'-deoxyadenosine), a nucleoside analogue of adenosine, is a well studied metabolite, since it presents the properties described above. Its production is considered an indicator of the quality of the *Cordyceps* species (Lee *et al.*, 2019).

Isaria cicadae is a species of great cultural importance, and has been used in China for about 1,600 years (Jui-Hsia *et al.*, 2015). Another species of cultural, medicinal and economic importance is *Ophiocordyceps sinensis*. Known in Tibet as "winter worm" or "summer grass", this species parasitizes larvae of the moth *Thitarodes* sp. (Wu *et al.*, 2020). Its distribution is restricted to the Tibetan plateau in the Himalayas at over 5 000 m asl in elevation, and its overexploitation has led to a decline in its populations (Winkler 2009; Kumar *et al.*, 2010; Shrestha 2011). *Ophiocordyceps sinensis* currently has a high economic value worldwide, indeed it was marketed at up to \$60,000 USD per-kg in 2015 (Lei *et al.*, 2015). Consequently, the IUCN has classed it as vulnerable (VU) (Yang 2020).

Artificial cultivation of *O. sinensis* is challenging; however, *Cordyceps militaris* can be used as a substitute for *O. sinensis* and is cultivated at industrial scale (Shrestha *et al.*, 2010). *Cordyceps militaris* has biological activities, including as an antimalarial, hypoglycemic, anti-cancer, immunomodulatory, antidiabetic, and antiviral against COVID (Asaduzzaman *et al.*, 2010; Jedrejko *et al.*, 2021). In Mexico, there is a lack of knowledge regarding the diversity of *Cordyceps s.l.* species and the research topics have been limited to listings, which does little to facilitate its potential exploitation.

The objectives of this review were therefore to analyze the taxonomic history, and to list the richness, hosts, and geographical distribution of the *Cordyceps s.l.* group.

Material and Methods

This paper analyzes the published information pertaining to *Cordyceps s.l.* in Mexico. To achieve this, a list of the species recorded in the different states of the country was created through a review of the scientific literature published from 1864 to 2021. The review of the first reports of entomopathogenic fungi was conducted in the Historical Collection of the Institute of Biology of the National Autonomous University of Mexico (UNAM, by its Spanish acronym).

We also looked for records of anamorphic states of *Cordyceps s.l.* used as biological controls, as well as references to traditional knowledge, using electronic search engines such as Google Academic, and in the Scientific Electronic Library Online (SciELO), Redalyc databases, and Elsevier, Scopus, and SpringerLink. The keywords used in the query were: entomopathogenic fungi, biological control, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Isaria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*,

Tolypocladium, *in vitro* culture, and traditional knowledge. Scientific names were standardized according to the nomenclature published in the Index Fungorum portal (<http://www.indexfungorum.org/>). Geographic distribution maps of Cordycipitaceae and Ophiocordycipitaceae were generated in the program Arc Gis 10.5 (CA), using presence records from the studies listed in Tables 1 and 2. The dataset for land use and vegetation cover, available from the Mexican National Institute of Statistics and Geography (INEGI, by its Spanish acronym), was used with at scale 1:250,000. The coordinate system MEXICO ITRF 2008 LCC was used, along with the Lambert Conformal Conic and Datum projection.

Results and Discussion

History of records of *Cordyceps* in Mexico

The first report of something similar to *Cordyceps* in Mexico was made by the physician and pharmacist Rio de la Loza (1864), who analyzed an "animal-plant rare in nature" through quantification of ashes and determined it to be "animal (*Cicada communis*) with animal excrescence" (FIG. 1). Seventeen years later, these specimens were determined as insect parasitic fungi (Urbina 1881). Seventy-six years after the Urbina descriptions, the first species of *Cordyceps* in Mexico were recorded in 1957. Taxonomic identification of herbarium material began in 1977, with new records and regional taxonomic studies conducted from 1999 to 2021 (FIG. 2).

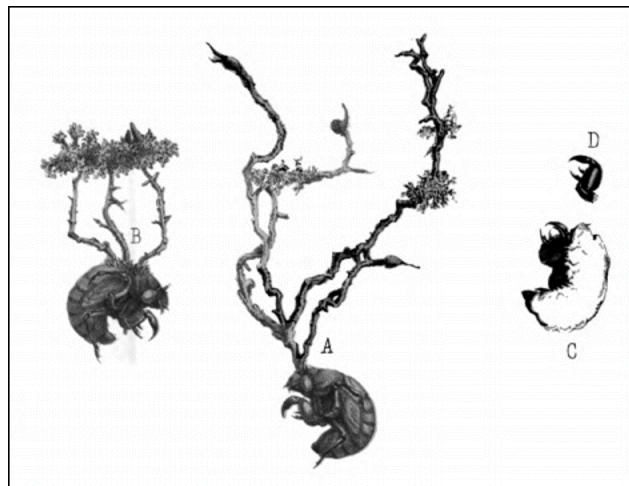


FIG. 1. Illustration of a "rare animal-plant" made by Rio de la Loza in 1864. A. Larva-nymph, the branches that emerge from the head have a rounded termination; B. Ramifications ending in a cauliflower formation, emerging from the posterior part of the thorax; C. Dissected lateral view of a larva-nymph; D. Serrated leg of the insect used to excavate the soil.

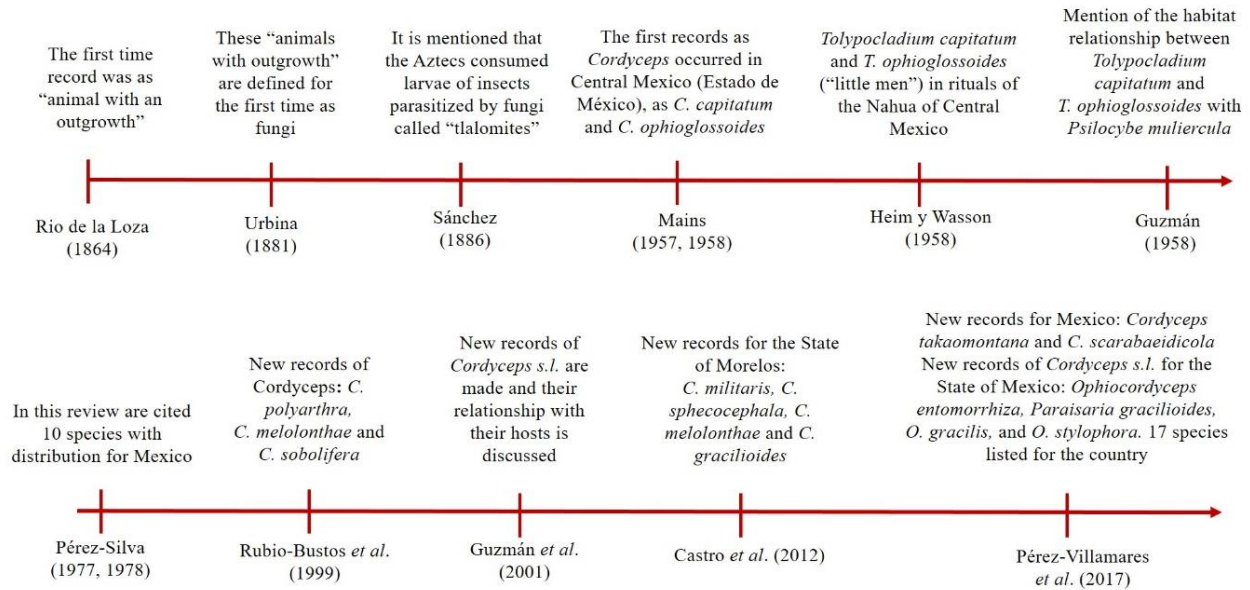


FIG. 2. *Cordyceps* s.l. studies in Mexico timeline.

Diversity of *Cordyceps* in Mexico

Currently, there are 29 *Cordyceps s.l.* species recorded in Mexico, belonging to the families Clavicipitaceae, Cordycipitaceae, and Ophiocordycipitaceae. This species represents 2.9% of the entomopathogenic fungi worldwide, considering an overall diversity of 1000 species (Wei *et al.*, 2020).

Most of the Cordycipitaceae and Ophiocordycipitaceae records are presented in central Mexico, particularly in the states of Estado de México and Morelos. In addition, more than three records are presented in Veracruz, Oaxaca, Chiapas and Jalisco. There are states, such as Aguascalientes, Baja California, Ciudad de México, Guerrero, Nayarit, Tlaxcala, Queretaro and Zacatecas, in which no studies have been conducted.

We assume that the records that do exist are underestimates, since few studies have focused on these fungi, the studies are mainly regional and involve classic taxonomy, the intervals between investigations are usually lengthy, and there are numerous geographic areas where no studies have been conducted.

On production of the maps, we found that changes in the vegetal stratum have changed from 1980 to 2018. We observed that some records have changed from temperate and tropical forests to human settlements, suggesting possible biodiversity loss over time. For example, *Ophiocordyceps*

octospora was recorded for the only time in Jalisco by Blackwell & Gilbertson (1984), in an agricultural zone that is now occupied by human settlement.

Of the family Cordycipitaceae, at least one forest record each of *Beauveria scarabaeidicola*, *Cordyceps takaomontana* and *C. militaris*, now corresponds to human settlement.

Of the family Ophiocordycipitaceae, the locations of some records of *Hirsutella citriformis*, *Ophiocordyceps gracilis*, *O. melolonthae*, *O. sphecocephala* and *Paraisaria gracilioides* in agricultural areas, now correspond to human settlements.

Fungal biodiversity loss is a little studied global problem, with few evaluations conducted. However, it has been recorded that the main factors responsible for this loss are modifications to natural systems, commercial-residential development and agriculture (Lughadha *et al.*, 2020).

Finally, we recommended investment of time and funds in further research of aspects of the biology of *Cordyceps s.l.* in Mexico particularly to explore the genetics, anatomy, and ecology of the group, which would allow the proposal of suitable conservation strategies.

Species and families recorded in Mexico

Clavicipitaceae

Clavicipitaceae, grouping four species: *Metarhizium anisopliae*, *M. robertsii*, *M. guizhouense*, and *M. pinghaense* (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018) is the least recorded family in Mexico. These species infect Coleoptera, Hemiptera and Lepidoptera (Brunner-Mendoza *et al.*, 2017). *Metarhizium anisopliae* is the most dominant species of Clavicipitaceae in Mexico, but is less abundant than *Beauveria bassiana* (Pérez-González *et al.*, 2014). We therefore recommend further studies to explore their utility as substitutes for chemical insecticides.

Metarhizium anisopliae has the highest number of records, being isolated from soils and a wide range of insects, from tropical and temperate regions. This species is considered to be generalist (Bischoff *et al.*, 2009) and mesophilic, since it grows at temperatures of 10-40 °C (Robert & Campbell 1977), and it has been used in the management of crop pests and malaria vectors (Scholte *et al.*, 2005).

Cordycipitaceae

The Cordycipitaceae family is represented in Mexico by seven species of the genus *Cordyceps*, three species of *Beauveria* and one of *Akanthomyces*. In this family, *C. militaris* has the largest number of records and a wide geographic distribution (FIG. 3). It has been recorded in twelve states, in various vegetation types including temperate forest, rainforest, grassland and agricultural areas. It grows on pupae and larvae of Lepidoptera of the family Noctuidae, Sphingidae, and Geometridae; and has only once been reported parasitizing Coleoptera (Table 1). *Cordyceps militaris* can be considered cosmopolitan, since has been reported as widely distributed in North America, Europe, and Asia (Mains 1958). It was first mentioned in Mexico in 1977, although no specific locality was given in this case (Guzmán 1977). *Cordyceps militaris* develops in different vegetation in temperate or tropical biomes, as well as in disturbed vegetation (Rubio-Bustos *et al.*, 1999). This indicates that the distribution of *Cordyceps militaris* is not determined by vegetation or climate, but rather by the distribution of its insect hosts (Shrestha *et al.*, 2016). In Asia, specifically in Korea and Japan, it is consumed for its attributed medicinal properties since it produces secondary metabolites, such as *cordycepin*, with anticancer, antibiotic, and antifungal activities (Ng & Wang 2005; Shrestha *et al.*, 2016). Despite its comestible and medicinal importance, studies addressing these aspects have yet to be conducted in Mexico.

Table 1. Cordycipitaceae Species recorded in Mexico.

Species	Hosts (Pupae, larvae or adult/ Order/ Family/ Species)	Geographic distribution/References	
		Vegetation	State
<i>Akanthomyces tuberculatus</i> (Lebert 1858) Spatafora, Kepler & Shrestha 2017	Lepidoptera adults (Sphingidae)	Citrus agricultural área	Tamaulipas (Sánchez-Peña 1990)
<i>Beauveria bassiana</i> Bals. Criv 1912	Coleoptera larvae. Ortoptera adults. Lepidoptera pupae and larvae	Agricultural areas with crops such as coffe, corn, lemon and grassland	Morelos (Hernández-Velázquez <i>et al.</i> 2011), Chihuahua (Barajas <i>et al.</i> 2011), Chiapas (De la Rosa <i>et al.</i> 2000), Michoacán (García-Munguía <i>et al.</i> 2015), Coahuila (Sánchez-Peña <i>et al.</i> 2011)
<i>Beauveria pseudobassiana</i> Rehner & Humber 2011	Coleoptera larvae (<i>Phyllophaga polyphilla</i>)	Grassland	Guanajuato (Carrillo-Benítez <i>at al.</i> 2013)

<i>Beauveria scarabaeidicola</i> (Kobayasi & Shimizu 1976) Rehner & Kepler 2017	Coleoptera adults (Scarabaeidae, Melolonthinae and Dynastinae Family)	<i>Quercus-Pinus</i> forest, <i>Juniperus</i> forest shrub vegetation, <i>Quercus</i> forest secondary vegetation and agricultural área	Estado de México (Pérez-Villamares <i>et al.</i> 2017)
<i>Cordyceps farinosa</i> (Holmsk 1832) Kepler, Shrestha & Spatafora 2017	Lepidoptera pupae	-	Morelos (Pérez-Silva 1977; Guzmán <i>et al.</i> 2001), Oaxaca (Pérez-Silva 1979, 1977; Guzmán <i>et al.</i> 2001)
<i>Cordyceps fumosorosea</i> (Wize 1904) Kepler, Shrestha & Spatafora 2017	Orthoptera adults (Tetigonidae Family)	Citrus agricultural área	Veracruz (Pérez-Silva 1978)
<i>Cordyceps militaris</i> Link 1818	Lepidoptera pupae and larvae (Geometridae, Noctuidae and Sphingidae). Coleoptera adults	<i>Quercus</i> forest, <i>Quercus-Pinus</i> forest mountain mesophyll and <i>Abies-Pseudotsuga</i> mixed forests, deciduous forest, agricultural area and grassland	Hidalgo (Pérez-Silva 1977), Morelos (Pérez-Silva 1977; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Oaxaca (Pérez-Silva 1977; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Veracruz (Pérez-Silva 1977; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Chiapas (Chacón & Guzmán, 1984; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Jalisco (Mains 1958; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999; Guzmán <i>et al.</i> 2001; Gándara <i>et al.</i> 2014), Estado de México (Frutis <i>et al.</i> 1985; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Sinaloa (Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Michoacán (Díaz-Barriga <i>et al.</i> 1988; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Nuevo León (Guzmán <i>et al.</i> 2001), Morelos (Castro <i>et al.</i> 2012), Sonora (Pérez-Silva <i>et al.</i> 1996)
<i>Cordyceps polyarthra</i> Möller 1901	Lepidoptera pupae	<i>Quercus</i> forest, <i>Quercus-Pinus</i> mixed forest and deciduous tropical forest	Jalisco (Rubio-Bustos 1999)
<i>Cordyceps pruinosa</i> Petch 1924	-	Tropical forest	Quintana Roo (Guzmán <i>et al.</i> 2001)
<i>Cordyceps takaomontana</i> Yakush & Kumaz 1941	Lepidoptera pupae and larvae	<i>Quercus-Pinus</i> forest, <i>Quercus</i> forest shrub secondary vegetation, <i>Juniperus</i> forest shrub vegetation and agricultural área	Estado de México (Pérez-Villamares <i>et al.</i> 2017)
<i>Cordyceps tenuipes</i> (Peck 1878) Kepler, Shrestha & Spatafora 2017	Pupae not unidentified	Mesophyll forest	Veracruz (López & García 2002b)

-: unidentified host or vegetation not described



FIG. 3. Cordycipitaceae geographic distribution in Mexico.

Ophiocordycipitaceae

Ophiocordycipitaceae is the family with the greatest diversity recorded in Mexico, comprising 14 species and four genera. *Ophiocordyceps* has nine species with distribution in seven states. Of these, Veracruz, Oaxaca, and Jalisco have the highest number of records. *Tolypocladium* is represented by two species: *Tolypocladium capitatum* and *T. ophioglossoides*. These have the largest number of records and the largest geographic distribution, and have been widely collected parasitizing *Elaphomyces* spp. in this host's habitat of pine-oak forests. The genus *Hirsutella* is also represented by two species, while *Paraisaria* has presented only one species (FIG. 4; Table 2).

Worldwide, Ophiocordycipitaceae comprises about 160 species that infect eleven orders of insects (Evans *et al.*, 2011; Araújo & Hughes 2016). *Ophiocordyceps* is considered the most diverse genus of the Hypocreales order (Sung *et al.* 2007a). Below, we review some of the important species of this genus present in Mexico.

Table 2. Ophiocordycipitaceae Species recorded in Mexico

Species	Hosts (Pupae, larvae or adult/ Order/ Family/ Species)	Geographic distribution/ References	
		Vegetation	State
<i>Hirsutella thompsonii</i> Fisher 1950	Acarus (Arachnida; Trombidiformes; <i>Tetranychus urticae</i> , <i>Aceria guerreronis</i> and <i>Phyllocoptruta oleivora</i> , <i>Brevipalpidos phoenicis</i>)	Low rainforest, scrub and mangrove	Without specifying locality (Mier <i>et al.</i> 1989, 1992; Sampedro & Rosas 1989; Guzmán <i>et al.</i> 2001), Colima (Rosas-Acevedo & Sampedro-Rosas 2006)
<i>Hirsutella citrifomis</i> Speare 1920	Hymenoptera adults and nymphs (Liviidae; <i>Diaphorina citri</i>)	Citrus agricultural areas	Tabasco, Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Chiapas, Veracruz, Colima (Pérez-González <i>et al.</i> 2015)
<i>Ophiocordyceps dipterigena</i> (Berk & Broome 1873) Sung, Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	Diptera adults (<i>Eucalliphora</i> , and <i>Lucilia sericata</i> , Calliphoridae)	Botanical Garden of the Instituto de Ecología at Xalapa, Mesophitic forest and coffe agricultural area	Veracruz (Guzmán <i>et al.</i> 2001; López-García 2009; Medel 2013)
<i>Ophiocordyceps entomorrhiza</i> (Diks 1849) Sung, Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	Lepidoptera larvae (Noctuidae). Coleoptera larvae	<i>Quercus</i> forest shrubby secondary vegetation, coffe agricultural areas, mesophyll forest, <i>Cupressus</i> forest	Veracruz (Chacón & Guzmán 1983, 1995; Chacón <i>et al.</i> 1995; Pérez-Silva 1978; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999; López & García, 2002a; Medel 2013), Estado de México (Pérez-Villamares <i>et al.</i> 2017)
<i>Ophiocordyceps humbertii</i> Robin 1934	Hymenoptera adults (<i>Polistes</i> , Vespidae)	-	Oaxaca (Ulloa & Benavides 1991; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999)
<i>Ophiocordyceps gracilis</i> (Grev 1884) Sung, Sung, Hywel-Jones and Spatafora 2007	Lepidoptera larvae (Noctuidae)	Deciduous tropical forest, mesophilian forest, <i>Juniperus</i> forest secondary vegetation and agricultural área	Jalisco (Rodríguez <i>et al.</i> 1993; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999; Medel <i>et al.</i> 1999; Medel 2013), Veracruz (Chacón & Guzmán 1983, 1995; Chacón <i>et al.</i> 1995; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999; Guzmán <i>et al.</i> 2001), Estado de México (Pérez-Villamares <i>et al.</i> 2017)
<i>Ophiocordyceps melolonthae</i> (Tul & Tul 1878) Sung, Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	Coleoptera larvae (<i>Enema endymion</i> , <i>Strategus aloeus</i> , Melolonthidae). Coleptera adults (Phyllophaga, Melolonthidae)	Evergreen high forest, <i>Quercus-Pinus</i> forest, subtropical humid forest, tropical evergreen forest, subdeciduous tropical forest, agricultural area with coffee cultivation	Chiapas (Pérez-Silva 1977; Chacón & Guzmán 1983; Guzmán <i>et al.</i> 2001; Robles <i>et al.</i> 2006), Jalisco (Chacón & Guzmán 1983; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999; Guzmán <i>et al.</i> 2001), Oaxaca (Guzmán <i>et al.</i> 2001), Veracruz (Guzmán <i>et al.</i> 2001), Morelos (Castro-Bustos <i>et al.</i> 2012)
<i>Ophiocordyceps octospora</i> (Blackw & Gilb 1981) Sung,	Blattoidea adults (<i>Tenuirostritermes tenuirostris</i> , Termitidae)	-	Jalisco (Blackwell & Gilbertson 1984; Guzmán <i>et al.</i> 2001)

Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007			
<i>Ophiocordyceps sobolifera</i> (Hill ex Watson 1763) Sung, Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	Hemiptera nymphs (Cicadidae)	Xerophilous forest with oak, subtropical scrub	Guanajuato (Guzmán <i>et al.</i> 2001), Coahuila (Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Sonora (Méndez-Mayboca <i>et al.</i> 2008), without specifying locality (Mains 1951, 1955, 1958; Pérez-Silva 1979; Petch 1935; Urbina 1881)
<i>Ophiocordyceps sphecocephala</i> (Klotzsch ex Berk 1868) Sung, Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	Hymenoptera adults (<i>Polistes</i> , Vespidae)	Rainforest, oak forest in transition to tropical deciduous forest	Jalisco (Chacón & Guzmán 1983; Pérez-Silva 1977; Rodríguez <i>et al.</i> 1993; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999; Guzmán <i>et al.</i> 2001), Morelos (Castro-Bustos <i>et al.</i> 2012)
<i>Ophiocordyceps stylophora</i> (Berk & Broome 1857) Sung, Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	*Hymenoptera adults (<i>Polistes instabilis</i> , Vespidae). Coleoptera larvae	*Deciduous forest. <i>Quercus-Pinus</i> forest	*Jalisco (Pérez-Silva 1978; Herrera & Ulloa 1998; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999). Estado de México (Pérez-Villamares <i>et al.</i> 2017)
<i>Paraisaria gracilioides</i> (Kobayasi 1941) Li, Fan & Li, Mycosystema 2004	Coleoptera larvae	Secondary shrub vegetation of <i>Juniperus</i> forest, agricultural area and deciduous forest	Estado de México (Pérez-Villamares <i>et al.</i> 2017), Morelos (Castro-Bustos <i>et al.</i> 2012)
<i>Tolypocladium capitatum</i> (Holmsk 1818) Quandt, Kepler & Spatafora 2014	<i>Elaphomyces granulatus</i> and <i>E. muricatus</i> (Hypogaeal fungi)	<i>Pinus-Quercus</i> forest and <i>Quercus</i> forest	Durango (Quintos <i>et al.</i> 1984; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Estado de México (Heim & Wason 1958; Guzmán 1958, 1977; Pérez-Silva 1977; Guzmán <i>et al.</i> 2001; Guzmán 2008), Hidalgo (García-Romero <i>et al.</i> 1970; Pérez-Silva 1977; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Jalisco (Pérez-Silva 1977; Gándara <i>et al.</i> 2014), Puebla (Martínez <i>et al.</i> 1983; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Morelos (Pérez-Silva 1977), Michoacán (Díaz-Barriga <i>et al.</i> 1988; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Tamaulipas (Heredia 1989; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Oaxaca (Pérez-Silva <i>et al.</i> 1977), Veracruz (Guzmán & Villareal 1984; Heredia 1989; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), San Luis Potosí (Guzmán 1958; Pérez-Silva 1977; Rubio-Bustos <i>et al.</i> 1999), Sonora (Pérez-Silva <i>et al.</i> 1996)
<i>Tolypocladium ophioglossoides</i> (J.F. Gmel. 1818) Quandt, Kepler & Spatafora 2014	<i>Elaphomyces granulatus</i> and <i>E. muticatus</i> (Hypogaeal fungi)	<i>Pinus-Quercus</i> forest and <i>Quercus</i> forest	Durango (Pérez-Silva 1977), Estado de México (Heim & Wason 1958; Trappe and Guzmán 1971; Pérez-Silva 1977; Guzmán <i>et al.</i> 2001),

Hidalgo (Pérez-Silva 1977),
 Michoacán (Díaz-Barriga *et al.*
 1988), Oaxaca (Pérez-Silva
 1977), Sonora (Pérez-Silva
et al. 1996), San Luis Potosí
 (Guzmán 1958; Guzmán *et al.*
 2001), Tamaulipas (García &
 Valenzuela 2005)

-: information not reported
 *: doubtful identification



FIG. 4. Ophiocordycipitaceae geographic distribution in Mexico.

Ophiocordyceps melolonthae has been found in different vegetation types including evergreen forest, pine-oak forest and subtropical humid forests, as well as agroecosystems such as coffee plantations. However, it is always found parasitizing larvae and adults of Coleoptera of the family Melolonthidae (Pérez-Silva 1977; Rubio-Bustos *et al.* 1999), and its distribution is therefore considered to be related to that of its host. *Ophiocordyceps dipterigena* has been recorded only in the humid subtropical forest of the state of Veracruz, where it parasitizes species of Diptera (Guzmán *et al.* 2001; Medel 2013). This species is of biotechnological importance since it produces an exobiopolymer that induces the production of the interleukin IL-8 for fibroblasts (Kocharin *et*

al. 2010). This is useful as a healing material, while its high viscosity and moisturizing properties allows its use as a substitute for hyaluronic acid in the pharmaceutical industry.

Ophiocordyceps entomorrhiza is a species similar to *Paraisaria gracilis*, indeed it is difficult to distinguish between the two species taxonomically (Guzmán *et al.* 2001). However, *Paraisaria gracilis* parasitizes Lepidoptera and *O. entomorrhiza* has been reported on Lepidoptera larvae in various types of vegetation (Chacón & Guzmán 1983, 1995; Chacón *et al.* 1995; Pérez-Silva 1978; Rubio-Bustos *et al.* 1999; López & García 2002a; Medel 2013); however, Pérez-Villamares *et al.* (2017) stated that the latter has only been found parasitizing Coleoptera larvae, so it is probably restricted to this insect order. *Paraisaria gracilioides* is a rare species, that specializes in parasitizing Coleoptera larvae (Kobayasi 1941; Li *et al.* 2002; Castro *et al.* 2012; Pérez-Villamares *et al.* 2017).

Ophiocordyceps sphecocephala has been recorded in Mexico as a parasite of the wasp genus *Polistes* but, in Japan, China, Korea, and Nepal, it has been found parasitizing *Aphrophora* wasps (Shrestha 2011). In Mexico, *Ophiocordyceps stylophora* has been described as parasitizing larvae of Coleoptera (Pérez-Villamares *et al.* 2017) and Hymenoptera; however, this host identification is considered to be erroneous (Bustos *et al.* 1999). The asexual phase of this species was reported as *Hirsutella stylophora* (Pérez-Silva 1978).

Ophiocordyceps sobolifera has been reported in cicada nymphs and it is probably the species that was first recorded as a “rare plant-animal” (Guzman *et al.* 2001).

Unlike the genera described above, *Tolypocladium*, does not parasitize insects but rather hypogeous fungi of the genus *Elaphomyces* and nymphs of Cicadidae. It was hypothesized that, given the same belowground habitat of *Cicadas* and *Elaphomyces*, *Tolypocladium* has performed a host switch (Nikoh & Fukatsu 2000). *Tolypocladium ophioglossoides* has been reported with a wide distribution in the northern hemisphere: USA, Russia, and Japan (Mains 1957; Pérez-Silva 1977), as well as Mexico. This species is of pharmaceutical importance because it produces ophiocordin with antibiotic and antifungal properties (Kneifel *et al.* 1997), and ophioretin with antibiotic properties (Putri *et al.* 2010).

Given the great taxonomical diversity and nutritional and pharmaceutical importance of Ophiocordycipitaceae, we consider it crucial to initiate research of its *in vitro* culture and metabolites in order to evaluate its possible use.

Asexual states of *Cordyceps s.l.* recorded as agents of biological control of insect pests and disease vectors

In Mexico, the asexual states of *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea*, *Hirsutella* sp. and *Metarhizium anisopliae* have been studied as biological control agents of insect pests that affect valuable crops such as maize, beans, coffee, citrus, fruits and sugar cane. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* are pathogens of *Brachystola magna* and *Phyllophaga* sp., two pests that affect maize (*Zea mays*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) crops (Lezama *et al.* 2005; Barajas *et al.* 2011; Hernández-Velázquez *et al.* 2011). These fungi are also found on insects in coffee crops (*Coffea* spp.) (De la Rosa *et al.* 2000) and have been used to treat sugar cane crop pests (SAGARPA 1999). The pest control properties of these fungi have also been tested in the dengue vector *Aedes aegypti* (García-Munguía *et al.* 2015) and in *Triatoma dimidiata* and *Meccus pallidipennis*, two vectors of Chagas disease (Vázquez-Martínez *et al.* 2014; Flores-Villegas *et al.* 2016). *Cordyceps fumosorosea*, known as *Paecilomyces fumosorosea* and *Hirsutella* sp., has also been used to control *Diaphorina citri*, an insect that transmits viruses to citrus fruits (Lezama-Gutiérrez *et al.* 2012; Pérez-González *et al.* 2015).

Despite their global agricultural importance, there has been no specific research of specialized entomopathogenic species in Mexico, and the studies that have been conducted to date did not address any effects on other insects, including pollinators or other ecologically important insects.

The traditional importance of *Tolypocladium* in Mexico

Tolypocladium capitatum and *T. ophioglossoides* were first recorded in Estado de México (Mains 1957, 1958; Heim & Wason 1958). The Nahuas attribute medicinal properties to both species (Heim & Wason 1958). Its consumption was first described in rituals of the Nahua people of San Pedro Tlanixco and Tenango del Valle, where it was consumed together with *Psilocybe muliercula* and *Elaphomyces* spp. (Heim & Wason 1958). The common names of *T. capitatum* and *T. ophioglossoides* are "little men", while individuals of *Psilocybe muliercula* are known as "little women" and *Elaphomyces* spp. are called "Great world". The ritual itself was described by Guzmán (2008), but has not been documented since.

Relationship with hosts

In Mexico, we found that the family Cordycipitaceae mainly presented an association with Lepidoptera. *Cordyceps militaris* and *C. takaomontana* are associated with Lepidoptera pupae and larvae. *C. farinosa* and *C. polyarthra* are found on Lepidoptera pupae, while only *Akanthomyces tuberculatus* is found on Lepidoptera adults. However, other species could be associated with Coleoptera, Hemiptera and Orthoptera adults (Table 1). In the family Ophiocordycipitaceae, *Tolypocladium* even parasitizes *Elaphomyces* fungi, while *Ophiocordyceps* parasitizes Lepidoptera and Coleoptera larvae, and Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera and Hemiptera adults, and only *Hirsutella thompsonii* parasitizes acari (Table 2).

These host associations are informative taxonomic characters in *Cordyceps s.l.*, since the hosts are probably drivers for speciation (Sanjuan *et al.* 2015). The main hosts of *Cordyceps s.l.* have been reported as immature stages of Lepidoptera and Coleoptera (Shrestha *et al.* 2016) and spiders (Shrestha *et al.* 2019).

We therefore suggest that future studies should place an emphasis on the taxonomic identification of hosts at species level in future studies.

Conclusions

In Mexico, the history of the study of the *Cordyceps s.l.* dates back to 1864, but the research has advanced sporadically, leaving lapses of up to 71 years with no research at all. Currently, *Cordyceps s.l.* diversity is represented by 29 species, where the family Ophiocordycipitaceae is the most diverse, with 14 species recorded, followed by Cordycipitaceae with 11 species and Clavicipitaceae which is represented by four species of *Metarhizium*. These species are associated with the distribution of their hosts, as observed mainly in *Ophiocordyceps melolonthae*, *O. dipterigena* and *O. entomorrhiza*. Most species are associated with a genus or family of the class Insecta and, in the case of fungal parasites, have only been reported in the genus *Elaphomyces*. Only *C. militaris*, *M. anisopliae*, and *B. bassiana* have been recorded in more than one order of insects and these species are of agricultural and medical importance, since they are utilized in the control of pest insects and disease vectors that affect both plants and humans. *Tolypocladium capitatum* and *T. ophioglossoides* are the only species recorded with ritual use. The listed species,

include some of pharmacological importance, such as *C. militaris*, *C. dipterigena*, and *T. ophioglossoides*, and species of nutritional or medicinal importance such as *C. militaris*, *C. pruinosa*, and *T. ophioglossoides*.

Acknowledgements

The first author thanks the CONACyT for the scholarship granted for his doctor's studies. To the Universidad Autónoma del Estado de México for funding the research (SyEA 3687/2014/CIA). To Dra. Evangelina Pérez Silva for her observations, comments and recommendations on this manuscript.

References

- Alves SB, Lopes RB, Pereira RM, Tamai MA. 2008. Controle microbiano na América Latina: avanços e desafios. In: Batista S, Biaggioni R (ed.) Control microbiano de pragas na América Latina. Fundação de Estudos Agrárias Luiz de Queiroz, FEALQ, Brochura. 21–48.
- Araújo JPM, Hughes DP. 2016. Diversity of Entomopathogen Fungi: Which Groups Conquered the Insect Body? *Advances in Genetics* 94, 1–39. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.001>
- Asaduzzaman K, Mousumi T, Dian-zheng Z, Han-chun C. 2010. *Cordyceps* Mushroom: A Potent Anticancer Nutraceutical. *The Open Nutraceuticals Journal* 3, 179–183. <https://doi.org/10.2174/18763960010030100179>
- Barajas O, Minel del Pozo E, Rodríguez ML, Palacios A, Hermosillo JG. 2011. Aislamientos fúngicos nativos del Estado de Chihuahua, patógenos de *Brachystola magna*. *Synthesis* 57, 3–7.
- Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101, 512–530. <https://doi.org/10.3852/07-202>
- Blackwell M, Gilbertson RL. 1984. New information on *Cordycepioideus bisporus* and *Cordycepioideus octosporus*. *Mycologia* 76, 763–765. <https://doi.org/10.2307/3793239>
- Brunner-Mendoza C, Moonjely S, Reyes-Montes M.R, Toriello C, Bidochka M. 2017. Physiological and phylogenetic variability of Mexican *Metarhizium* strains. *BioControl* 62: 779–791. <http://doi.org/10.1007/s10526-017-9839-3>
- Brunner-Mendoza C, Reyes-Montes MR, Moonjely S, Bidochka MJ, Toriello C. 2018. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on

- its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science and Technology* 29, 83–102. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1531111>
- Carrillo-Benítez MG, Guzmán-Franco AW, Alatorre-Rosas R, Enríquez-Vara JN. 2013. Diversity and genetic population structure of fungal pathogens infecting white grub larvae in Agricultural soils. *Invertebrate Microbiology* 65, 437–449. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0124-9>
- Castro B, Acosta-Urdapilleta ML, Valenzuela-Garza R, Burgos-Solorio A. 2012. Hongos entomopatógenos del género *Cordyceps s.l.* (Fungi: Ascomycota) en el Estado de Morelos. In: Equihua A, Estrada EG, Soto A, Chaires P, Durán G (ed.). *Sociedad Mexicana de Entomología A.C.*, Ciudad de México. 273–276.
- Chacón S, Guzmán G. 1983. Especies de macromicetos citadas de México, V. Ascomycetes, parte II. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 18, 103–114.
- Chacón S, Guzmán G. 1984. Nuevas observaciones sobre los hongos, líquenes y mixomicetos de Chiapas. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 19, 245–252.
- Chacón S, Guzmán G. 1995. Observations on the phenology of ten fungal species in the subtropical forests at Xalapa, México. *Mycological Research* 99, 54–56. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80316-X](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80316-X)
- Chacón S, Guzmán G, Montoya L, Bandala VM. 1995. Guía ilustrada de los hongos del Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero de Xalapa, Veracruz y áreas circunvecinas. Instituto de Ecología. Xalapa, México.
- Chiriví-Salomón JS, Danies G, Restrepo S, Sanjuan T. 2015. *Lecanicillium sabanense* sp. nov. (Cordycipitaceae) a new fungal entomopathogen of coccids. *Phytotaxa* 234, 63–74. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.234.1.4>
- Das G, Shin HS, Leyva-Gómez G, Prado-Audelo ML, Cortes H, Singh YD, Panda MK, Mishra AP, Nigam M, Saklani S, Chaturi PK, Martorell M, Cruz-Martins N, Sharma V, Garg N, Sharma R, Patra JK. 2021. *Cordyceps* spp.: A review on its immune-stimulatory and other biological potentials. *Frontiers in Pharmacology* 11, 1–31. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.602364>
- De la Rosa W, Alatorre R, Barrera JF, Toriello C. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. *Journal of Economic Entomology* 93, 1409–1414. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.5.1409>

- Díaz-Barriga H, Guevara-Féfer F, Valenzuela R. 1988. Contribución al conocimiento de los macromicetos del estado de Michoacán. *Acta Botánica Mexicana* 2: 21–44. <https://doi.org/10.21829/abm2.1988.564>
- Evans HC, SL Elliot, Hughes DP. 2011. Hidden diversity behind the zombie-ant fungus *Ophiocordyceps unilateralis*: four new species described from carpenter ants in minas gerais, Brazil. *PLOS ONE* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017024>
- Flores-Villegas AL, Cabrera-Bravo M, Toriello C, Bucio-Torres MI, Salazar-Schettino PM, Córdoba-Aguilar A. 2016. Survival and immune response of the Chagas vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) against two entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea*. *Parasites & Vectors* 9, 176–186. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1453-1>
- Frutis IM, Chio R, Estrada-Torres A. 1985. Nuevos registros de macromicetos del Estado de México. *Revista Mexicana de Micología* 1, 285–300.
- Gándara Z, Guzmán-Dávalos L, Guzmán G, Rodríguez MO. 2014. Inventario Micobiótico de la Región de Tapalpa, Jalisco, México. *Acta Botánica Mexicana* 107, 165–185. <https://doi.org/10.21829/abm107.2014.207>
- García-Munguía AM, Cortez-Madrigal H, Velázquez-Machuca MA, Rebollar-Plata M, Acosta-Ramos M. 2015. Evaluación de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* aislados de la Ciénega de Michoacán, México, para el control de *Aedes aegypti*. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan* 3, 1060–1067.
- García-Romero L, Guzmán G, Herrera T. 1970. Especies de macromicetos citadas de México, I. Ascomycetes, Tremellales y Aphyllophorales. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 4, 54–76.
- Gazis R, Skaltsas D, Chaverri P. 2014. Novel endophytic lineages of *Tolypocladium* provide new insights into the ecology and evolution of *Cordyceps*-like fungi. *Mycologia* 106, 1090–1105. <https://doi.org/10.3852/13-346>
- Guzmán G. 1958. El hábitat de *Psilocybe muliercula* Singer and Smith (= *P. wassonii* Heim), Agaricáceo alucinógeno mexicano. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 19, 215–229.
- Guzmán G. 1977. Identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera. Limusa, Ciudad de México, México.

- Guzmán G. 2008. Diversity and use of Traditional Mexican Fungi. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 10, 209–217. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v10.i3.20>
- Guzmán G, Morón MA, Ramírez-Guillén F, Wolf JHD. 2001. Entomogenous *Cordyceps* and related genera from México with discussions on their hosts and new records. *Mycotaxon* 78, 115–125.
- Guzmán G, Villarreal L. 1984. Estudio sobre los hongos, líquenes y mixomicetos del Cofre de Perote, Veracruz, I. Introducción a la microflora de la región. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 19, 107–124. <https://doi.org/10.33885/sf.1984.2.594>
- Heim R, Wasson RW. 1958. Les Champignons hallucinogenes du Mexique. Archives du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris.
- Heredia G. 1989. Estudio de los hongos de la Reserva de la Biosfera El Cielo, Tamaulipas. Consideraciones sobre la distribución y ecología de algunas especies. *Acta Botánica Mexicana* 7, 1–18. <https://doi.org/10.21829/abm7.1989.577>
- Hernández-Velázquez VM, Cervantes Z, Villalobos FJ, Lina LP, Peña G. 2011. Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleóptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz. *Acta Zoológica Mexicana* 27, 591–599. <https://doi.org/10.21829/azm.2011.273777>
- Herrera ST, Ulloa MA. 1998. El Reino de los hongos. Fondo de Cultura Económica, Universidad de México, Ciudad de México, México.
- Jedrejko KJ, Lazur J, Muszynska B. 2021. *Cordyceps militaris*: An Overview of its chemical constituents in relation to biological activity. *Foods* 10, 1–24. <https://doi.org/10.3390/foods10112634>
- Jui-Hsia H, Bo-Yi J, Shu-Hsing Y, Yen-lien C, Chin-Chu C. 2015. Healthcare functions of *Cordyceps cicadae*. *Journal of Nutrition & Food Sciences* 5: 1–7. <http://doi.org/10.4172/2155-9600.1000432>
- Kneifel H, König WA, Loaffler W, Müller R. 1977. Ophiocordin, an antifungal antibiotic of *Cordyceps ophioglossoides*. *Archives of Microbiology* 113, 121–130. <https://doi.org/10.1007/BF00428591>
- Kobayashi Y. 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. *Scientific Report Tokyo Burinka Daig* 5, 53–260.

- Kocharin K, Rachathewee P, Sanglier JJ, Prathumpai W. 2010. Exobiopolymer production of *Ophiocordyceps dipterigena* BCC 2073: optimization, production in bioreactor and characterization. BMC Biotechnology 10, 51–61. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-51>
- Kumar S, Masuda M, Sakurai A, Sakakibara M. 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. Fitoterapia 81, 961–968. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.010>
- Lee SK, Lee JH, Kim HR, Chun Y, Lee JH, Yoo HY, Park C, Kim SW. 2019. Improved cordycepin production by *Cordyceps militaris* KYL05 using casein hydrolysate in submerged conditions. Biomolecules 9, 1–11. <http://doi.org/10.3390/biom9090461>
- Lei W, Zhang GR, Peng QY, Liu X. 2015. Development of *Ophiocordyceps sinensis* through plant-mediated interkingdom host colonization. International Journal Molecular Sciences 16, 17482–17493. <https://doi.org/10.3390/ijms160817482>
- Lezama R, Molina J, López M, Pescador A, Galindo E, Ángel CA, Michel CA. 2005. Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control del gusano cogollero del maíz en campo. Avances en Investigación Agropecuaria 9, 1–5.
- Lezama-Gutiérrez R, Molina-Ochoa J, Chávez-Flores O, Ángel-Sahagún CA, Skoda SR, Reyes-Martínez G, Barba-Reynoso M, Rebolledo-Domínguez O, Ruíz-Aguilar GML, Foster JE. 2012. Use of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. International Journal Tropical Insect Science 32, 39–44. <https://doi.org/10.1017/S1742758412000069>
- López R, García J. 2002a. *Cordyceps entomorrhiza*. Funga veracruzana 75, 1–2.
- López R, García J. 2002b. *Paecilomyces tenuipes*. Funga veracruzana 76, 1–4.
- López R, García J. 2009. *Cordyceps dipterigena*. Funga veracruzana 87, 1–4.
- Lughadha EH, Bachman SP, Leão TCC, Forest F, Halley JM, Moat J, Acedo C, Bacon KL, Brewer RF, Gâteblé G, Gonçalves SC, Govaerts R, Hollingsworth PM, Krisai-Greilhuber I, Lirio EJ, Moore PGP, Negrão R, Onana JM, Rajaovelona LR, Razanajatovo H, Reich PB, Richards SL, Rivers MC, Cooper A, Iganci J, Lewis GP, Smidt EC, Antonelli A, Mueller GM, Walker BE. 2020. Extinction risk and threats to plants and fungi. Plants People Planet 2, 389–408. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10146>

- Mains EB. 1951. Notes concerning entomogenous fungi. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 78, 122–133.
- Mains EB. 1955. Some entomogenous species of *Isaria*. *Papers of the Michigan Academy of Science Arts and Letters* 41, 23–32.
- Mains EB. 1957. Information concerning species of *Cordyceps* and *Ophionectria* in the Lloyd Herbarium. *Lloydia* 20, 219–227.
- Mains EB. 1958. North American Entomogenous species of *Cordyceps*. *Mycologia* 50, 169–222.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1958.12024722>
- Martínez MA, Pérez-Silva E, Aguirre-Acosta E. 1983. Etnomicología y exploraciones micológicas en la Sierra Norte de Puebla. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 18, 51–53.
<https://doi.org/10.33885/sf.1983.2.574>
- Medel R. 2013. Hongos ascomicetos del bosque mesófilo de montaña en México. *Acta Botánica Mexicana* 105, 87–106. <https://doi.org/10.21829/abm105.2013.224>
- Medel R, Guzmán G, Chacón S. 1999. Especies de macromicetos citadas de México IX. Ascomycetes, parte III: 1983-1996. *Acta Botánica Mexicana* 46, 57–72.
<https://doi.org/10.21829/abm46.1999.816>
- Méndez-Mayboca FR, Chacón S, Coronado ML, Esqueda M. 2008. Ascomycetes from Sonora, Mexico, II: National Forest Reserve and Wildlife Refuge Ajos-Bavispe. *Revista Mexicana de Micología* 25, 33–40.
- Mier T, Perez J, Carrillo-Farga J, Toriello C. 1989. Study on the innocuity of *Hirsutella thompsonii*. I. Infectivity in mice and guinea pigs. *Entomophaga* 34, 105–110.
<https://doi.org/10.1007/BF02372593>
- Mier T, Rosete FA, Garibay I. 1992. Crecimiento y esporulación de *Hirsutella thompsonii* en medios naturales y conservación se su viabilidad en diferentes soportes. *Revista Mexicana de Micología* 8, 131–135. <https://doi.org/10.33885/sf.1992.3.794>
- Ng TB, Wang HX. 2005. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57, 1509–1519. <https://doi.org/10.1211/jpp.57.12.0001>
- Nikoh N, Fukatsu T. 2000. Interkingdom host jumping underground: Phylogenetic analysis of entomoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Molecular Biology and Evolution* 17, 629–638.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026341>

- Pérez-González V, Guzmán-Franco A, Alatorre-Rosas R, Hernández-López J, Hernández-González V, Carrillo-Benitez M.G. Baverstock J. 2014. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. *Journal of Invertebrate Pathology* 119: 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.004>
- Pérez-González O, Rodríguez-Guerra R, López-Arroyo I, Sandoval-Coronado CF, Maldonado-Blanco MG. 2015. Radial Growth, Sporulation, and Virulence of Mexican Isolates of *Hirsutella citriformis* against *Diaphorina citri*. *Southwestern Entomologist* 40, 11–120. <https://doi.org/10.3958/059.040.0109>
- Pérez-Silva E. 1977. Algunas especies del género *Cordyceps* (Pyrenomycetes) en México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 11, 145–153.
- Pérez-Silva E. 1978. Nuevos registros del género *Cordyceps* (Pyrenomycetes) en México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 12, 19–25.
- Pérez-Silva E. 1979. Nota sobre la posible relación del género *Cordyceps* (Pyrenomycetidae) con los tlalomites de los aztecas. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 13, 253–255.
- Pérez-Silva E, Esqueda-Valle M, Armenta-Calderón A. 1996. Ascomycetes de Sonora I: Discomycetes y Pyrenomycetes. *Revista Mexicana de Micología* 12, 97–106. <https://doi.org/10.33885/sf.1996.3.853>
- Pérez-Villamares JC, Burrola-Aguilar C, Aguilar-Miguel X, Sanjuan TI, Jiménez-Sánchez E. 2017. Nuevos registros de hongos entomopatógenos del género *Cordyceps s.l.* (Ascomycota: Hypocreales) del Estado de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 88, 773–784. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.10.013>
- Petch T. 1935. Notes on entomogenous fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 19, 161–194. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(42\)80017-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(42)80017-0)
- Putri SP, Kinoshita H, Ihara F, Igarashi Y, Nihira T. 2010. Ophosetin, a new tetramic acid derivative from the mycopathogenic fungus *Elaphocordyceps ophioglossoides*. *The Journal of Antibiotics* 63, 195–198. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.8>
- Quesada-Moraga E, Ruiz-García A, Santiago-Alvarez C. 2006. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratia capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 99, 1955–1966. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-99.6.1955>

- Quintos E, Varela L, Valdés M. 1984. Contribución al estudio de los macromicetos, principalmente los ectomicorrícicos en el estado de Durango (México). Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología 19, 283–290.
- Rio de la Loza L. 1864. El Animal-Planta. Boletín de la Sociedad Mexicana de Geografía y Estadística 10, 315–318.
- Roberts D.W, Campbell AS. 1977. Stability of entomopathogenic fungi. Annals of Entomological Society of America 10: 19–76.
- Robles L, Ishihara MI. 2006. Inventario preliminar de los macromicetos en los altos de Chiapas, México. Polibotanica 21, 89–101.
- Rodríguez O, Guzmán-Dávalos L, Vázquez LS. 1993. Nuevos registros de hongos para México. Micología Neotropical Aplicada 6, 61–71.
- Rosas-Acevedo JL, Sampedro-Rosas L. 2006. Variabilidad de cepas de *Hirsutella thompsonii*, a partir de ácaros fitófagos en tres sistemas terrestres del estado de Colima. Revista Mexicana de Biodiversidad 77, 7–16.
- Rubio-Bustos SY, Guzmán-Dávalos L, Navarrete-Heredia JL. 1999. Especies entomopatógenas de *Cordyceps* (Fungi, Ascomycotina) en México. Boletín del Instituto de Botánica 7, 135–157.
- Sampedro L, Rosas JL. 1989. Selección de cepas de *Hirsutella thompsonii* Fisher para combatir el ácaro del cocotero, *Eriophytes guerreronis* Keifer. I. Bioensayos de patogenicidad. Revista Mexicana de Micología 5, 225–231.
- Sánchez J. 1886. Los tlalomites, insectos atacados por hongos y el animal-planta. La Naturaleza 7, 323–330.
- Sánchez-Peña 1990. Some insect and spider pathogenic fungi from México with data on their host ranges. Florida Entomologist 73, 517–522. <https://doi.org/10.2307/3495473>
- Sánchez-Peña SR, San-Juan J, Medina RF. 2011. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. Journal of Insect Science 2, 1–10. <https://doi.org/10.1673/031.011.0101>
- Sanjuan T, Tabima J, Restrepo S, Læssøe T, Spatafora JW, Franco-Molano AE. 2014. Entomopathogens of Amazonian stick insects and locusts are members of the *Beauveria* species complex (*Cordyceps sensu stricto*). Mycologia 106, 260–275. <https://doi.org/10.3852/13-020>

- Sanjuan TI, Franco-Molano AE, Kepler RM, Spatafora JW, Tabima J, Vasco-Palacios AM, Restrepo S. 2015. Five new species of entomopathogenic fungi from the Amazon and evolution of neotropical *Ophiocordyceps*. *Fungal Biology* 30, 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.010>
- Sani I, Ismail SI, Abdullah S, Jalinus J, Jamian S, Saad N. 2020. A review of the Biology and control of whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), with special reference to biological control using entomopathogenic fungi. *Insects* 11, 619–636. <https://doi.org/10.3390/insects11090619>
- Sasaki F, Miyamoto T, Yamamoto A, Tamai Y, Yajima T. 2008. Morphological and genetics characteristics of the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps nutans* and its host insects. *Mycological Research* 112, 1241–1244. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.04.008>
- Scholte EJ, Ng'habi K, Kihonda J, Takken W, Paaijmans K, Abdulla S, Killeen GF, Knols BG. 2005. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science* 308, 1641–1642. <https://doi.org/10.1126/science.1108639>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 1999. Control microbial de mosca pinta *Aeneolamia* spp. con *Metarhizium anisopliae*, México.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172886/Ficha_CB_08_Control_microbial_de_mosca_pinta_Aeneolamia_spp.pdf
- SEDECO. 2014. Índice de precios de la canasta básica de la Dirección General de Abasto, Comercio y Distribución.
https://www.sedeco.cdmx.gob.mx/storage/app/media/Canasta%20Basica/2014/Septiembre/4_INDICE%20DE%20PRECIOS%20DE%20CANASTA%20BASICA%20DE%20LA%20DGA%20CD%20.pdf
- Shrestha B, Weimin Z, Yongjie Z, Xingzhong L. 2010. What is the Chinese Caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Ophiocordycipitaceae)? *Mycology* 1, 228–236.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2010.536791>
- Shrestha B. 2011. Diversity of Cordyceps fungi in Nepal. *Nepal Journal of Science and Technology* 12, 103–110. <https://doi.org/10.3126/njst.v12i0.6487>
- Shrestha B, Tanaka E, Hyun MW, Han JG, Kim CS, Jo WJ, Han SK, Oh J, Sung GH. 2016. Coleopteran and lepidopteran hosts of the entomopathogenic genus *Cordyceps sensu lato*. *Hindawi* 12, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/7648219>

- Shrestha B, Kubátová A, Tanaka E, Oh J, Yoon DH, Sung JM, Sung GH. 2019. Spider-pathogenic fungi within Hypocreales (Ascomycota): their current nomenclature, diversity, and distribution. *Mycological Progress* 18, 983–1003. <https://doi.org/10.1007/s11557-019-01512-3>
- Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL, Spatafora JW. 2007a. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44, 1204–1223. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.011>
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. 2007b. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57, 5–59. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.57.01>
- Trappe JM, Guzmán G. 1971. Notes on some hypogeous fungi from Mexico. *Mycologia*. 63, 317–332. <https://doi.org/10.1080/00275514.1971.12019112>
- Ulloa M, Benavides C. 1991. Nota sobre *Hirsutella saussurei*, un hifomicete patógeno de avispa sociales. *Revista Mexicana de Micología* 7, 175–184.
- Urbina M. 1881. Relación del Sr. Milne-Edwards acerca del insecto llamado animal-planta. *La Naturaleza* 5, 42–43.
- Vázquez-Martínez MG, Cirerol-Cruz BE, Torres-Estrada JL, López MHR. 2014. Potential for entomopathogenic fungi to control *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of chagas disease in Mexico. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47, 716–722. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0193-2014>
- Wei DP, Wanasinghe DN, Hyde KD, Mortimer PE, Xu JC, To-Anun C, Yu FM, Zha LS. 2020. *Ophiocordyceps tianshanensis* sp. nov. on ants from Tianshan mountains, PR China. *Phytotaxa* 464, 277–292. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.464.4.2>
- Winkler D. 2009. Caterpillar fungus (*Ophiocordyceps sinensis*) production and sustainability on the Tibetan Plateau and in the Himalayas. *Asian Medicine* 5, 291–316. <https://doi.org/10.1163/157342109X568829>
- Wu H, Rao ZC, Cao L, Clercq P, Han RC. 2020. Infection of *Ophiocordyceps sinensis* fungus causes dramatic changes in the microbiota of its *Thitarodes* host. *Frontiers in Microbiology* 11, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.577268>
- Yang Z.L. 2020. *Ophiocordyceps sinensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020.

http://iucn.ekoo.se/iucn/species_view/504340

<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T58514773A179197748.en>

Zhang X, Hu Q, Weng Q. 2018. Secondary metabolites (SMs) OF *Isaria cicadae* and *Isaria tenuipes*. RSC Advances 9: 172–184. <http://org/10.1039/C8RA09039D>

Capítulo 3. Artículo de investigación: *Cordyceps mexicana* sp. nov., parasita de polillas *Paradirphia* sp.; una nueva especie hermana del complejo *Cordyceps militaris*, distribuida en bosques mixtos de *Quercus-Pinus* en el Centro de México

Artículo de investigación que describe las relaciones filogenéticas, morfología, hospedero y distribución geográfica de una nueva especie de *Cordyceps*. El artículo fue enviado a la revista Mycologia.

Date: Mar 24, 2022
To: "Cristina Burrola-Aguilar" cba@hotmail.com
From: "Priscila Chaverri" priscila.chaverriechandi@ucr.ac.cr
Subject: (Mycologia) Your submission has been accepted

Ref: UMYC-2021-0114R3

Cordyceps mexicana sp. nov., parasitizing *Paradirphia* sp. moths; a new sister species of the *Cordyceps militaris* complex, distributed in Central Mexican *Quercus-Pinus* mixed forests
Mycologia

Dear C. Burrola-Aguilar,

Our reviewers have now considered your paper and have recommended publication in Mycologia. We are pleased to accept your paper in its current form which will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting. The reviewer comments are included at the bottom of this letter, along with those of the editor who coordinated the review of your paper.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course.

PLEASE NOTE: Your article will appear online in advance of print publication as soon as the page proofs are corrected and the copyright assignment form is on file. Papers with nomenclatural content will be considered effectively and validly published under the provisions of the "International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants" (Melbourne Code) when these final versions, i.e. the final page proofs, are published online.

The publisher also requests that proofs are checked through the publisher's tracking system and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for your contribution to Mycologia and we look forward to receiving further submissions from you.

Best regards,

Dr. Priscila Chaverri
Executive Editor
Mycologia

***Cordyceps mexicana* sp. nov., parasitizing *Paradirphia* sp. moths; a new sister species of the *Cordyceps militaris* complex, distributed in Central Mexican *Quercus-Pinus* mixed forests**

López-Rodríguez, Lorena^a, Burrola-Aguilar, Cristina^{a*}, Garibay-Orijel, Roberto^b, Estrada-Zúñiga, María Elena^a,
Matías-Ferrer, Noemí^c and Argüelles-Moyao, Andrés^b

^a Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex), Toluca, México; ^b Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México; ^c Instituto de Ecología A.C., Jalapa, México.

Corresponding author: *cba@uaemex.mx

Abstract

Cordyceps s.l. is a paraphyletic group of ascomycete fungi that exhibits multifunctional lifestyles, that is, as saprotrophs, endophytes, and pathogens of insects, spiders, fungi, and grasses. Cordycipitaceae includes macroscopically similar species that have been erroneously considered to be conspecific with *Cordyceps militaris*. In this study, we describe a new species within the *C. militaris* complex that is distributed in the *Quercus-Pinus* forests of central Mexico on the basis of its morphology, phylogenetic relationships, and life cycle. Phylogenetically, *Cordyceps mexicana* is a well-supported new sister species, of the *C. militaris* complex. It is distinguished by the morphology of its conidiophore, host association, and geographic distribution. This species parasitizes pupae of *Paradirphia* sp. (Lepidoptera: Saturniidae: Hemileucinae), and might be macroscopically confused with *C. militaris*. Its stromata are large, can measure up to 10 cm in length, and the fertile part is always bright yellow. This species develops whitish mycelial cords that emerge from the stromata and grow toward the host. Microscopically, it develops asci with filiform ascospores disarticulating in part-spores. Its life cycle and geographical distribution are also discussed.

Key words: Cordycipitaceae, diversity, Lepidoptera, life cycle, 1 new taxon

Introduction

Cordyceps s.l. is a paraphyletic group of ascomycete fungi that parasitize a wide variety of hosts, particularly the immature stages of Lepidoptera and Coleoptera (Shrestha *et al.*, 2016) and adults or underground nests of spiders (Chiriví *et al.*, 2017; Shrestha *et al.*, 2019); however, they are also fungal and plant pathogens (Sung *et al.*, 2007a, 2007b) and endophytes (Gazis *et al.*, 2014; Stone and Bidochka 2020).

Phylogenetic studies suggest that insects are the basal host in Hypocreales evolution and that associations with plants and fungal hosts developed later, due to host shifts as a result of ecological niche overlap of unrelated species (Nikoh and Fukatsu 2000; Spatafora *et al.*, 2007). However, phylogenetic studies in *Metarhizium* suggest that this species evolved from fungi that were plant associates and that their pathogenicity to insects is a more recently acquired adaptation (Barelli *et al.*, 2015).

Cordyceps s.l. includes more than 1000 species (Wang *et al.*, 2020). Phylogenetic analyses have demonstrated that this group includes three families: Clavicipitaceae, Ophiocordycipitaceae, and Cordycipitaceae (Sung *et al.*, 2007a, 2007b). Currently, Clavicipitaceae includes grass parasites, such as *Balansia*, *Epichloë*, and *Claviceps*, and insect parasites, such as *Metarhizium*. Ophiocordycipitaceae mainly includes *Ophiocordyceps*, that parasitize different orders of insects, and *Tolypocladium*, that comprises parasites of the fungal genus *Elaphomyces*, and some plant endophytes (Sung *et al.*, 2007b; Gazis *et al.*, 2014; Quandt *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2016; 2017; Kepler *et al.*, 2017; Mongkolsamrit *et al.*, 2018). Cordycipitaceae is the most complex family in Hypocreales (Wang *et al.*, 2020), that includes the genera *Akanthomyces*, *Ascopolyporus*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Engyodontium*, *Gibellula*, *Hyperdermium*, *Parengyodontium*, *Simplicillium*, *Hevansia*, *Blackwellomyces* (Kepler *et al.*, 2017), *Samsoniella* (Mongkolsamrit *et al.*, 2018), *Flavocillium*, *Liangia* (Wang *et al.*, 2020) and *Pleurodesmospora* (Chen *et al.*, 2021), that parasitize different orders of arthropods, present different sizes and forms of microscopic and macroscopic structures, that is stromata, perithecia, asci and part-spores, and conidiation (Wang *et al.*, 2020; Jia-Jun *et al.*, 2021).

Cordycipitaceae is characterized by teleomorphs that present erect stromata with a fleshy texture. Some have reduced stipe in the subiculate stromata, and their coloration is mainly bright, yellow, orange, or red, although there are pale or cream exceptions. The hosts are commonly found

in habitats such as leaf litter, moss, and uppermost soil layers (Sung *et al.*, 2007b). *Cordyceps militaris* is a species belonging to this family, which was previously considered conspecific to *Blackwellomyces cardinalis*, *B. pseudomilitaris*, *C. rosea*, and *C. roseostromata* (Sung and Spatafora 2004). However, multi-locus analysis of Cordycipitaceae shows that *Cordyceps militaris* constitutes a clade that is distant from *Blackwellomyces* (Sung *et al.*, 2007b; Kepler *et al.*, 2017). Currently, the most morphologically similar species that are phylogenetically close to *Cordyceps militaris* are *C. changchunensis*, *C. jingyuetanensis*, *C. changbaiensis* (Jia-Jun *et al.*, 2021), *C. shuifuensis*, *C. chaetoclavata* (Wang *et al.*, 2020), *C. kyusyuenensis* and *C. roseostromata* (Sung *et al.*, 2007b; Kepler *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020).

In Mexico, *C. militaris* is among the most frequent *Cordyceps* species named in fungal inventories, with the largest recorded number of collections and showing widest distribution. It has been reported in twelve states (Hidalgo, Morelos, Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Jalisco, Estado of México, Sinaloa, Michoacán, Nuevo León, Sonora, and Jalisco) in different forest types such as pine-oak, cloud mountain, tropical sub deciduous, tropical evergreen, *Abies*, *Tsuga* and *Picea*, low deciduous, and *Juniperus* scrub forests. This species has been found to parasitize pupae and larvae of Lepidoptera of the families Saturniidae, Geometridae, Noctuidae, and Sphingidae, as well as coleopteran adults (Pérez-Silva 1977, 1978; Rubio-Bustos *et al.*, 1999; Guzmán *et al.*, 2001; Pérez-Villamares *et al.*, 2017). This most likely represents a species complex that awaits revision, since its identification to date has only been achieved using morphological characteristics.

At different localities in southeastern Estado de Mexico, we found a species close to *C. militaris*, which parasitizes *Paradirphia lasiocampina* (Pérez-Villamares *et al.*, 2017). Therefore, the objective of this study was to elucidate the identity and phylogenetic position of this species within the Cordycipitaceae, and compare its morphological characteristics and host-association with those of related species.

Materials and methods

Study area and collections

Voucher specimens were collected from *Quercus-Pinus* forests in the municipality of Tenancingo, which is located in the southeast of Estado de México (INEGI 2009), in the months of Sep and Oct of 2015, 2018, and 2019. Directed sampling has been carried out since the reported abundance of

Cordyceps aff. militaris in this region (Pérez-Villamares *et al.*, 2017). Fungi and host specimens were collected by excavation and by removal of soil from the surface using a thin bristle brush. Non-parasitized pupae were collected for identification. The specimens were transported to the Centro de Investigación en Recursos Bióticos (CIRB) of the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex) for characterization and then dried with silica gel. Voucher specimens were deposited in the National Herbarium (MEXU) at the Institute of Biology of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). In total, 51 specimens were morphologically characterized: 26 were collected in this study and 25 were from the Centro de CIRB deposited by Pérez-Villamares *et al.* (2017).

Isolation

Multi-ascospore isolates were obtained from twenty different specimens. Isolation was performed at the time of collection using Petri dishes containing agar agar culture medium (AA) (HYCEL, Mexico). The fertile part of the stroma was placed inside the Petri dish which was covered with a sterile plastic to prevent contamination, while the host was left outside the dish. After 24 h, mycelia, with a diameter of 1 mm, were transferred to a sterile Petri dish with Sabouraud's dextrose agar medium (SDA) (MCD LAB, Mexico), with added yeast extract (Bioxon, Mexico): SDAY; dextrose 20 g, peptone 5 g, yeast extract 5 g, and agar 18 g, in 1 L distilled water, and incubated for 30 d at 25 C (Sung *et al.*, 2006). Liquid medium cultures were incubated in potato dextrose broth (PDB) (Difco, Sparks) at 25 C and 150 rpm for 7 d. The cultures were used to characterize the asexual spores. Conidiospores were observed in SDAY (n=20) and blastospores were observed in PDB (n=20). In addition, mycelia were used for DNA extraction.

Morphological characterization

Color descriptions of the stromata and cultures were produced using the color key in Kornerup *et al.* (1984). Microscopic characterization was performed on cultures, and fresh and dried collections, using diagnostic characters included in taxonomic treatments (Mains 1958; Kobayasi 1941, 1982; Sung *et al.*, 2007b). Dried collections were rehydrated for 1–2 min with 15% KOH and stained with Congo red or trypan blue for 5–8 min. We measured stroma length, both the fertile part and stipe (n=51), perithecium width and length (n=152), asci length (n=20), asci width (n=178), apical cap (n=20), ascospore width (n=100) and part-spore length and width (n=134). In

cultures vegetative hyphae width (n=20), conidiophores (n=20), phialides (n=20) and blastospores (n=20) were measured. Photographs were taken with a Motic Digital Microscope DMB3-223, NTSC System. Finally, the mean, standard error and range were calculated in Statgraphics Centurion XV Program.

DNA extraction, amplification and sequencing

DNA was extracted from three stromata using EXTRACT-N-AMP (Sigma Aldrich, Missouri), and from 20 isolates using the DNeasy PowerSoil kit (Qiagen, Maryland). For the stromata, 1–2 mm of dry tissue was collected. While for the isolates, a small amount of the outermost mycelium was taken with a sterile dissection needle, as well as fresh mycelium was filtered from the liquid cultures. Each sample was processed according to the manufacturer's instructions and the resulting DNA samples were stored at 2 C.

Five loci, the internal transcribed spacer (ITS) region, nuclear ribosomal large subunit (28S), first and second largest RNA polymerase II subunits (RPB1 and RPB2), and translation elongation factor 1- α (TEF), were amplified following the procedures described by Sung *et al.* (2001, 2007b). PCR reactions were performed with a 20 μ L master mix containing: 10 μ L of Ruby Taq Master (Jena Bioscience, Germany); 0.2 μ L of each primer 10 mM: ITS1Ff/ITS4 (ITS) (White *et al.*, 1990), LROR/LR5 (28S) (Vilgalys and Sun 1994), 983F/2218R (TEF) (Rehner and Buckley 2005), Crpb1-1aF/Crpb1-CaR (RPB1) (Castlebury *et al.*, 2004), fRPB2-5f2/fRPB2-7Cr (RPB2) (Liu *et al.*, 1999); 2 μ L of DNA 1:1 concentration for ITS, 1:10 for 28S, TEF, RPB1 and RPB2; and 7.6 μ L of ddH₂O. The PCR reactions for the cultures were performed with a 25 μ L master mix containing 5 μ L of Taq & load (Fisher scientific, Spain), 0.25 μ L of each primer, 1 μ L DNA [1:1] and 18.5 of ddH₂O. PCR was performed in a DNA thermocycler (Engine-BIO-RAD, California).

The PCR cycles for ITS amplification were as follows; 1 cycle of 95 C for 4 min and 35 cycles of 94 C for 1 min, 51 C for 1 min, 72 C for 1 min and finally 72 C for 10 min. For 28S amplification, 1 cycle of 94 C for 3 min and 35 cycles of 94 C for 1 min, 54 C for 1 min, 72 C for 2 min and finally 72 C for 7 min. For RPB1 and RPB2 amplification, 1 cycle of 94 C for 3 min and 38 cycles of 94 C for 30 s, 51 C for 1 min, 72 C for 2 min. For TEF amplification: 1 cycle of 94 C for 3 min and 10 cycles of 94 C for 30 s, 57 C for 1 min, and 72 C for 2 min, after 35 cycles of 94 C for 30 s, 52 C for 1 min, 72 C for 2 min, finally 72 C for 3 min.

PCR products were purified with a 1:1 mixture of ExoSAP-IT (ThermoFisher, Waltham) and ddH₂O; 2 µL of this mixture was added to 3.5 µL of the PCR product and incubated at 37 C for 45 min and at 80 C for 15 min in a thermocycler. The samples were sequenced in both directions using the Sanger technology in Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud of Instituto de Biología, UNAM.

Sequence editing and phylogenetic analysis

Sequences were edited and assembled in GENEIOUS PRIME 2022.0.1. and submitted into GenBank. These sequences and those of Cordycipitaceae used for phylogenetic analyses are listed in TABLE 1. The phylogenetic analyses included 99 taxa represented by at least two genes. Alignments were deposited in TreeBASE (ID: 29433; 29435). ITS alignment was performed using Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), 28S using MUSCLE (Edgar 2004), and alignments for RPB1, RPB2 and TEF were performed with MAFFT (Katoh and Toh 2010). Finally, each alignment was manually refined in Geneious. Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) were performed for each gene and for a five loci concatenated alignment, with a total of 3230 base pairs (501 bp ITS, 674 bp 28S, 562 bp RPB1, 805 bp RPB2 and 688 bp TEF). *Purpureocillium lilacinum* was used as an outgroup. Maximum Likelihood analysis was performed in Geneious with RAxML v. 8. (Stamatakis 2014) with partitioned data. Bootstrap support (MLBS) was calculated with 1000 rapid bootstrap replicates using the GTRGAMMA model. Subsequently, the Bayesian Inference was performed with Mr. Bayes 3.2.6 in the CIPRES portal (Miller *et al.*, 2010) with the Markov B-MCMC algorithm with 10 000 000 generations and four independent chains. The trees were sampled every 100 generations. The first 25% of trees was discarded as burn-in for the construction of the consensus tree and calculation of the posterior probabilities (PP).

Table 1. DNA sequences used in the phylogenetic analysis. Species, host, distribution, collection name and Genbank accessions of the different loci are indicated.

Species	Host	Country	Voucher	ITS	28S	TEF	RPB1	RPB2
<i>Akanthomyces attenuatus</i> ^{5, 10, 14, 17}	Leaf litter, <i>Acer saccharum</i>	USA	CBS 402.78	AJ292434	AF339565	EF468782	EF468888	EF468935
<i>Akanthomyces coccidioperitheciatus</i> ^{14, 17}	Araneae; spider	-	NHJ 6709	JN049865	EU369042	EU369025	EU369067	EU369086
<i>Akanthomyces coccidioperitheciatus</i> ¹⁴	Araneae; spider	-	NHJ 5112		EU369043	EU369026	EU369066	
<i>Akanthomyces lecanii</i> ^{10, 13, 17}	Hemiptera; <i>Coccus viridis</i>	West Indies	CBS 101247	JN049836	AF339555	DQ522359	DQ522407	DQ522466
<i>Akanthomyces lecanii</i> ^{5, 14}	-	-	spat 08-146		MF416528	MF416472	MF416634	MF416436

<i>Akanthomyces tuberculatus</i> ^{10, 17}	Lepidoptera	USA	OSC 111002	JN049830	DQ518767	DQ522338	DQ522384	DQ522435
<i>Akanthomyces tuberculatus</i> ^{14, 17}	Lepidoptera (adult)	USA	BCC 16819		MF416546	MF416490	MF416647	MF416444
<i>Ascopolyporus polychrous</i> ^{1, 14, 17}	Plant	Brazil	P.C. 546		DQ118737	DQ118745	DQ127236	
<i>Ascopolyporus villosus</i> ^{1, 14, 17}	Plant	Brazil	ARSEF 6355		AY886544	DQ118750	DQ127241	
<i>Beauveria acridophila</i> ¹⁵	Orthoptera; Acridomorpha	Colombia	AV1815	JQ958600	JQ895536	JQ958614	JX003852	JX003842
<i>Beauveria bassiana</i> ^{14, 17}	Lepidoptera; Arctiidae	Italy	ARSEF 1564			HQ880974	HQ880833	HQ880905
<i>Beauveria blattidicola</i> ¹⁴	Blattodea; Blattidae	Guyana	MCA 1727		MF416539	MF416483	MF416640	
<i>Beauveria blattidicola</i> ¹⁴	Blattodea; Blattidae	Guyana	MCA 1814		MF416540	MF416484	MF416641	
<i>Beauveria brongniartii</i> ¹⁷	Coleoptera; Scarabaeidae	Japan	ARSEF 617	NR111595		HQ880991	HQ880854	HQ880926
<i>Beauveria caledonica</i> ^{10, 11, 17}	Soil	Scotland	ARSEF 2567	HQ880817	AF339520	EF469057	EF469086	
<i>Beauveria diapheromeriphila</i> ¹⁵	Phasmatoptera; Diapheromeridae	Ecuador	QCNE 186372	JQ958599	JQ895534	JQ958610	JX003848	
<i>Beauveria diapheromeriphila</i> ^{14, 15}	Phasmatoptera; Diapheromeridae	Ecuador	QCNE 186714		MF416547	MF416491	MF416648	
<i>Beauveria locustiphila</i> ^{14, 15}	Orthoptera; Acridomorpha; Romaleidae; Colpolopha sinuata	Colombia	HUA 179218	JQ958606	JQ895535	JQ958619	JX003846	JX003845
<i>Beauveria locustiphila</i> ¹⁵	Acridomorpha; Romaleidae; Colpolopha sp.	Colombia	HUA 179217	JQ958609	JQ958597		JX003847	
<i>Beauveria malawiensis</i> ¹²	Coleoptera; Cerambycidae	Malawi	ARSEF 7760	HQ880825		DQ376246	HQ880897	HQ880969
<i>Beauveria pseudobassiana</i> ¹²	Lepidoptera; Tortricidae	USA	ARSEF 3405	NR111598		AY531931	HQ880864	HQ880936
<i>Beauveria scarabaeidicola</i> ^{10, 11, 13}	Coleoptera; Scarabaeidae (adult)	Korea	ARSEF 5689	JN049827	AF339524	DQ522335	DQ522380	DQ522431
<i>Beauveria staphylinidicola</i> ^{10, 14}	Coleoptera; Staphylinidae (pupa)	Japan, Korea	ARSEF 5718		EF468836	EF468776	EF468881	
<i>Blackwellomyces cardinalis</i> ^{7, 14}	Lepidoptera; Tineidae (larva)	Belize	OSC 93609		AY184962	DQ522325	DQ522370	DQ522422
<i>Blackwellomyces cardinalis</i> ^{7, 14}	Lepidoptera; Tineidae (larva)	Belize	OSC 93610	JN049843	AY184963	EF469059	EF469088	EF469106
<i>Blackwellomyces pseudomilitaris</i> ¹⁴	Lepidoptera (larva)	Thailand	BCC 1919		MF416534	MF416478		MF416440
<i>Blackwellomyces pseudomilitaris</i> ¹⁴	Lepidoptera (larva)	Thailand	BCC 2091		MF416535	MF416479		MF416441
<i>Cordyceps amoene-rosea</i> ⁸	Coleoptera (pupa)	-	CBS 107.73	MH860646	MF416550	MF416494	MF416651	MF416445
<i>Cordyceps amoene-rosea</i> ⁸	Coleoptera; Nitidulidae	Ghana	CBS 729.73	MH860794	MF416551	MF416495	MF416652	MF416446
<i>Cordyceps bifusispora</i> ^{3, 10, 17, 18}	Lepidoptera (pupa)	Sweden	EFCC 5690		EF468806	EF468746	EF468854	EF468909
<i>Cordyceps bifusispora</i> ^{10, 14}	Lepidoptera (pupa)	-	EFCC 8260		EF468807	EF468747	EF468855	EF468910
<i>Cordyceps bifusispora</i> ¹⁴	Lepidoptera (pupa)	-	spat 08-133		MF416524	MF416469	MF416631	MF416434
<i>Cordyceps brongniartii</i> ¹⁴	Coleoptera; Anomala cuprea	Japan	BCC 16585	JN049867	JF415967	JF416009	JN049885	JF415991
<i>Cordyceps cf. ochraceostromata</i> ^{10, 17, 18}	Lepidoptera	Japan	ARSEF 5691	JN049849	EF468819	EF468759		EF468921
<i>Cordyceps cf. pruinosa</i> ¹⁴	-	-	spat 08-115		MF416532	MF416476	MF416635	MF416439
<i>Cordyceps cf. pruinosa</i> ¹⁴	-	-	spat 09-021		MF416533	MF416477	MF416636	
<i>Cordyceps cf. takaomontana</i> ¹⁴	Lepidoptera	-	NHJ 12623		EF468838	EF468778	EF468884	EF468932
<i>Cordyceps cf. takaomontana</i> ^{14, 17}	Lepidoptera	-	BCC 12688	EU807996			MF416646	

<i>Cordyceps chaetoclavata</i> ¹⁹	Lepidoptera (pupa)	China	YHH 15101		MN576778			MN576838
<i>Cordyceps changbaiensis</i> ²¹	Lepidoptera (larva)	China	HMJAU 48259	MW893251	MW893276		MZ616773	
<i>Cordyceps changchunensis</i> ²¹	Lepidoptera (pupa)	China	HMJAU 48255	MW893252	MW893277		MZ616772	
<i>Cordyceps cocoonihabita</i> ¹⁹	Lepidoptera; Limacodidae (pupa)	China	YFCC 3415		MN576779	MN576949	MN576839	MN576895
<i>Cordyceps coleopterorum</i> ¹³	Coleoptera (larva)	-	CBS 110.73		JF415988	JF416028	JN049903	JF416006
<i>Cordyceps exasperata</i> ¹⁴	Lepidoptera	-	MCA 2155		MF416542	MF416486	MF416643	
<i>Cordyceps exasperata</i> ¹⁴	-	-	MCA 2288		MF416538	MF416482	MF416639	
<i>Cordyceps farinosa</i> ^{10, 14}	Lepidoptera (pupa)	-	OSC 111004		EF468840	EF468780	EF468886	
<i>Cordyceps cf. farinosa</i> ^{10, 14}	Lepidoptera (pupa)	-	OSC 111005			DQ522348	DQ522394	
<i>Cordyceps cf. farinosa</i> ^{10, 14}	Lepidoptera (pupa)	-	OSC 111006		EF469080	EF469065	EF469094	
<i>Cordyceps fumosorosea</i> ¹⁴	-	-	CBS 337.52	MH857067	MF416555	MF416500	MF416657	MF416451
<i>Cordyceps fumosorosea</i> ^{8, 14}	Food	Japan	CBS 375.70		AB083035	MF416501	MF416658	MF416452
<i>Cordyceps inthanonensis</i> ¹⁸	Lepidoptera (pupa and larva)	Thailand	BCC 56302	MT000705	MT003040	MT017853	MT017814	MT017831
<i>Cordyceps javanica</i> ^{8, 14}	Coleoptera; <i>Stephanoderis hampei</i>	Indonesia	CBS 134.22	NR111172	MF416558	MF416504	MF416661	
<i>Cordyceps jingyuetanensis</i> ²¹	Lepidoptera	China	HMJAU 48253	MW893253	MW893278		MZ616770	
<i>Cordyceps kintrischica</i> ¹⁴	Coleoptera; <i>Angelastica alni</i> (adult)	Georgia	ARSEF 7218		EU553278			GU734751
<i>Cordyceps kintrischica</i> ¹⁴	Coleoptera; <i>Angelastica alni</i> (adult)	Georgia	ARSEF 8058		GU734764			GU734750
<i>Cordyceps kyushuensis</i> ^{10, 14}	Lepidoptera (pupa)	Japan	EFCC 5886		EF468813	EF468754	EF468863	EF468917
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> sp. (pupa)	Mexico	IE5031	MN709084	MN709061	MZ494670	MZ484382	
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> sp. (pupa)	Mexico	MEXU29955	MN709088*	MN709062*	MZ494672*	MZ484384*	
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> sp. (pupa)	Mexico	IE5033	MN709087	MN709063	MZ494671	MZ484383	
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> sp. (pupa)	Mexico	IE5030	MN709086	MN709064		MZ484381	
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> sp. (pupa)	Mexico	MEXU29956	MN709085		MZ494673	MZ598512	
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> sp. (pupa)	Mexico	MEXU29959	MN709065				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> sp. (pupa)	Mexico	MEXU29958	MN709066				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> sp. (pupa)	Mexico	MEXU29961	MN709078				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> sp. (pupa)	Mexico	MEXU29962	MN709073				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> sp. (pupa)	Mexico	MEXU29963	MN709079				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> sp. (pupa)	Mexico	MEXU29964	MN709077				

<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> (pupa)	sp. Mexico	MEXU2996 5	MN70907 2				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> (pupa)	sp. Mexico	MEXU2996 7	MN70907 1				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> (pupa)	sp. Mexico	MEXU2996 8	MN70907 3				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> (pupa)	sp. Mexico	MEXU2996 9	MN70906 7				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> (pupa)	sp. Mexico	MEXU2997 0	MN70907 6				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> (pupa)	sp. Mexico	MEXU2997 1	MN70906 8				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> (pupa)	sp. Mexico	MEXU2997 2	MN70906 9				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> (pupa)	sp. Mexico	MEXU2997 3	MN70907 4				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> (pupa)	sp. Mexico	MEXU2997 4	MN70908 0				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> (pupa)	sp. Mexico	MEXU2997 5	MN70908 1				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> (pupa)	sp. Mexico	MEXU2997 6	MN70908 2				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> (pupa)	sp. Mexico	MEXU2997 7	MN70907 0				
<i>Cordyceps mexicana</i>	Lepidoptera; <i>Paradirphia</i> (pupa)	sp. Mexico	MEXU2997 8	MN70907 5				
<i>Cordyceps militaris</i> ^{10, 14}	Lepidoptera (pupa)	-	OSC 93623	JN049825	AY184966	DQ522332	DQ522377	AY54573 2
<i>Cordyceps militaris</i> ¹²	Lepidoptera (pupa)	USA, NewYork	ARSEF 5050	HQ880829			HQ880901	HQ88097 3
<i>Cordyceps ninchukispora</i> ^{10, 14}	Lepidoptera; Limacodidae (pupa)	Taiwan	NHJ 10684		EF468823	EF468761	EF468871	
<i>Cordyceps ninchukispora</i> ^{10, 14}	Lepidoptera; Limacodidae (pupa)	Taiwan	NHJ 10627		EF468822	EF468763	EF468870	
<i>Cordyceps ningxiaensis</i> ^{16, 19}	Diptera (pupa)	China	HMJAU 25076	KF309670	KF309673			
<i>Cordyceps oncoperae</i> ^{10, 14}	Lepidoptera; <i>Oncopera</i> <i>intricate</i>	Tasmania	AFSEF 4358		AF339532	EF468785	EF468891	EF468936
<i>Cordyceps piperis</i> ^{6, 14}	Hemiptera; scale insects on <i>Piper</i> sp.	Panama	CBS 116719		AY466442	DQ118749	DQ127240	EU369083
<i>Cordyceps polyarthra</i> ¹⁴	-	-	MCA 996		MF416543	MF416487	MF416644	
<i>Cordyceps polyarthra</i> ¹⁴	-	-	MCA 1009		MF416544	MF416488	MF416645	
<i>Cordyceps pruinoso</i> ^{10, 13, 14}	Lepidoptera; Limacodidae; <i>Iragoides</i> <i>fasciata</i>	China	ARSEF 5413	JN049826	AY184968	DQ522351		DQ52245 1
<i>Cordyceps rosea</i> ¹⁴	Lepidoptera	Japan	spat 09-053	AF339523	MF416536	MF416480	MF416637	MF41644 2
<i>Cordyceps roseostromata</i> ¹⁹	Larva, not specified	Japan	ARSEF 4871	AY245637				
<i>Cordyceps shuifuensis</i> ¹⁹	Lepidoptera (pupa)	China	YFCC 5230		MN57677 7	MN576947	MN576837	MN57689 3
<i>Cordyceps takaomontana</i> ¹⁴	-	-	MCA 1806		MF416541	MF416485	MF416642	

<i>Cordyceps tenuipes</i> ^{10, 14}	Lepidoptera (pupa)	-	OSC 111007	DQ518773	DQ522349	DQ522395	DQ522449	
<i>Cordyceps tenuipes</i> ¹⁴	Lepidoptera (pupa)	USA	ARSEF 5135	AY624196	JF415980	JF416020	JN049896	JF416000
<i>Engyodontium araneorum</i> ^{10, 14}	Araneae; spider		CBS 309.85	JN036556	AF339526	DQ522341	DQ522387	DQ522439
<i>Engyodontium araneorum</i> ^{5, 10, 14}	Araneae; spider	Begoro, Ghana	CBS 726.73a		AF339537	EF468781	EF468887	EF468934
<i>Gibellula longispora</i> ¹⁴	Araneae; spider	-	NHJ 12014			EU369017	EU369055	EU369075
<i>Gibellula pulchra</i> ^{2, 14}	Araneae; spider	Burbank, USA	NHJ 10808		EU369035	EU369018	EU369056	EU369076
<i>Gibellula ratticaudata</i> ^{4, 10, 14}	Araneae; spider	Solomon Islands, Honiara	ARSEF 1915		DQ518777	DQ522360	DQ522408	DQ522467
<i>Hevansia arachnophila</i> ¹⁴	Araneae; spider	-	NHJ 10469		EU369031	EU369008	EU369047	
<i>Hevansia arachnophila</i> ¹⁴	Araneae; spider	-	BCC 16025		MF416548	MF416492	MF416649	
<i>Hevansia cinerea</i> ¹⁴	Araneae; spider	-	NHJ 3510			EU369009	EU369048	EU369070
<i>Hevansia nelumboides</i> ¹⁴	Araneae; spider	-	BCC 2093		MF416530	MF416473		MF416437
<i>Hevansia novoguineensis</i> ¹⁴	Araneae; spider	-	NHJ 4314			EU369012	EU369051	EU369071
<i>Hevansia novoguineensis</i> ¹⁴	Araneae; spider	-	NHJ 11923		EU369032	EU369013	EU369052	EU369072
<i>Hyperdermium pulvinatum</i> ¹⁴	Hemiptera; scale insect	-	P.C. 602		DQ118738	DQ118746	DQ127237	
<i>Isaria cicadae</i> ¹⁴	Hemiptera	-	HP 090724-31	MF416552	MF416496	MF416653	MF416447	
<i>Lecanicillium antillanum</i> ^{5, 10, 14, 17}	Fungi; Agaric (Hymenomycetes)	Santiago de las Vegas, Cuba	CBS 350.85	MH861888	AF339536	DQ522350	DQ522396	DQ522450
<i>Lecanicillium fusisporum</i> ^{5, 10, 17}	Fungi; <i>Coltricia perennis</i>	Netherlands	CBS 164.70	MH859538	AF339549	EF468783	EF468889	
<i>Lecanicillium psalliotae</i> ^{5, 10}	Soil	India	CBS 532.81	JN049846	AF339560	EF469067	EF469096	EF469112
<i>Lecanicillium psalliotae</i> ^{5, 10}	Soil	UK	CBS 101270		EF469081	EF469066	EF469095	EF469113
<i>Pleurodesmospora lepidopterorum</i> ²⁰	Lepidoptera (pupa)	China	NBRC 100741	MW826576		MW834317	MW834315	MW834316
<i>Samsoniella alboaurantium</i> ^{14, 19}	Lepidoptera (pupa)	Tropical region	CBS 240.32	MH855305	JF415979	JF416019	JN049895	JF415999
<i>Simplicillium lamellicola</i> ^{5, 10, 14}	Soil	U.K.	CBS 116.25	MH854806	AF339552	DQ522356	DQ522404	DQ522462
<i>Simplicillium lanosoneum</i> ^{5, 10, 14}	Fungi; <i>Hemileia vastatrix</i>	Jamaica	CBS 101267		AF339554	DQ522357	DQ522405	DQ522463
<i>Simplicillium obclavatum</i> ^{5, 10, 14}	Air above sugarcane field	Kamal, India	CBS 311.74	MH860859	AF339517	EF468798		
<i>Torrubiella wallacei</i> ^{5, 10, 14}	Lepidoptera	Indonesia	CBS 101237	NR111267	AY184967	EF469073	EF469102	EF469119
Grupo externo: <i>Purpureocillium lilacinum</i> ^{9, 10, 17, 20}	Nematoda; <i>Meloidogyne</i> sp.	Philippines	CBS 431.87	AY624188	EF468844	EF468791	EF468897	EF468940

¹Möller (1901); ²Mains (1950); ³Eriksson (1982); ⁴Humber and Rombach (1987); ⁵Zare and Gams (2001); ⁶Bischoff *et al.* (2004); ⁷Sung and Spatafora (2004); ⁸Luangsa ar *et al.* (2005); ⁹Luangsa ar *et al.* (2011); ¹⁰Sung *et al.* (2007b); ¹¹Glare *et al.* (2008); ¹²Rehner *et al.* (2011); ¹³Kepler *et al.* (2012); ¹⁴Kepler *et al.* (2017); ¹⁵Sanjuan *et al.* (2014); ¹⁶Yan and Bau (2015); ¹⁷Mongkolsamrit *et al.* (2018); ¹⁸Mongkolsamrit *et al.* (2020); ¹⁹Wang *et al.* (2020); ²⁰Chen *et al.* (2021); ²¹Jia-Jun *et al.* (2021).

The codes in bold are the sequences obtained in this study; *: Indicates the sequences of the holotype; -: Information not provided in reference.

Host identification

Five unparasitized pupae were collected in Sep 2019 and kept for 7–8 mo in plastic containers with 1 mm diameter holes covered with filter paper in dark conditions at room temperature. The pupae were moistened every four to five days with approximately 2–4 mL of sterile distilled water. When

the adults emerged, they were left free in a closed room for approximately 5 h in order to observe the imago. They were then kept frozen for subsequent identification (Lemaire and Wolfe 1988; Wolfe 1994; Balcazar-Lara 1999; James *et al.*, 2017). The specimens were deposited in UNAM's Colección Nacional de Insectos (CNIN).

Results

In this study, 51 specimens, similar to *C. militaris*, were found to parasitize the pupal stage of a moth belonging to the genus *Paradirphia* (family Saturniidae, Hemileucinae). The specimens were found in oak and mixed oak-pine forests. Their stromata emerged from the soil between the leaf litter and the host buried at a depth of 2 to 5 cm.

A total of 37 sequences were obtained from the fungal vouchers: 24 from ITS, 4 from 28S, 4 from RPB1, 1 from RPB2, and 4 from TEF. The five gene of ML and BI phylogenetic analyses showed that these samples belong to a new taxon, sister to the *Cordyceps militaris* complex (*C. changbaiensis*, *C. changchunensis*, *C. jingyuetanensis*, *C. kyusyuensis*, *C. militaris*, *C. ningxiaensis*, *C. oncoperae*, *C. roseostromata* and *C. shuifuensis*) with strong statistical support (MLBS=100; PP=1), (TreeBASE: 29433), (FIG. 1 and SUPPLEMENTARY MATERIAL 1). *Cordyceps mexicana* sp. nov. (FIG. 2) is therefore proposed as a new species parasitic on *Paradirphia* sp. (Lepidoptera: Saturniidae) (FIG. 3).

Taxonomy

Cordyceps mexicana L. López-Rodríguez, C. Burrola-Aguilar & R. Garibay-Orijel, sp. nov. (FIG. 2).

Mycobank: 842164

Typification: MEXICO, Estado de México, Tenancingo 2,200 masl, in soil parasitizing buried pupae of *Paradirphia* sp. (Lepidoptera), Oct 2015, L. López-Rodríguez (**Holotype**, MEXU 29955). Ex-type culture IE5030. GenBank: ITS = MN709088; 28S = MN709062; TEF = MZ494672; RPB1 = MZ484384; RPB2 = MZ598512

Etymology: *mexicana* in reference to its distribution in Mexico.

Additional specimens examined: MEXICO, Estado de México, Tenancingo, Oct 2015, L. López Rodríguez (**Isotype**, MEXU 29957); Aug 2015, J.C. Pérez-Villamares (MEXU 29956); Oct 3,

2015, *L. López Rodríguez* (MEXU 29975, MEXU 29976, MEXU 29977, MEXU 29978); Aug 30, 2018, *L. López-Rodríguez* (MEXU 29959, MEXU 29960, MEXU 29961); Sep 20, 2018, *L. López-Rodríguez* (MEXU 29962, MEXU 29963, MEXU 29964, MEXU 29965, MEXU 29966); Oct 10, 2018, *L. López Rodríguez* (MEXU 29981, MEXU 29982, MEXU 29983); Sep 13, 2019, *L. López Rodríguez* (MEXU 29967, MEXU 29968, MEXU 29969, MEXU 29970, MEXU 29971, MEXU 29972, MEXU 29973, MEXU 29974); Oct 30, 2014, *J.C. Pérez-Villamares* (AMCIRB 123); Sep 18, 2014, *J.C. Pérez-Villamares* (AMCIRB 182, AMCIRB 184, AMCIRB 186, AMCIRB 187, AMCIRB 189, AMCIRB 198, AMCIRB 201, AMCIRB 203. MÉXICO). Estado de México, Ocuilan, Aug 27, 2014, *J.C. Pérez-Villamares* (AMCIRB 137, AMCIRB 139); Sep 08, 2014, *J.C. Pérez-Villamares* (AMCIRB 211, AMCIRB 214, AMCIRB 216 AMCIRB 221, AMCIRB 222, AMCIRB 223. MEXICO). Estado de México, Villa Guerrero, Sep 03, 2014, *J.C. Pérez-Villamares* (AMCIRB 144, AMCIRB 147, AMCIRB 156). Estado de México, Villa Guerrero, Oct 16, 2014, *J.C. Pérez-Villamares* (AMCIRB 227, AMCIRB 229, AMCIRB 230, AMCIRB 235, AMCIRB 236). Living cultures deposited at INECOL (Instituto de Ecología), Xalapa, MEXICO, IE5030, IE5031, IE5030. Isolates deposited in the CIRB, UAEMex Co2, Co10, Co11, Co13, Co14, Co15, Co16, Co17, Co21, Co22, Co23, Co24, Co25, Co27, Co29, Co30, Co32, Co33, Co35, Co37.

Known distribution: Estado de México, Mexico, in oak and mixed oak-pine forests.

Diagnosis: The species is similar to *C. militaris*. Stromata were solitary or gregarious, fleshy, claviform, or cylindrical up to 10 cm in length, emerging from the pupal head; the fertile part was always bright yellow. Whitish mycelial cords emerged from the stromata to the host. Perithecia was fully immersed and large (up to 1,060 μm) with cylindrical asci (up to 805 μm in length). The host was *Paradirphia* sp. pupae (Lepidoptera).

Description: Stromata claviform or cylindrical, 2.0–10.2 (4.2 ± 0.2) cm in length, sometimes with a vertical cleft in the middle of the stromata or forked in the apical part, solitary or gregarious with 1–5 stromata and fleshy. Stipe elongated, 0.5–8.5 (2.9 ± 0.2) cm in length, light yellow (30/A5/A4), with vertical position relative to the host. Fertile part was 0.5–3.0 (1.3 ± 0.01) mm in length, bright yellow (30/A8/A7), with whitish mycelial cords emerging from the stromata to the host. Compact or cavernous context, ovoid and sub-ovoid perithecia, 196–1060 (612.8 ± 15.14) \times 97–508 (271 ± 7.5) μm , was completely immersed in the stromata (FIG. 2b). Asci cylindrical, 223–805 μm in length, 2–7 (4.5 ± 0.07) μm in width (FIG. 2f, i), with subglobose forked cap, 3–5 μm diameter

(FIG. 2g). The asci contain multi-septa filiform ascospores, $(0.5\text{--}1.5 (1.0 \pm 0.02) \mu\text{m})$, that disarticulate into part-spores, $1\text{--}1.5 (1.0 \pm 0.02) \times 2\text{--}8 (4.0 \pm 0.08) \mu\text{m}$ (FIG. 2f). Ascospores show asynchronous maturation. In immature asci, no ascospores are observed, and their morphology is similar to that of arthrospores, but septa are not completely formed (FIG. 2i). In some specimens, perithecia contained irregular fusiform structures, $2\text{--}9.5 (4.6 \pm 0.17) \times 8\text{--}38 (18.22 \pm 0.8) \mu\text{m}$, (FIG. 2d) of unknown function.

Culture characteristics: Colonies in SDAY at 25 C (FIG. 2e) slow growing, circular or semicircular at 15 mm/10 d diameter, light yellow (30/A4) in the center and cream to white (30/A3/A2/ A1) in the outmost part, reverse deep light yellow to bright yellow, pigmentation diffused in agar (30/A7), cottony and fibrous margin. Vegetative hyaline hyphae $1.0\text{--}2.5 \mu\text{m}$ in width, septate and branched. Conidiophores simple or compound with three to five phialides $12.0\text{--}7.0 \times 1\text{--}3.5 \mu\text{m}$ (FIG. 2h). Each phialide supporting a warty and globose conidium. Conidia $3.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$ diam and blastoconidia (FIG. 2c) developing in potato dextrose broth (PDB). In SDAY only conidiospores were observed. Conidial arrangement is Isaria-like.

Host: Stromata emerging from the apical part of the pupal head of *Paradirphia* sp., Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae (FIG. 3), which is buried in the upper soil layer, at approximately 2 to 5 cm in depth. The mycelium in the host forms sclerotia.

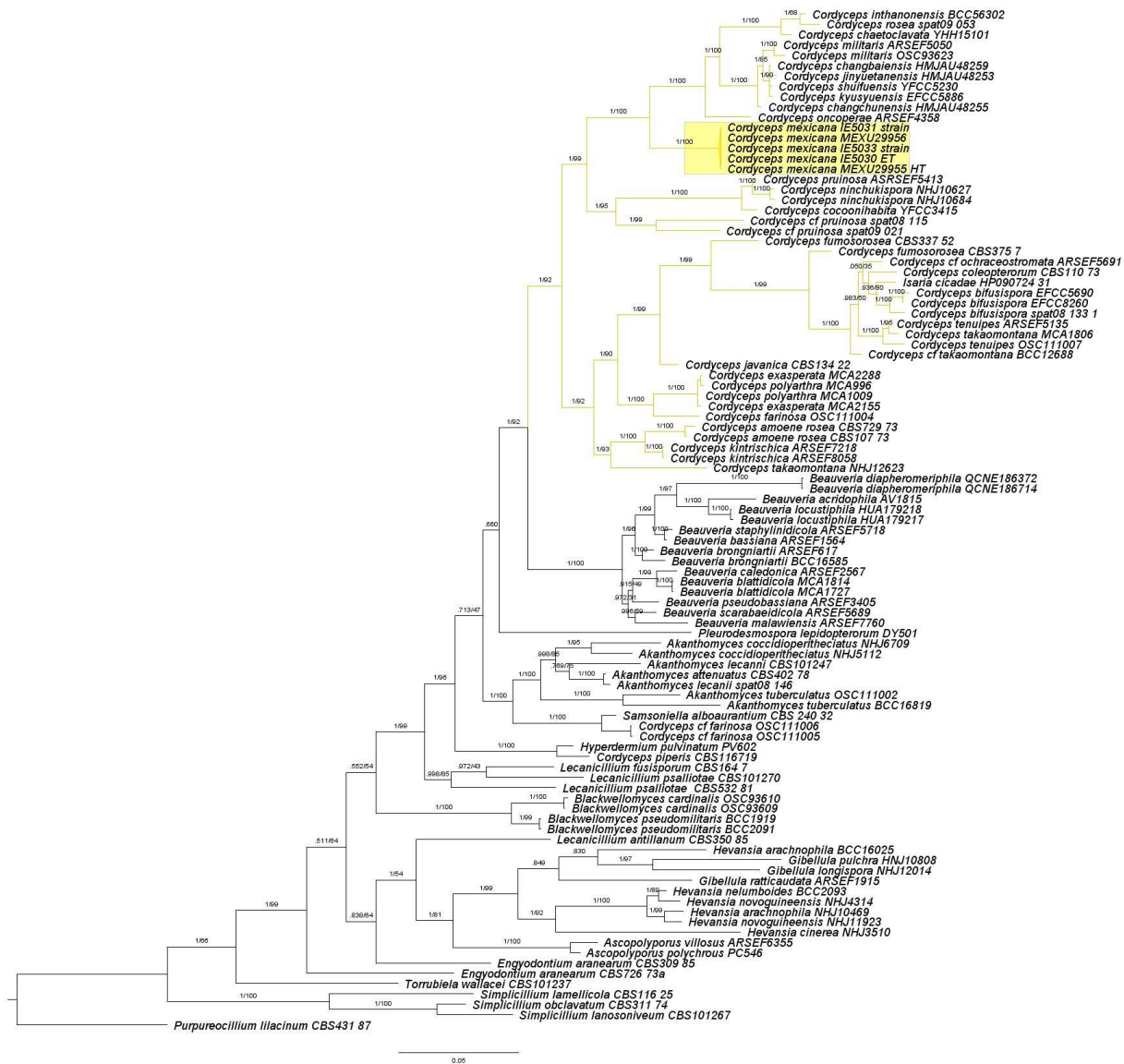


FIG. 1. Phylogenetic relationships of Cordycipitaceae inferred from Maximum Likelihood and Bayesian Analyses. Analysis were performed with a concatenated alignment of the ITS, 28S, RPB1, RPB2 and TEF loci. *Purpureocillium lilacinum* was used as the outgroup. Numbers in the branches indicate the Bayesian probability (PP) and the Bootstrap support (ML). The yellow shaded part highlights the clade *Cordyceps mexicana* sp. nov. The yellow branches highlight the clade *Cordyceps sensu stricto*.

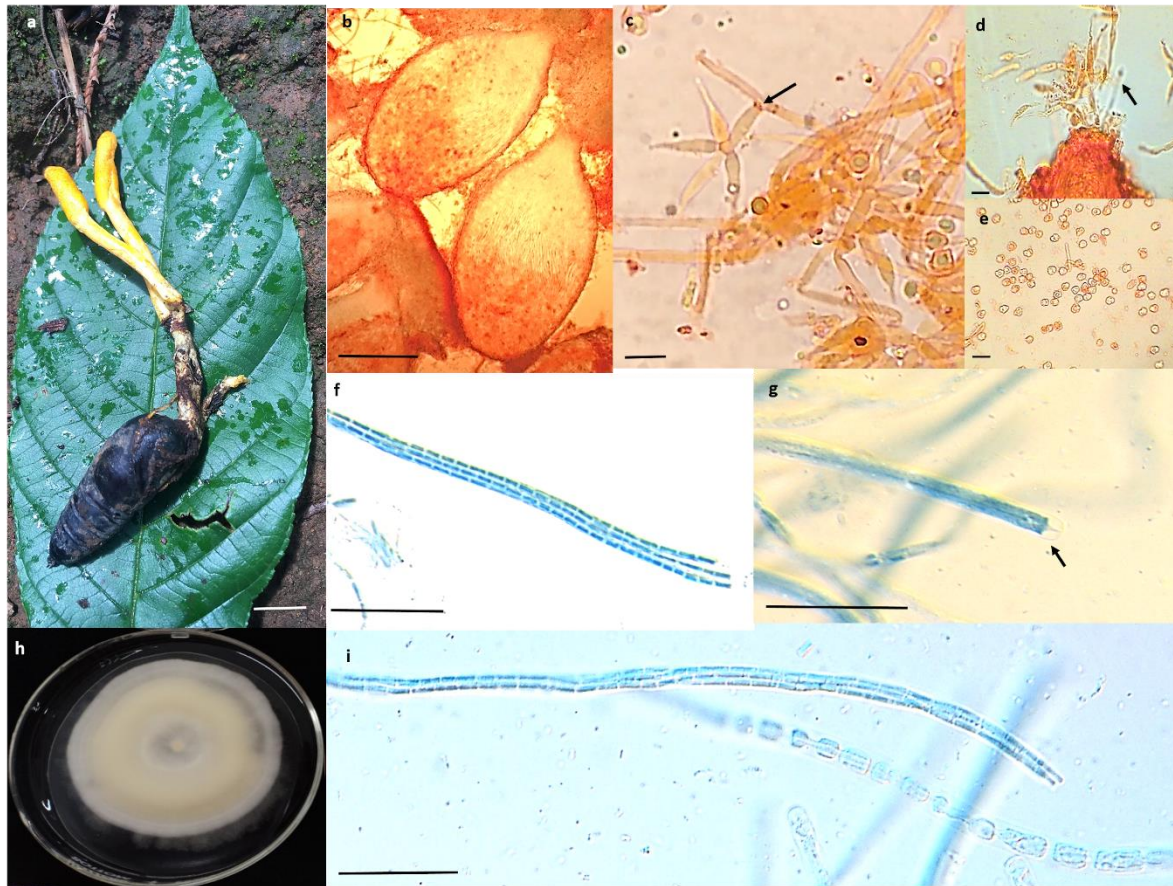


FIG. 2. (a) *Cordyceps mexicana* sp. nov. emerging from the pupae of *Paradirphia* sp. (Lepidoptera: Saturniidae), Bar=20 mm, (b) subovoid perithecia, Bar=200 μ m, (c) conidiophore, Bar=10 μ m (d) release of irregular sub-fusiform structures through the ostiole, Bar=10 μ m, (e) conidiospores, Bar=15 μ m, (f) segment of asci with disarticulated ascospores in part-spores, Bar=20 μ m, (g) subglobose forked cap, Bar=20 μ m, (h) colony growth on Sabouraud dextrose agar medium (SDAY), Bar=5 μ m, (i) immature asci (above), mature asci (below) in which filiform ascospores in part-spores are observed, Bar=20 μ m.

Notes: In this study, the phylogenetic position of *C. mexicana* within the Cordycipitaceae was strongly supported (FIG. 1, MLBS=100; PP=1). *C. mexicana* is well supported in a sister clade to the *C. militaris* complex, which includes *C. changbaiensis*, *C. changchunensis*, *C. jingyuetanensis*, *C. kyusyuensis*, *C. militaris*, *C. ningxiaensis*, *C. oncoperae*, *C. roseostromata* and *C. shuifuensis*, according to the five gene phylogenetic analysis. According to ITS analysis (SUPPLEMENTARY MATERIAL 2, 3), *C. kirkii* and *C. submilitaris* are sisters of *C. mexicana* sp. nov.

C. mexicana sp. nov. was found to be morphologically similar to *C. militaris* with shared characteristics including bright yellow, clavate, and cylindrical stromata with a fleshy texture, cylindrical asci, and filiform ascospores. Other species morphologically similar to *C. militaris* were

C. changbaiensis, *C. changchunensis*, *C. jingyuetanensis*, and *C. kyusyuensis* (TABLE 2). In addition, this clade had a prevail parasitic relationship with immature Lepidoptera (TABLE 3).

The host *Paradirphia* sp. has a univoltine cycle, which was determined by observing the adult and pupal stages. Host identification was performed at the genus level, because host specimens do not correspond to any known *Paradirphia* in Mexico. The pupal stage lasts for 7–8 mo, from Sep to Apr–May, when adults emerge. Therefore, it is inferred that reproduction, oviposition, and larval stages all occur from May to Aug. *C. mexicana* stromata emerged from pupae from Aug to Oct (autumn period). Moreover, we determined that the fungal invasion period lasted from Sep to Aug–Oct (FIG. 4).

Table 2. Morphological comparison of similar species and *Cordyceps militaris* complex.

Species	Stromata size (mm)	Color of Stromata	Perithecia size (μm)	Asci size (μm)	Ascospores size (μm number)	Ascospores or septation	Partspore size (μm)
<i>Cordyceps mexicana</i>	20–102 × 5–10	Bright yellow	196–1060 × 97–508	223–805 × 2.3–7.4	Width: 0.4 – 1.5	Multiseptate	2.1–8.1 × 0.8–1.5
<i>C. changbaiensis</i> ^{7*}	6–15 × 2–6	White to orange	120–230 × 90–170	225–625 × 4–5	3.0–7.0 × 1.0–1.4	Multiseptate	-
<i>C. changchunensis</i> ^{7*}	24–45	Light to orange	180–600 × 180–520	80–300 × 2.5–5	8 spored	Multiseptate	2.6–6 × 1.0–1.4
<i>C. jingyuetanensis</i> ^{7*}	40–45	Orange to light red	220–340 × 110–220	225–475 × 3–5	8 spored	Multiseptate	2.8–5 × 1–1.4
<i>C. kirkii</i> ^{1*}	5–8 × 10–15	Pale brown	700–800 × 150–170	165–210 × 5–6	80–120 × 1–1.5	Nondisarticulating	6 × 1–1.5
<i>C. kyusyuensis</i> ^{3*}	15–20 × 20	Bright yellow	410–580 × 210–330	Width: 4	-	Multiseptate	4–5 × 1
<i>C. militaris</i> ^{4*}	8–70 × 15–60	Yellow, orange, reddish	500–720 × 300–480	300–510 × 3.5–5	-	Multiseptate	2–4.5 × 1–1.5
<i>C. ningxiaensis</i> ^{5*}	1.2–3 × 1.2–2.8	Orange	288–400 × 103–240	168–205 × (3.7–)4.1–5.5(–6.6)	-	Irregularly multiseptate	3.6–7.8 × 1.0–1.4
<i>C. rosea</i> ^{4*}	11 × 1	Orange to reddish	330–380 × 160–230	100 × 3–5	120 × 1–1.5	8–10 septate	NA
<i>C. roseostromata</i> ^{7*}	12–50 × 15–22	Orange to white	280–300 × 140–160	3–3.5 × 2.5–3	4–5 × 1	-	-
<i>C. shuifuensis</i> ⁶	25	Yellowish to orange	450–620 × 300–430	275–510 × 3.5–5.2	180–410 × 1.2–1.7	Multiseptate	2.8–6.5
<i>C. submilitaris</i> ^{2*}	20–30	Brown, reddish	300–420 × 3–4	-	Width: 0.5	Multiseptate	2–4

¹Cunningham (1922); ²Mains (1940); ³Kobayasi (1981); ⁴Sung and Spatafora (2004); ⁵Yan and Bau (2015); ⁶Wang et al. (2020); ⁷Jia-Jun et al. (2021).

*: Indicate species of the *Cordyceps militaris* complex; NA-not applicable; -: Information not provided in original description.

Table 3. *Cordyceps militaris* complex hosts and distribution.

Species	Host				Distribution	
	Stage	Order	Family	Genera/Species		
<i>C. changbaiensis</i> ¹²	Larvae	Lepidoptera	-	-	China	
<i>C. changchunensis</i> ¹²	Pupae	Lepidoptera	-	-	China	
<i>C. jingyuetanensis</i> ¹²	Pupae	Lepidoptera	-	-	China	
<i>C. kirkii</i> ¹	Imago	Orthoptera	Anostomatidae	<i>Deinacrida rugosa</i>	New Zealand	
<i>C. kyusyuensis</i> ^{4,7}	Larvae	Lepidoptera	Sphingidae	<i>Clanis biliniata</i>	Japan	
<i>Cordyceps mexicana</i>	Pupae	Lepidoptera	Saturniidae	<i>Paradirphia</i> sp.	Center of Mexico	
			Larvae and pupae	Hepialidae		<i>Hepialus</i> sp.
			Bombycidae	<i>Bombyx mori</i>		
			Endromidae	<i>Andraca bipunctata</i>		
			Erebidae	<i>Calliteara pudi, Leucoma salicis</i>		
			Drepanidae	<i>Achlya flavicornis, Ochropacha duplaris, Tethea ocularis, Tetheella fluctuosa</i>		
			Geometridae	<i>Biston panterinaria, Lycia hirtaria</i>		
			Lasiocampidae	<i>Dendrolimus pini, D. superans, Macrothylacia rubi</i>		
			Noctuidae	<i>Arcte coerulea, Colocasia coryli, Euxoa ochrogaster, Panolis flammea</i>		
			Notodontidae	<i>Fentonia ocypete, Lampronadata cristata, Phalera assimilis, P. bucephala, Syntypistis punctatella</i>		
<i>C. militaris</i> ^{3,9}	Larvae	Coleoptera	Saturniidae	<i>Anisota senatoria</i>	North America; South of America; Europe; Asia	
			Sphingidae	<i>Callambulyx tatarinovii, Laothoe populi, Marumba sperchius, Mimas tiliae, Hyles euphorbiae, Sphinx pinastri</i>		
			Curculionidae	<i>Ips sexdentatus</i>		
			Tenebrionidae	<i>Tenebrio molitor</i>		

		Diptera			
		Hymenoptera			
<i>C. ningxiaensis</i> ¹⁰	Pupae	Diptera	-	-	China
<i>C. oncoperae</i> ⁶	Larvae	Lepidoptera	Hepialidae	<i>Oncopera intricata</i>	Tasmania, Australia
<i>C. rosea</i> ⁸	Larvae	Lepidoptera	-	-	Japan
<i>C. roseostromata</i> ⁵	Larvae	Coleoptera	-	-	Japan
<i>C. shuifuensis</i> ¹¹	Pupae	Lepidoptera	-	-	China
<i>C. submilitaris</i> ²	Larvae	Coleoptera	-	-	Honduras

¹Cunningham (1922); ²Mains (1940); ³Mains (1958); ⁴Kobayasi (1981); ⁵Kobayasi (1983); ⁶Yip and Rath (1989); ⁷Guo and Li (2000); ⁸Sung and Spatafora (2004); ⁹Shrestha et al. (2016); ¹⁰Yan and Bau (2015); ¹¹Wang et al. (2020); ¹²Jia-Jun et al. (2021).

-: Information not provided.



FIG. 3. *Paradirphia* sp. (Lepidoptera; Saturniidae; Hemileucinae), host of *Cordyceps mexicana*. (a) pupae, Bar=10 mm (b) male with bipectinate antennae, Bar=30 mm, (c) female with filiform antennae, Bar=20 mm.

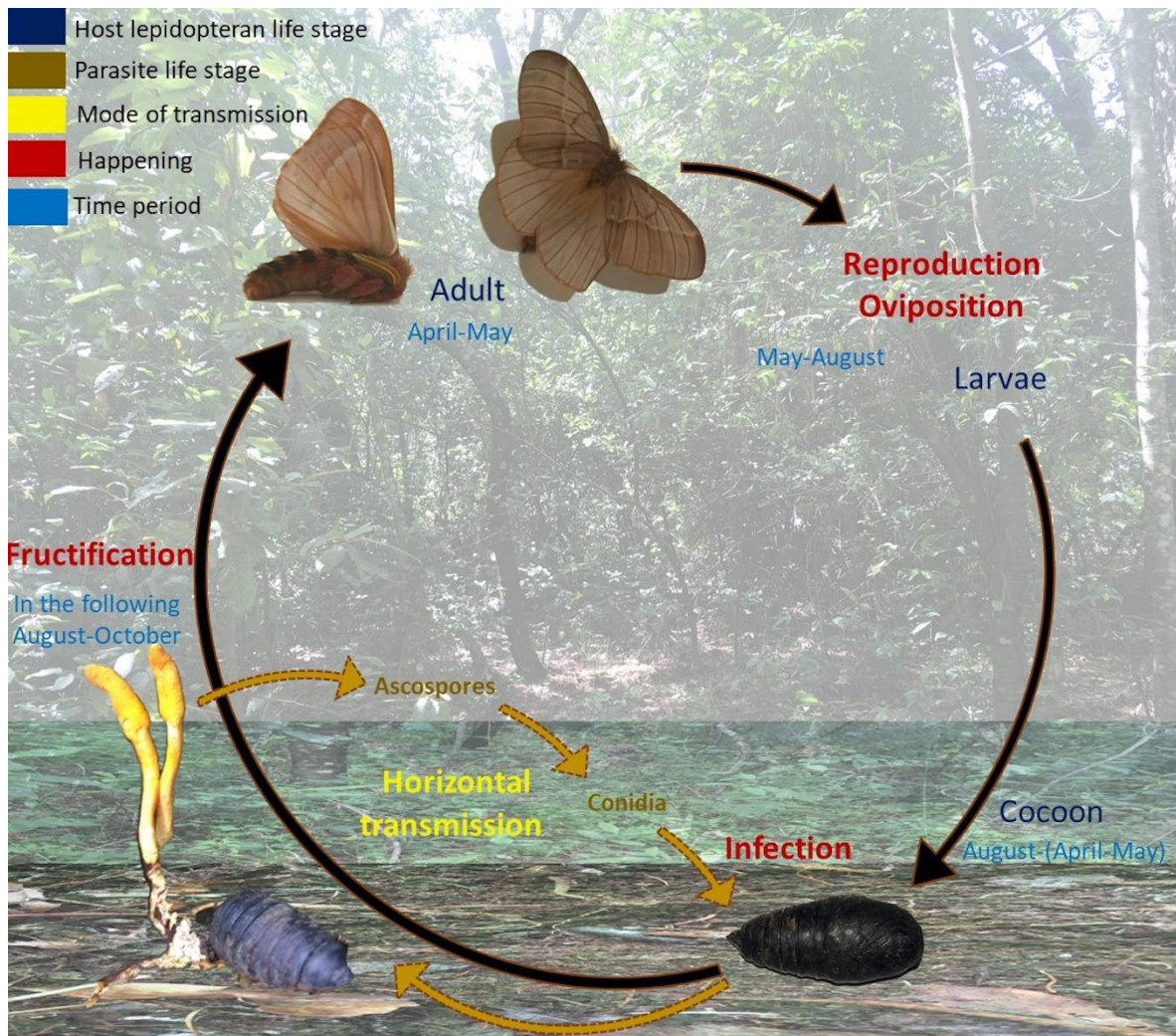


FIG. 4. Life cycle and hypothesis of *Cordyceps mexicana* infection.

Discussion

Phylogenetic relationships and geographical distribution of *Cordyceps mexicana* sp. nov.

The phylogenetic relationships within the Cordycipitaceae found in this study were consistent with the findings of previous studies (Sung *et al.*, 2007b; Kepler *et al.*, 2017; Mongkolsamrit *et al.*, 2018). *C. mexicana* species has previously been reported as *C. militaris* (Pérez-Villamares *et al.*, 2017), based on its morphology and interactions with moth pupae. However, we found that it is a new sister species to the *C. militaris* complex (FIG. 1).

Most species of the *C. militaris* complex have specific associations with Lepidoptera; however, *C. kirkii* parasitizes Orthoptera (Cunningham 1922), *C. submilitaris* Coleoptera (Mains

1940), *C. ningxiaensis* Diptera (Yan and Bau 2015), *C. militaris* Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, and other orders (Shrestha *et al.*, 2016; Mongkolsamrit *et al.*, 2018) (TABLE 3). However, more research is needed to clarify the evolution of these species and understand their host associations.

Species in this lineage have diverse distribution. *C. mexicana* is only found in central Mexico, *C. oncoepae* is restricted to Tasmania (Yip and Rath 1989) and *C. rosea* to Japan (Kobayasi and Shimizu 1982), *Cordyceps changbaiensis*, *C. changchunensis*, *C. jingyuetanensis*, and *C. kyusyuensis* are distributed throughout China (Kobayasi 1981). Only *C. militaris* has a wide distribution, covering many geographic regions (Sung and Spatafora 2004) (TABLE 3).

Comparison of *C. mexicana* sp. nov. with morphological similar species

C. mexicana sp. nov. is morphologically similar to *C. militaris*. *C. militaris* has great variability in stromata coloration (Mains, 1958; Sung and Spatafora 2004), and in 2004, before the multi-locus analysis of *Cordyceps sensu lato* (Sung *et al.*, 2007b), it was considered conspecific to *Blackwellomyces cardinalis* and *B. pseudomilitaris* (Sung and Spatafora 2004), because of their similar stromata macromorphology. Currently, *Blackwellomyces* is a basal genus in Cordycipitaceae, that does not share a recent common ancestor with *Cordyceps s.str.*, and lacks produce disarticulating ascospores (Kepler *et al.*, 2007). Other species considered conspecific with *Cordyceps militaris* are *C. changbaiensis*, *C. changchunensis*, and *C. jingyuetanensis*, which were described as new species within the *C. militaris* clade (Jia-Jun *et al.*, 2021) (TABLE 2).

In Cordycipitaceae, the color and shape of the stromata appears and disappears during the evolution of the family. For example, the characteristics of fleshy stroma, yellow-pigmented, and erect shapes are observed within the Cordycipitaceae in different genera such as *Beauveria*, *Blackwellomyces*, *Cordyceps*, and *Samsoniella* (Kepler *et al.*, 2017; Mongkolsamrit *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020; Jia-Jun *et al.*, 2021), but not all of these genera have the same common ancestor. Therefore, there is no morphological synapomorphy to identity species; therefore, cryptic species must be proposed based on molecular characteristics (Rehner *et al.*, 2011; Mongkolsamrit *et al.*, 2018, 2020).

Cordyceps mexicana sp. nov. is within *Cordyceps s.str.* clade and *Beauveria* was a sister clade. The characteristics of the stromata of some *Beauveria* teleomorphs are similar to those of *Cordyceps s.str.*, therefore, they are not informative. The diagnostic taxonomic characteristics of *Beauveria* are culture and conidial morphology, in addition to their molecular characteristics

(Rehner *et al.*, 2011). Macroscopically, *C. mexicana* is distinguished by its large stromata ranging from 20 to 102 mm in length and white mycelial cords from the host to the stromata. The stromata are always bright yellow, and some develop a central vertical cleft in the hymenophore. In contrast, *C. militaris* has more variable colors ranging from yellow and orange to reddish, and its stromata are smaller (up to 70 mm in length).

Microscopically, *C. mexicana* presents cylindrical asci with filiform ascospores that separate into part-spores. This contrasts with *B. cardinalis* and *B. pseudomilitaris*, whose ascospores do not disarticulate (Sung and Spatafora 2004). *Samsoniella inthanonensis* presents rare sexual spores called bola-ascospores (Mongkolsamrit *et al.*, 2018). *Cordyceps ninchukispora* forms cylindrical asci that also contain bola-ascospores with 3–4 septa (Su and Wang 1986). *C. militaris* is the most morphologically similar species to *C. mexicana*; however, its perithecia, asci, and ascospores differ (TABLE 2). As a unique characteristic, *C. mexicana* contains solitary or chain fusiform-irregular structures within the perithecia. These structures are released by compressing the perithecia, and we assumed that the immature ostiolar neck cells or perithecium cell wall differentiated into chlamydospores (FIG. 2c).

The teleomorphs of *C. rosea* are considerably different in terms of stroma, perithecium, and ascus size; for example, the stromata measure 11 mm in length (Kobayasi and Shimizu 1982), whereas those of *C. mexicana* reach up to 102 mm in length. *Cordyceps kyusyuensis* has bright yellow rhizoids and orange stroma with darker ostioles and smaller perithecia, ranging from 410 to 580 × 210–330 µm (Kobayasi 1981). The conidial stage of *Cordyceps oncoperae* on the host is characterized by the production of densely branched, lageniform conidiophores or tubular-shaped conidiogenous cells between zero and three short conical denticles. The conidia are ellipsoid, rough, rounded at the apex, and truncated at the base with a small hilum. In solid medium, the colonies are whitish to light yellow and grayish with orange on the reverse side (Yip and Rath 1989). This species shares the rough conidia and light yellow coloration of the colony growth on PDA with *C. mexicana*, but differs in the coloration on the reverse side of the colony and in the conidiophore morphology.

C. mexicana has an *Isaria*-like asexual form, featuring simple or branched conidiophores with three to five phialides and a rounded and warty conidium, while *C. militaris* presents ovoid, pyriform, cylindrical, globose, subglobose or ellipsoid polymorphic conidia grouped in a viscous head or in chains (Shrestha *et al.*, 2005).

Biological interactions of *C. mexicana* and the *C. militaris* complex with their hosts

C. mexicana is parasitic to the *Paradirphia* sp. In Mexico, this species has been reported to be *Paradirphia lasiocampina* (Pérez-Villamares *et al.*, 2017); however, this species does not correspond to any species registered in Mexico or South America (Lemaire and Wolfe 1988; Wolfe 1994; Balcazar-Lara 1999). For Saturniidae, only interactions between *Actias artemis* with *C. longdongensis* and *Anisota senatoria* with *C. militaris* have been reported (Shrestha *et al.*, 2016). Therefore, this would be the third record of *Cordyceps* in association with this family.

Within the Cordycipitaceae, in *Cordyceps sensu stricto* (s.str.), the immature stages of lepidopterans predominate as hosts. However, species related to coleopteran adults, hymenopteran pupae (Shrestha *et al.*, 2016), and dipteran adults (Yan and Bau 2015) are also observed. In the *C. militaris* complex, lepidopteran specificity was observed in *C. mexicana* with pupae of *Paradirphia* sp., *C. kyusyuensis* with larvae of *Clanis biliniata* (Kobayasi 1981; Guo and Li 2000), *C. oncoperae* with larvae of *Oncopera intricata* (Yip and Rath 1989), *C. rosea* with larvae (species not specified) (Sung and Spatafora 2004), *C. changchunensis* and *C. jingyuetanensis* on pupae of Lepidoptera, and *C. changbaiensis* on larvae of Lepidoptera (Jia-Jun *et al.*, 2021). Only *C. militaris* parasitizes species of four orders of the class Insecta, that is, Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, and Hymenoptera; however, the most frequent records are in species of eleven families of Lepidoptera, suggesting that it is a generalist (Shrestha *et al.*, 2016) (TABLE 3).

Life cycle of *C. mexicana* and *Paradirphia* sp.

Based on the pupal-adult period of the host observed under natural conditions, in the laboratory, and the presence of stromata in the forest, we propose that infection is achieved by horizontal transmission. In autumn, stromata releases spores that remain dormant in the soil and germinate when they come into contact with the pupae of *Paradirphia* sp. The mycelium grows, invades the host, and emerges from the fruiting body the following autumn, when the environmental conditions are humid and the temperature begins to decrease (FIG. 4).

Conclusions

Based on multigene phylogeny, we found that *C. mexicana* is a new species belonging to the *C. militaris* complex, which includes *C. changbaiensis*, *C. changchunensis*, *C. jingyuetanensis*, *C.*

kyusyuensis, *C. militaris*, *C. ningxiaensis*, *C. oncooperae*, *C. roseostromata*, and *C. shuifuensis*. This complex comprises of species with a strong host association with lepidopterans, and diverse geographic distribution. *C. mexicana* parasitizes the *Paradirphia* sp. The life cycles of *C. mexicana* and *Paradirphia* sp. are univoltine, and we hypothesize that infection is achieved through horizontal transmission. Given the close phylogenetic positions of *C. mexicana* and *C. militaris*, we propose to conduct research on their metabolomics and cultivation.

Acknowledgments

We thank CONACYT for the grant awarded to the first author and the SyEA of the Universidad Autónoma del Estado de México for funding the Project (4985/2020CIB). Thanks to Dr. Tatiana Sanjuan Giraldo for her critical suggestions during this research and for her advice on specimen collection and preservation techniques. Thanks to Dr. Ivonne Janet Garzón Orduña for her support in identification of the host and preservation of the moths. We also thank Dr. Hermelinda Margarita Villegas Rios for her support in the characterization of some of the microscopic structures.

Literature cited

- Balcazar-Lara MA. 1999. A new *Paradirphia* (Lepidoptera: Saturniidae) from “Sierra de Juarez”, Oaxaca, Mexico. *Entomological News* 110:285–289.
- Barelli L, Moonjely S, Behie SW, Bidochka MJ. 2015. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. *Plant Molecular Biology* 90:657–664.
- Bischoff JF, James F, White Jr. 2004. *Torrubiella piperis* sp. nov. (*Clavicipitaceae*, *Hypocreales*), a new teleomorph of the *Lecanicillium* complex. *Studies in Mycology* 50:89–94.
- Castlebury LA, Rossman AY, Sung G-H, Hyten AS, Spatafora JW. 2004. Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. *Mycological Research* 108:864–872.
- Chen WH, Han YF, Liang JD, Tian WY, Liang ZQ. 2021. Multi-gene phylogenetic evidence indicates that *Pleurodesmospora* belongs in Cordycipitaceae (Hypocreales, Hypocreomycetidae) and *Pleurodesmospora lepidopterorum* sp. nov. on pupa from China. *Mycology* 80:45–55.
- Cunningham GH. 1922. A singular *Cordyceps* from Stephen Island, New Zealand. *Transactions of the British Mycological Society* 8:72–75.

- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792–1797.
- Eriksson O. 1982. *Cordyceps bifusispora* spec. nov. *Mycotaxon* 15:185–188.
- Gazis R, Skaltsas D, Chaverri P. 2014. Novel endophytic lineages of *Tolypocladium* provide new insights into the ecology and evolution of *Cordyceps*-like fungi. *Mycologia* 106:1090–1105.
- Glare TR, Reay SD, Nelson TL, Moore R. 2008. *Beauveria caledonica* is naturally occurring pathogen of forest beetles. *Mycological Research* 112:352–360.
- Guo YL, Li CY. 2000. *Cordyceps kyushuensis* new to China. *Mycosystema* 19:296.
- Guzmán G, Morón MA, Ramírez-Guillén F, Wolf JHD. 2001. Entomogenous *Cordyceps* and related genera from Mexico with discussions on their hosts and new records. *Mycotaxon* 78:115–125.
- Humber RA, Rombach MC. 1987. *Torrubiella ratticaudata* sp. nov. (Pyrenomycetes: Clavicipitales) and other fungi from spiders on the Solomon Islands. *Mycologia* 79: 375–382.
- Hywel-Jones NL. 1994. *Cordyceps khaoyaiensis* and *C. pseudomilitaris*, two new pathogens of lepidopteran larvae from Thailand. *Mycological Research* 98:939–942.
- INEGI. 2009. *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Tenancingo, México: Clave geoestadística 15088.* 1–9 p.
- James DG, Morgan S, Sourakov A. 2017. *The Book of Caterpillars: A life-Size Guide to Six Hundred Species from around the world*, Chicago: The University of Chicago Press. 417 p.
- Jia-Jun H, Gui-Ping Z, Yong-Lan T, Dan D, Di-Zhe G, Gu R, Zheng-Xiang Q, Zhen-Hao Z, Yu L, Bo Z. 2021. Morphology and molecular study of three new Cordycipitoid fungi and its related species collected from Jilin Province, northeast China. *MycologyKeys* 83: 161–180.
- Katoh K, Toh H. 2010. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 26:1899–1900.
- Kepler R, Sung GH, Ban S, Nakagiri A, Chen MJ, Huang B, Li Z, Spatafora J. 2012. New teleomorph combinations in the entomopathogenic genus *Metacordyceps*. *Mycologia* 104:182–197.

- Kepler RM, Luangsa-ard J, Hywel-Jones NL, Quandt CA, Sung GH, Rehner MCA, Henkel TW, Sanjuan T, Zare R, Chen M, Li Z, Rossman AY, Spatafora JW, Shrestha B. 2017. A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). *IMA FUNGUS* 8:335–353.
- Khonsanit A, Luangsa-ard JJ, Thanakitpipattana D, Noisripoom W, Chaitika T, Kobmoo N. 2020. Cryptic diversity of the genus *Beauveria* with a new species from Thailand. *Mycological Progress* 19:291–315.
- Kobayasi Y. 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. *Science reports of the Tokyo Daigaku* 84:53–260.
- Kobayasi Y. 1981. Revision of the Genus *Cordyceps* and Its Allies 1. *Bulletin of the National Science Museum* 7:1–13.
- Kobayasi Y. 1982. Keys taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 23:329–364.
- Kobayasi Y. 1983. *Cordyceps* species from Japan 6. *Bulletin of the National Science Museum Tokyo Series B* 9:1–21.
- Kobayasi Y, Shimizu D. 1982. *Cordyceps* species from Japan 5. *Bulletin of the National Science Museum* 8:111–123.
- Kornerup A, Wanscher JH, Pavey D. 1984. *Methuen Handbook of Colour*, New York: Hasting House. 257 p.
- Lemaire C, Wolf KL. 1988. Three new species of *Paradirphia* (Saturniidae: Hemileucinae) from Mexico and Central America with notes on the immature stages. *Journal of Research on the Lepidoptera* 27:197–212.
- Liu YJ, Whelen S, Hall BD. 1999. Phylogenetic relationships among Ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16:1799–1808.
- Luangsa-ard JJ, Hywel-Jones NL, Manoch L, Samson RA. 2005. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycological Research* 109:581–589.
- Luangsa-ard JJ, Houbraken J, van Doorn T, Hong S-B, Borman AM, Hywel-Jones NL, Samson RA. 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters* 321:141–149.

- Mains EB. 1940. *Cordyceps* species from British Honduras. *Mycologia* 32:16–22.
- Mains EB. 1950. Entomogenous species of *Akanthomyces*, *Hymenostilbe* and *Insecticola* in North America. *Mycologia* 42:566–589.
- Mains EB. 1958. North American entomogeneous fungi. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 78:122–133.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010. “Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees” in *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, New Orleans, 1–8 p.
- Möller A. 1901. *Phycomyceten und Ascomyceten, Untersuchungen aus Brasilien*, Jena: Botanische Mitteilungen aus den Tropen, 1–319 p.
- Mongkolsamrit S, Noisriboom W, Thanakitpipattana D, Wutikhun T, Spatafora JW, Luangsa-ard J. 2018. Disentangling cryptic species with *Isaria*-like morphs in Cordycipitaceae. *Mycologia* 110:230–257.
- Mongkolsamrit S, Noisriboom W, Tسانathai K, Khonsanit A, Thanakitpipattana D, Himaman W, Kobmoo N, Luangsa-ard JJ. 2020. Molecular phylogeny and morphology reveal cryptic species in *Blackwellomyces* and *Cordyceps* (Cordycipitaceae) from Thailand. *Mycological Progress* 19:957–983.
- Nikoh N, Fukatsu T. 2000. Interkingdom host jumping underground: Phylogenetic analysis of entomopathogenic fungi of the genus *Cordyceps*. *Molecular Biology and Evolution* 17:629–638.
- Pérez-Silva E. 1977. Algunas especies del género *Cordyceps* (Pyrenomycetes) en México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 11:145–153.
- Pérez-Silva E. 1978. Nuevos registros del género *Cordyceps* (Pyrenomycetes) en México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 12:19–25.
- Pérez-Villamares JC, Burrola-Aguilar C, Aguilar-Miguel X, Sanjuan TI, Jiménez-Sánchez E. 2017. New records of entomopathogenic fungi of the genus *Cordyceps s.l.* (Ascomycota: Hypocreales) from the State of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 88:773–784.

- Quandt CA, Kepler RM, Gams W, Araujo JPM, Ban S, Evans HC, Hughes D, Humbert R, Hywel-Jones N, Li Z, Luangsa-ard J, Rehner SA, Sanjuan TI, Sato H, Shrestha B, Sung G, Yao Y, Zare R, Spatafora J. 2014. Phylogenetic-based nomenclatural proposals for Ophiocordycipitaceae (Hypocreales) with new combinations in *Tolypocladium*. *IMA FUNGUS* 5:121–134.
- Rehner SA, Buckley E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence from cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97:84–98.
- Rehner SA, Minnis AM, Sung G-H, Luangsa-ard JJ, Devotto L, Humber RA. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103: 1055– 1073.
- Rubio-Bustos SY, Guzmán-Dávalos L, Navarrete-Heredia JL. 1999. Especies entomopatógenas de *Cordyceps* (Fungi, Ascomycotina) en México. *Boletín del Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara (IBUG)* 7:135–157.
- Sanjuan T, Tabima J, Restrepo S, Læssøe T, Spatafora JW, Franco-Molano AE. 2014. Entomopathogens of Amazonian stick insects and locusts are members of the *Beauveria* species complex (*Cordyceps sensu stricto*). *Mycologia* 106, 260–275.
- Shrestha B, Han S-K, Yoon K-S, Sung J-M. 2005. Morphological characteristics of conidiogenesis in *Cordyceps militaris*. *Mycobiology* 33:69–76.
- Shrestha B, Tanaka E, Hyun MW, Han JG, Kim CS, Jo JW, Han SK, Oh J, Sung GH. 2016. Coleopteran and Lepidopteran hosts of the entomopathogenic genus *Cordyceps sensu lato*. *Journal of Mycology* 2016:1–14.
- Shrestha B, Sung GH, Sung JM. 2017. Current nomenclatural changes in *Cordyceps sensu lato* and its multidisciplinary impacts. *Mycology* 8:293–302.
- Shrestha B, Kubátová A, Tanaka E, Oh J, Yoon DH, Sung JM, Sung GH. 2019. Spider-pathogenic fungi within Hypocreales (Ascomycota): their current nomenclature, diversity, and distribution. *Mycological Progress* 18:983–1003.
- Spatafora JW, Sung G-H, Sung J-M, Hywel-Jones NL, White JF. 2007. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin for ergot and the grass endophytes. *Molecular Ecology* 16:1701–1711.
- Stamatakis A. 2014. RAxML versión 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–1313.

- Stone LBL, Bidochka MJM. 2020. The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104: 9935–9945.
- Su CH, Wang HH. 1986. *Phytocordyceps*, a new genus of the Clavicipitaceae. *Mycotaxon* 26:337–344.
- Sung GH, Spatafora JW, Zare R, Hodge KT, Gams W. 2001. A revision of *Verticillium* sect. *Prostata*. II. Phylogenetic analyses of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of the Clavicipitaceae. *Nova Hedwigia* 72:311–328.
- Sung GH, Spatafora JW. 2004. *Cordyceps cardinalis* sp. nov., a new species of *Cordyceps* with an east Asian-eastern North American distribution. *Mycologia* 96:658–666.
- Sung JM, Park YJ, Lee JO, Han SK, Lee WH, Choi SK, Shrestha B. 2006. Selection of superior strains of *Cordyceps militaris* with enhanced fruiting body productivity. *Mycobiology* 34:131–137.
- Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL, Spatafora JW. 2007a. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44:1204–1223.
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora W. 2007b. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57:5–59.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673–4680.
- Vilgalys R, Sun BI. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *The proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:4599–4603.
- Wang YB, Wang Y, Fan Q, Duan DE, Zhang GD, Dai RQ, Dai YD, Zeng WB, Chen ZH, Li, DD, Tang DX, Xu ZH, Sun T, Nguyen TT, Tran NL, Dao VM, Zhang CM, Hhuang LD, Liu YJ, Zhang XM, Yang DR, Sanjuan T, Liu XZ, Yu H. 2020. Multigene phylogeny of the family Cordycipitaceae (Hypocreales): new taxa and the new systematic position of the Chinese cordycipitoid fungus *Paecilomyces hepiali*. *Fungal Diversity* 103:1–46.

- Wolfe KL. 1994. A new *Paradirphia* from Central America (Lepidoptera: Saturniidae: Hemileucinae). *Tropical Lepidoptera* 5:103–104.
- Yan JQ, Bau T. 2015. *Cordyceps ningxiaensis* sp. nov., a new species from Dipteran pupae in Ningxia Hui Autonomous Region of China. *Nova Hedwig* 100:251–258.
- Yip H-Y, Rath AC. 1989. *Microhilum oncoperae* gen, et sp. nov. (Deuteromycotina: Hyphomycetes): The cause of mycosis on the larvae of *Oncopera intricata* (Lepidoptera: Hepialidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 53:361–364.
- Zare R, Gams W. 2001. A revisión of *Verticillium* section Prostata. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen.nov. *Nova Hedwigia* 73:1–50.

Supplementary material

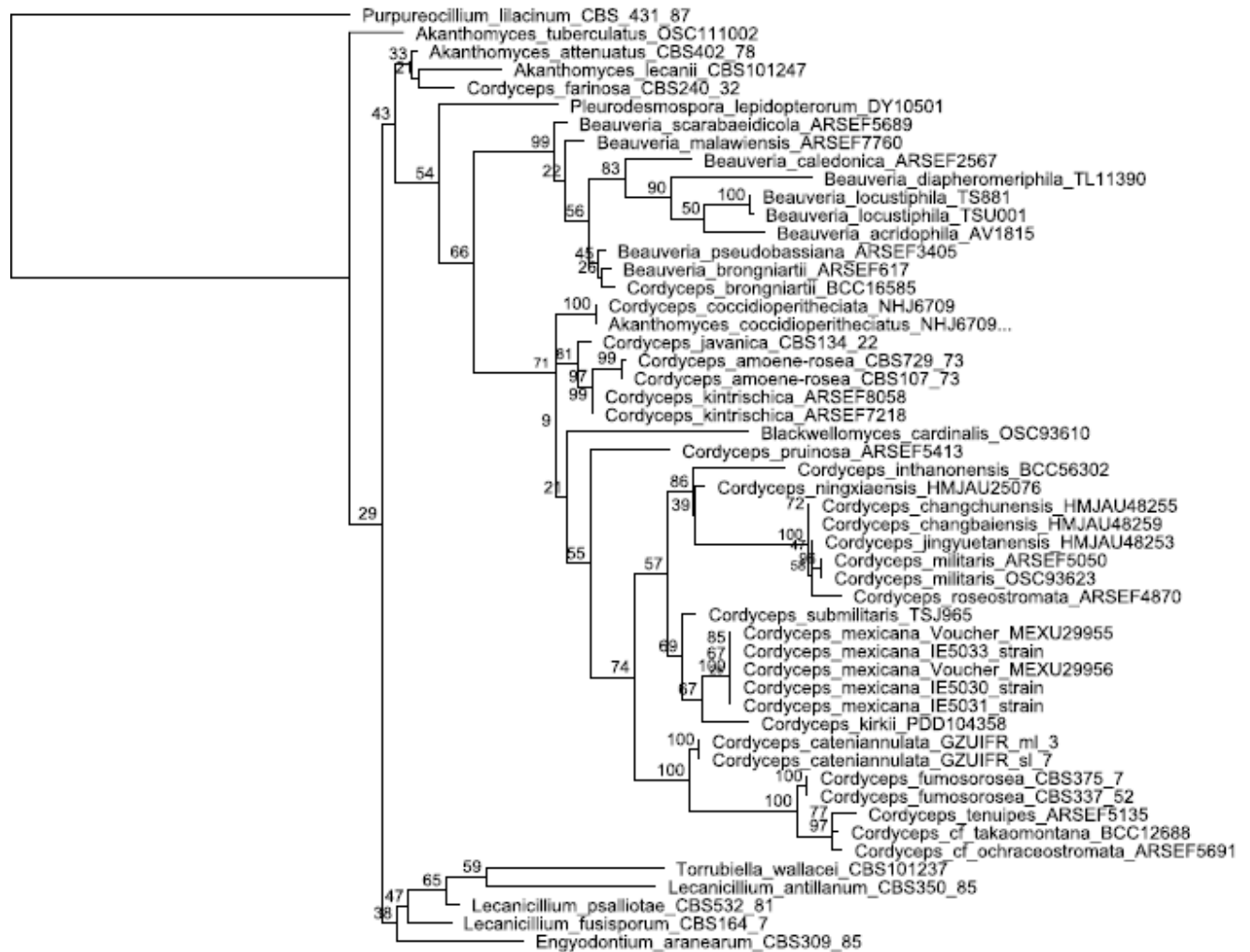
Supplementary material 1

TreeBASE, ID: 29433

Supplementary material 2

TreeBASE, ID: 29435

Supplementary material 3



Capítulo 4. Artículo de investigación: Caracterización de crecimiento micelial y producción de biomasa en cultivo *in vitro* y artificial de *Cordyceps mexicana*

¹López-Rodríguez Lorena, ²Burrola-Aguilar Cristina, ³María Elena Estrada Zúñiga, ⁴Roberto Garibay Orijel

^{1,2,3}Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias, Centro de Investigación en Recursos Bióticos, km 14.5, carretera Toluca-Atlacomulco, 50200, Toluca, Estado de México, México. ⁴Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Ciudad Universitaria, Circuito exterior s/n, 04510. Ciudad de México, México.

Autor de correspondencia: ² cba@uaemex.mx

Resumen

Cordyceps s.l. es un grupo de ascomicetos parásitos de diferentes eucariotas, principalmente insectos y arañas. Algunas especies son apreciadas en la medicina Asiática tradicional debido a sus propiedades medicinales, ya que son fuente de diversos metabolitos. Actualmente algunas especies de este grupo, tal como como *C. militaris* y *Ophiocordyceps sinensis* son cultivadas *in vitro* y artificialmente para su aprovechamiento como alimentos funcionales o suplementos nutraceuticos. En México, recientemente se describió a *Cordyceps mexicana*, especie hermana filogenéticamente del clado *C. militaris*, con quien comparte similitud en morfología y asociación con lepidópteros. En este estudio nos planteamos conocer las condiciones nutrimentales que optimizan su cultivo *in vitro* y artificial de *C. mexicana*. Se seleccionaron las cepas que producen mayor biomasa y presentan viabilidad para fructificación. Para lo cual, se caracterizaron morfológicamente las cepas en PDA, se evaluó la producción de biomasa en medio PDA de 20 cepas obtenidas por aislamiento esporico. Posteriormente se realizo la cruza de todas las cepas en medio SDAY, para determinar las cruza viables. Al mismo tiempo se realizaron bioensayos de fructificación de las cepas sin cruzar, para seccionar las cepas que desarrollaban primordios. Por último, se evaluo el crecimiento en diferentes medios de cultivo y se indujo fructificación de las cepas C3, C5, C8, C10, C13 y C19 en medios de arroz (Ab), arroz adicionado con larvas de tenebrios (ATm) y chinicuiles (ACr). Las cepas presentan un crecimiento micelial algodonoso blaquescino en la parte superior y con coloraciones amarillas en la base, siendo estas coloraciones de mayor intensidad en los medios ricos en nutrientes como SDAY. La mayor producción de biomasa se obtuvo en los medio EMA y SDAY. El sustrato con invasión más rápida fue arroz blanco. El desarrollo de primordios se observó en las cepas C1, C3, C5, C8, C10, C13 y C19 en sustrato de Ab, ATm, ACr, sin embargo, no se desarrollaron estromas.

Introducción

Cordyceps s.l. es un grupo taxonómico muy complejo que incluye hongos hipocreados, ascomicetos que han evolucionado como parásitos de artrópodos, hongos, plantas, nemátodos y rotíferos, endófitos y saprotrofos (Sung *et al.*, 2007a, 2007b; Shrestha *et al.*, 2016, 2019; Stone & Bidochka 2020). Este grupo comprende cerca de 1300 especies (Wang *et al.*, 2020), de las cuales algunas presentan importancia como alimentos funcionales (Phull *et al.*, 2022).

Cordyceps guangdongensis, *C. militaris*, *C. pruinosa*, *Isaria cicadae*, *Ophiocordyceps sinensis* y *Tolypocladium ophioglossoides* son apreciadas en la medicina tradicional de China, Japón, Corea y otros países asiáticos orientales, debido a que se les atribuyen propiedades afrodisíacas, inmunomoduladoras, anti-inflamatorias, antimicrobianas, antimetastásicas, antitumorales, insecticidas, hipolipemiantes, hipoglucémicas, entre otras (Ng & Wang 2005; Dong *et al.*, 2015; Phull *et al.*, 2022). Estas propiedades son el resultado de la bioactividad de moléculas como cordicepina, ergosterol, carotenoides, manitol, proteínas, aminoácidos esenciales, aceites volátiles, minerales, vitaminas, nucleósidos, esteroides, mono y polisacáridos (Das *et al.*, 2010; Jedrejko *et al.*, 2021).

En el mundo se cultivan y comercializan con fines nutraceuticos al menos una docena de estas especies (Holliday 2017), Sin embargo, prevalece la comercialización de *O. sinensis* y *C. militaris*, con un mercado valorado en 473.4 millones de US en 2018, adicionalmente estudios de mercado proyectaron que la tasa de crecimiento anual será de 10.4% de 2018 a 2026. Actualmente, *O. sinensis* se encuentra en categoría vulnerable por la IUCN debido a su sobreexplotación (Yang 2020), siendo colectadas en China 100 ton. anuales (Ma 2010).

La alta valoración tradicional y económica, aunada a la categoría de riesgo en la que se encuentra *O. sinensis*, ha inducido el estudio de su cultivo *in vitro* y artificial, sin embargo, su cultivo es complicado (Dong *et al.*, 2015). Por lo tanto, *C. militaris* ha sido utilizada como sustituto de *O. sinensis*, la cual presenta similitud en tipo de metabolitos, un proceso de cultivo más fácil, rápido y barato, lo cual permite cubrir la demanda del recurso en investigación científica y desarrollo de productos (Shrestha *et al.*, 2012), además produce mayor concentración de cordicepina a comparación de *O. sinensis* (Huang *et al.*, 2009) y es considerado un alimento sin

riesgo para la salud, porque no presenta genes que produzcan micotoxinas para humanos (Zheng *et al.*, 2011).

El cultivo en *C. militaris* inició hace más de 150 años, cuando Bary (1867) estudió el crecimiento micelial en larvas infectadas de *Sphinx euphorbiae*. Los estudios de cultivo *in vitro* han permitido conocer las variables que optimizan el crecimiento, producción de biomasa y metabolitos. Los medios de cultivo tienen un papel muy importante, ya que las fuentes de carbono y nitrógeno permiten conocer el tipo de nutrientes que requieren las especies para un óptimo crecimiento (Shrestha *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2013). En *C. militaris* los medios ricos en nutrientes adicionados con fuentes de nitrógeno, permiten la mayor densidad y crecimiento micelial, tal como Sabouraud con levadura, Agar Malta-Levadura (MYA) (Sung *et al.*, 2002), Agar Sabouraud Malta con Levadura (SMAY), Agar Sabouraud Dextrosa con Levadura (SDAY) (Shrestha *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2020), Agar Czapek extracto de Levadura (CZYA) (Shrestha *et al.*, 2006) y Agar Papa Dextrosa con Levadura (Kumar *et al.*, 2006). Adicionalmente, la temperatura de 25°C (Sung *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2006; Shrestha *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2013) y pH 7-7.5 (Sung *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2013) es donde se ha registrado el mejor crecimiento micelial.

Cordyceps militaris presenta un tipo de reproducción por heterotalismo bipolar, por lo que requiere dos tipos de “mating” compatibles para producir estromas regulares y viables, sin embargo, en pocas ocasiones se pueden desarrollar estromas por homotalismo, pero estos no desarrollan peritecios con esporas sexuales (Shrestha *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2011). Por lo tanto, es fundamental considerar cepas compatibles, para mantener la viabilidad de las cepas (Shrestha *et al.*, 2004).

El cultivo artificial de *C. militaris* se ha realizado principalmente en arroz integral (50gr) adicionado con gusanos de seda (10 gr), la incubación se realiza con 20-25°C y 70-90% de humedad por 50 a 60 días (Shrestha *et al.*, 2004, 2012; Sung *et al.*, 2006). Sin embargo, también se han realizado cultivos con inoculación directa en larvas de lepidópteros y coleópteros, tal como, gusano de seda (*Bombyx mori*) (Chen & Ichida 2002; Sato & Shimazu 2002; Hong *et al.*, 2010), tenebrios (*Tenebrio molitor*) y polillas de *Mamestra brassicae* y *Spodoptera litura* (Sato & Shimazu 2002).

Estudios de genómica determinaron un modelo basado en la genética, fisiología y metabolismo de *C. militaris*, donde la relación C:N de 8:1 en medios sintéticos optimiza el crecimiento y producción de cordicepina (Raethong *et al.*, 2020). La luz es otro factor que influye en el desarrollo de cuerpos fructíferos, en cultivo artificial de arroz se utilizan 500-1000 lux (Shrestha *et al.*, 2004, 2012; Sung *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2010), en contraste 20-500 lux permiten el desarrollo de estromas en cultivo sobre insectos (Chen & Ichida 2002) y la luz rosa (1/3,450–460 + 2/3,620–630 nm) permite la mayor producción de materia seca, carotenos y nucleótidos como la cordicepina y adenosina (Dong *et al.*, 2013).

En México, recientemente se describió a *Cordyceps mexicana*, la cual es cercana filogenéticamente y similar morfológicamente a *C. militaris* (López-Rodríguez *et al.*, 2022). Por lo tanto, el presente trabajo tiene el objetivo de conocer las condiciones nutrimentales que optimizan la biomasa en cultivo *in vitro*, seleccionar cepas viables de fructificación y determinar los sustratos que inducen fructificación para su posterior análisis nutricional y metabólico.

Material y métodos

Se evaluaron 19 cepas obtenidas por aislamiento esporico, las cuales, previamente fueron identificadas mediante ITS (López-Rodríguez *et al.*, 2022) (Tabla 1). Las cepas se encuentran resguardadas en el Laboratorio de Micología del Centro de Investigación en Recursos Bióticos.

Tabla 1. Información de cepas de *Cordyceps mexicana* evaluadas en esta investigación.

Codigo cepa	Voucher	Codigo de Gen Bank (ITS)
C-10	MEXU29959	MN709065
C-11	MEXU29958	MN709066
C-12	MEXU29961	MN709078
C-13	MEXU29962	MN709083
C-14	MEXU29963	MN709079
C-15	MEXU29964	MN709077
C-16	MEXU29965	MN709072
C-17	MEXU29967	MN709071
C-21	MEXU29968	MN709073
C-22	MEXU29969	MN709067
C-23	MEXU29970	MN709076
C-24	MEXU29971	MN709068
C-25	MEXU29972	MN709069
C-27	MEXU29973	MN709074
C-29	MEXU29974	MN709080
C-30	MEXU29975	MN709081
C-32	MEXU29976	MN709082
C-33	MEXU29977	MN709070
C-35	MEXU29978	MN709075

Caracterización fenotípica de cepas

Se caracterizó el crecimiento micelial de las cepas en medio PDA (Agar Papa Dextrosa): forma, textura, densidad, margen y tipo de crecimiento de acuerdo con Shrestha *et al.* (2006). La coloración de la parte inferior y superior de las cepas se realizó utilizando clave de colores (Kornerup *et al.*, 1984).

Cruza entre aislados espóricos

Se realizaron cruza entre todas las cepas (n=190), para determinar qué cepas eran compatibles de acuerdo con el método de Shrestha *et al.* (2004b). Las cruza se realizaron en cajas Petri, se inocularon discos de 5 mm de diámetro de dos aislados diferentes, un disco de cada lado. Se utilizó el medio SDAY (Agar Papa Dextrosa con Levadura: 20gr dextrosa, 5 gr levadura, 5 gr peptona, 15gr agar/ 1000 ml agua destilada). La incubación fue a 25°C por 40 días, de acuerdo con el método de Shrestha *et al.* (2012).

Prueba piloto de Bioensayos de fructificación

Se realizó una prueba piloto de bioensayos de fructificación con cada cepa, para identificar las cepas que desarrollaban cuerpos fructíferos. Para ello se se preparó un sustrato con 50 gr de arroz blanco y 60 ml de agua destilada en frascos de vidrio (500 ml), esterilizados en autoclave a 121°C por 20 minutos. La incubación se realizó por 30 días a 25°C en condiciones 12hrs luz/12 hrs oscuridad, aproximadamente. Posteriormente la inducción de fructificación se realizó en condiciones rústicas. En un cuarto de concreto se mantuvo una humedad del 70-90%, temperatura ambiente y luz de 500-1000lux/24 hrs por 30 días, de acuerdo con el método modificado de Sung *et al.* (2006). La aereación fue de 1 a 2 hrs por día. La siembra del sustrato se realizó con 20 ml de inóculo líquido. El inóculo líquido se preparó en frascos de vidrios (150 ml), el medio fue Papa Dextrosa adicionado con Levadura, se incubó a 25°C y 150 rpm por 30 días.

Cuantificación de biomasa en cepas que desarrollan primordios en cultivo de arroz

Se evaluó la producción de biomasa en medio líquido de las cepas C-3, C-5, C-8, C-10, C-13 y C-19, las cuales desarrollaron primordios en la prueba piloto de bioensayos de fructificación, para seleccionar las cepas con las que se evaluaría fructificación en sustratos adicionados con insectos.

La incubación se realizó por triplicado en papa dextrosa (PD), a 25°C por 40 días. Los valores de biomasa fueron analizados con un ANOVA, posteriormente una prueba de rangos múltiples de Tuckey con 95% de confiabilidad en el paquete estadístico Statgraphics Centurion.

Evaluación de producción de biomasa en diferentes medios de cultivo

Se evaluó la producción de biomasa en las cepas que presentaron la mayor producción de biomasa en medio PD (C-7, C-10, C-12, C-13), para conocer las fuentes de carbono y nitrógeno que optimizan el crecimiento. Se emplearon diferentes medios de cultivo, clasificados como generales y ricos de acuerdo con su contenido nutricional, considerando la clasificación de Shrestha *et al.* (2006). Los medios de cultivo fueron: Agar Maíz (AM) (no clasificado en Shrestha *et al.*, 2006), Agar Trigo (AT) (no clasificado en Shrestha *et al.*, 2006), Agar Extracto de Malta (EMA) (general), Agar Papa Dextrosa (PDA) (rico) y Agar Papa Dextrosa con Levadura (SDAY) (rico). Los valores de biomasa fueron analizados con un MANOVA, las variables independientes fueron las cepas y los medios de cultivo. Posteriormente se aplicó una prueba de Tuckey con 95% de confiabilidad en el paquete estadístico Statgraphics Centurion.

Bioensayos de fructificación en diferentes sustratos

Se realizaron bioensayos de fructificación con las cepas que desarrollaron primordios en la prueba piloto y produjeron la mayor biomasa en medio líquido (C3, C5, C8, C13, C19). Los medios de cultivo empleados fueron arroz integral, arroz integral adicionado con tenebrios (*Tenebrio molitor*) (ATm), arroz integral con chinicuil (*Comadia redtenbacheri*) (ACr) y maíz palomero. Los medios se prepararon con diferentes relaciones (Tabla 1). El tiempo de incubación varió entre sustratos de 30 a 60 días. La temperatura de incubación fue de 25°C y posterior a la invasión completa del sustrato, se indujo fructificación con 70-90% de humedad y 500-1000 lux. 22 hrs/ día, las dos horas restantes fueron utilizadas para ventilación, por 20-60 días.

Tabla 1. Características de los sustratos evaluados en bioensayos de fructificación.

Sustrato	Tratamientos
Arroz integral	• Control
Arroz integral + larva chinicuil	1. 60gr arroz/4gr chinicuil 2. 60gr arroz/1gr chinicuil
Arroz integral + larva de tenebrio	1. C:N; 20:1

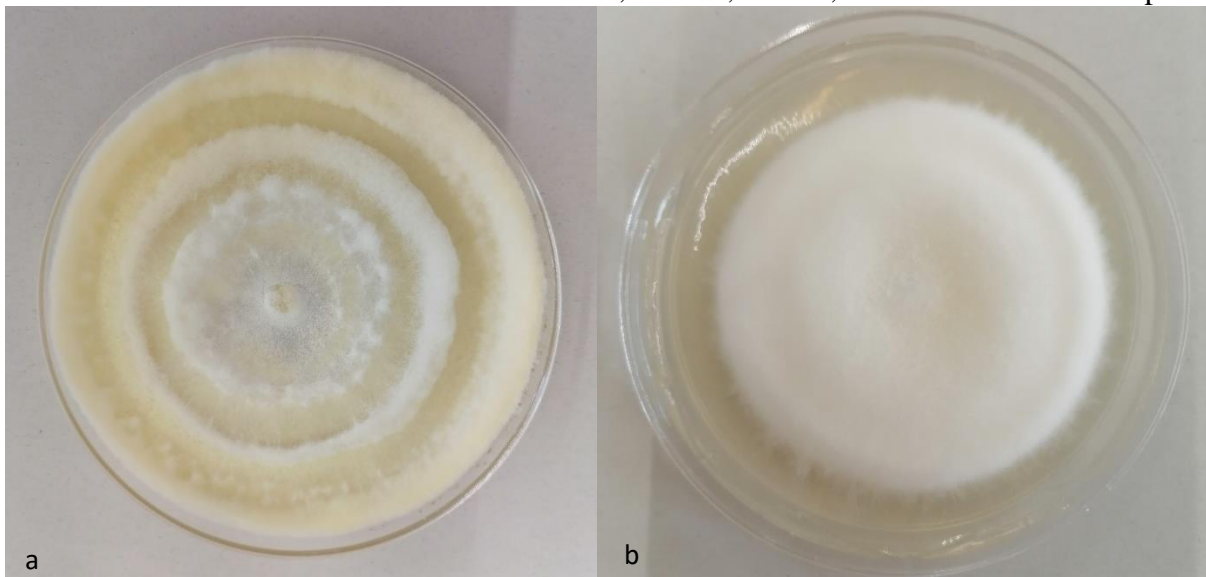
	2. C:N; 30:1
	3. C:N; 40:1
Maíz palomero	• 60 gr de maíz

Resultados y Discusiones

Caracterización fenotípica de las cepas

Las cepas presentaron características de crecimiento similares a *Cordyceps militaris*. Las características que prevalecen son crecimiento aéreo algodonoso con forma circular, pocas veces irregular, superficie convexa y margen fimbriado, en algunas se observaron sectores (Tabla 2). La coloración comúnmente es blanquecina (1/A1/A2/A3) en la parte aérea y con diferentes tonalidades amarillas-cafes en la parte basal (1(A8/A7; 2/A8/A7/A6/A5/A4; 5/E8/E6/F5)) (FIG. 1). En algunas se observan claramente los anillos de crecimiento (FIG. 1a).

Cordyceps militaris presenta un crecimiento micelial plano y algodonoso blanquecino en condiciones de oscuridad y con tonalidades amarillas en condiciones lumínicas. La textura varía de acuerdo con los medios de cultivo, presenta crecimiento algodonoso desde la primer semana de cultivo en medios ricos en nutrientes como CZYA, SMAY, SDAY, en contraste en medios pobres



y ricos pero sin levadura, tal como PDA se observa un crecimiento plano (Shrestha *et al.*, 2006). En *Cordyceps mexicana* se observa un crecimiento micelial algodonoso en PDA, lo cual contrasta con *C. militaris*.

FIG. 1. Cepas de *Cordyceps mexicana* en medio PDA. A. Se observan tonalidades amarillas y anillos de crecimiento. B. Se observa una coloración blanquecina.

La coloración en las cepas de *Cordyceps militaris* es diferente de acuerdo a las condiciones de luz, en oscuridad las cepas son blanquecinas y en condiciones lumínicas presenta coloraciones amarillas (Shrestha *et al.*, 2006). Esta coloración es el resultado de la síntesis de proteínas y la producción-acumulación de pigmentos carotenoides (Harding & Shropshire 1980; Thananusak *et al.*, 2020). Los carotenoides se acumulan como pigmentos foto protectivos y su biosíntesis esta regulada por co-regulación transcripcional, donde la luz es el factor abiótico que activa su producción (Thananusak *et al.*, 2020). La principal función de estos pigmentos es antioxidante (Yang *et al.*, 2014), disminuye la genotoxicidad del óxido de nitrógeno y de las especies reactivas al oxígeno, en condiciones de luz (Avalos *et al.*, 2015).

Tabla 2. Características de las cepas de *Cordyceps mexicana* en medio PDA.

Cepa	Forma	Margen	Crecimiento	Textura	Superficie	Observaciones adicionales
C-10	Circular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	
C-11	Circular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	
C-12	Circular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	
C-13	Circular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	Presencia de sectores
C-14	Circular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	
C-15	Irregular	Fimbrado	Postrado	Algodonosa	Convexa	Presencia de sectores
C-16	Circular-irregular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	
C-17	Circular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	
C-21	Circular-irregular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	

C-22	Circular-irregular	Fimbrado-lobulado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	
C-23	Circular	Fimbrado-lobulado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	Presencia de sectores
C-24	Circular-	Fimbrado-lobulado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	Presencia de sectores
C-25	Circular-irregular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	Presencia de sectores
C-27	Circular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	
C-29	Circular	Fimbrado.lobulado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	Presencia de sectores
C-30	Irregular	Fimbrado	Postrado	Algodonosa	Convexa	
C-32	Circular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	Presencia de sectores
C-33	Circular-irregular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	Presencia de sectores
C-35	Circular-irregular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	
C-37	Circular	Fimbrado	Aéreo	Algodonosa	Convexa	Presencia de sectores

Cruza de aislados

Se realizó un total de 190 cruzas, para determinar las cepas compatibles, sin embargo, ninguna crusa presentó la formación de primordios cuando tuvieron contacto micelial, lo cual indicó dos posibles respuestas: ninguna crusa fue compatible o ya estaban apareadas. Además, los controles con las cepas sin cruzar no desarrollaron primordios, por lo cual no se pudieron seleccionar las cepas a evaluar en sustrato adicionado con insectos (FIG. 2).

En cruzas de *C. militaris* se observa una reproducción por heterotalismo bipolar, la cual es una característica común en Ascomicetos, sin embargo, también se observa homotalismo, pero en este tipo de reproducción los estromas no producen peritecios o desarrollan peritecios sin ascosporas, por lo tanto, en cruzas de cepas se puede observar la formación de primordios en la línea donde tienen contacto las cepas (Shrestha *et al.*, 2012).

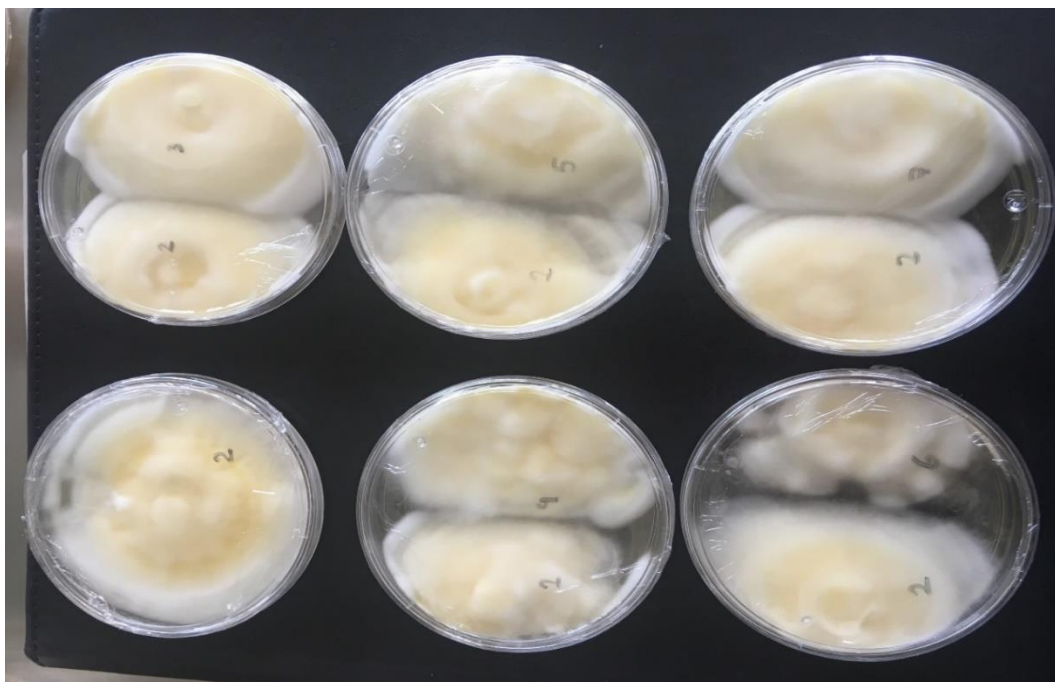


FIG. 2. Cepa 2 y algunos de sus entrecruzamientos. No se observa el desarrollo de primordios.

Prueba piloto de Bioensayos de fructificación

Se realizó una prueba de fructificación con todas las cepas, para seleccionar las cepas viables. El micelio invadió completamente el arroz en incubación de 25°C por 30 días. Posterior a 20-30 días se desarrollaron primordios en condiciones de temperatura ambiental, humedad del 70-90% con 500-1000 lux, sin embargo, el desarrollo de primordios fue inestable y no se presentaron en todas las cepas. Las cepas que desarrollaron abundantes primordios fueron C1, C3, C5, C8, C10, C13 y C19 (FIG. 3; Tabla 3).

Tabla 3. Formación de primordios en *Cordyceps mexicana* en medio de arroz blanco.

Cepa	Formación de primordios	Color de primordios
C1	+++	Amarillo brillante
C2	-	-
C3	+++	Amarillo brillante
C4	+	Amarillo claro
C5	+++	Amarillo brillante
C6	-	-
C7	+	Amarillo claro

C8	+++	Amarillo brillante
C9	-	-
C10	+++	Amarillo brillante
C11	+	Amarillo claro
C12	-	-
C13	+++	Amarillo brillante
C14	-	-
C15	+	-
C16	+	Amarillo claro
C17	+	Amarillo claro
C18	-	-
C19	+++	Amarillo brillante
C20	-	-

Letras en negritas indican las cepas que desarrollaron abundantes primordios. -; sin presencia de primordios; +: pocos primordios (< 10); +++: abundantes primordios (>30). Clave de color: Amarillo brillante (4 A6); Amarillo claro (4/A4/A3).



FIG. 3. Desarrollo de primordios en *Cordyceps mexicana* en sustrato de arroz.

Las cepas que desarrollaron primordios presentaron diferente producción de biomasa en medio PDA (n=27). Las cepas con mayor producción de biomasa fueron C7, C12 y C13 (Tabla 4).

Tabla 4. Producción de biomasa seca en medio PD de cepas que desarrollan primordios.

Biomasa seca (gr/100ml)

Cepas	Promedio	Varianza	Desviación estándar	Error estándar
C3	0.29c	0.0001	0.01	0.006
C5	0.42abc	0.0002	0.015	0.009
C7	0.48ab	0.0012	0.035	0.02
C8	0.357bcd	0.0058	0.076	0.044
C10	0.39abcd	0.0027	0.052	0.03
C11	0.37abcd	0.0001	0.01	0.006
C12	0.493^a	0.0042	0.065	0.038
C13	0.487^a	0.0008	0.029	0.017
C15	0.33cd	0.0031	0.056	0.32

Negritas indican cepas con mayor producción de biomasa. Anova y prueba de Tuckey con 95% de confianza. n=27

Producción de biomasa en cepas que desarrollan primordios en cultivo de arroz

Las cepas C5, C7, C12 y C13 desarrollaron primordios en cultivo de arroz, adicionalmente presentaron mayor producción de biomasa en medio PD. En diferentes medios de cultivo sólidos se evaluó la producción de biomasa. Está fue diferente de acuerdo con el medio de cultivo empleado ($P < 0.05$; $F_{6,85}$), pero no de acuerdo con la cepa ($P > 0.05$; $F_{0,81}$). Se observó mayor densidad micelial en SDAY y EMA y mayor producción de biomasa en medio SDAY (n=60) (Tabla 5). Las cepas presentaron coloraciones blanquecinas en la parte superficial (FIG. 4), y ligeras tonalidades amarillas, en contraste la parte basal presentó una coloración café-amarilla fuerte, esta coloración también cambia en intensidad de acuerdo al medio de cultivo empleado, SDAY es el medio que presenta la coloración más café-amarilla (FIG. 5). Esta coloración más café-amarilla en medio rico en nutrientes puede ser el resultado de la acumulación de una mayor cantidad de péptidos, ya que todas las cepas presentaron las mismas condiciones de luz.

Tabla 5. Producción de biomasa en diferentes medios de cultivo.

Cepa/medio de cultivo	Producción de biomasa (gr/caja Petri)				
	AM	AT	PDA	EMA	PDA+Y
C7-16	0.36cde	0.30de	0.37def	0.5ab	0.32cde
C10-22	0.41bcde	0.26e	0.26e	0.39bcdef	0.55a

C12-24	0.35cde	0.36cde	0.38cdef	0.41bcdef	0.49abc
C13-25	0.32cde	0.41bcdef	0.4bcdef	0.38cdef	0.48abcd

Negritas indican cepas con mayor producción de biomasa. Anova y prueba de Tuckey con 95% de confianza.

La densidad micelial y velocidad de crecimiento en cultivo sólido de *Cordyceps* spp. han sido evaluadas en varios estudios (Shrestha *et al.*, 2006), sin embargo, no se ha cuantificado la producción de biomasa en medio sólido. Comúnmente en los estudios de *Cordyceps*, la biomasa se cuantifica en medio líquido y la correlacionan con la producción de cordicepina u otros metabolitos.

El crecimiento, densidad micelial y producción de metabolitos dependen de las fuentes de nitrógeno y carbono, por lo tanto, la optimización de estas variables se puede observar en medios ricos en carbono y nitrógeno orgánico o inorgánico (Shrestha *et al.*, 2006). En este estudio se encontró que la mayor producción de biomasa se presentó en el medio SDAY, medio clasificado como rico en nutrientes, que contiene dextrosa como fuente de carbono, levadura y peptona como fuente de nitrógeno orgánico (Shrestha *et al.*, 2006). La sacarosa es considerada la fuente principal de carbono que optimiza la producción de biomasa en cultivo líquido y artificial; la dextrosa y la glucosa son la segunda fuente (Kumar & Sagar 2006; Shrestha *et al.*, 2006; Raethong *et al.*, 2020; Patthanujuck & Bunnang 2021).

La producción de biomasa fue intermedia en los medios de PDA (medio rico) y EMA (medio general), a pesar de ser considerados con diferente clasificación de acuerdo con los nutrientes que contienen. El medio PDA contiene dextrosa y papa como fuente de carbono, en contraste el medio EMA, contiene dextrosa como fuente de carbono y extracto de malta como fuente de vitaminas y minerales, es importante resaltar que la cepa C7 presentó una alta producción de biomasa en este medio.

Los medios en los cuales se presentó la menor producción de biomasa fueron el AM y AT, los cuales contienen almidón como fuente de carbono. Por lo tanto, en el cultivo de *C. mexicana*, la base almidón no optimiza la producción de biomasa.

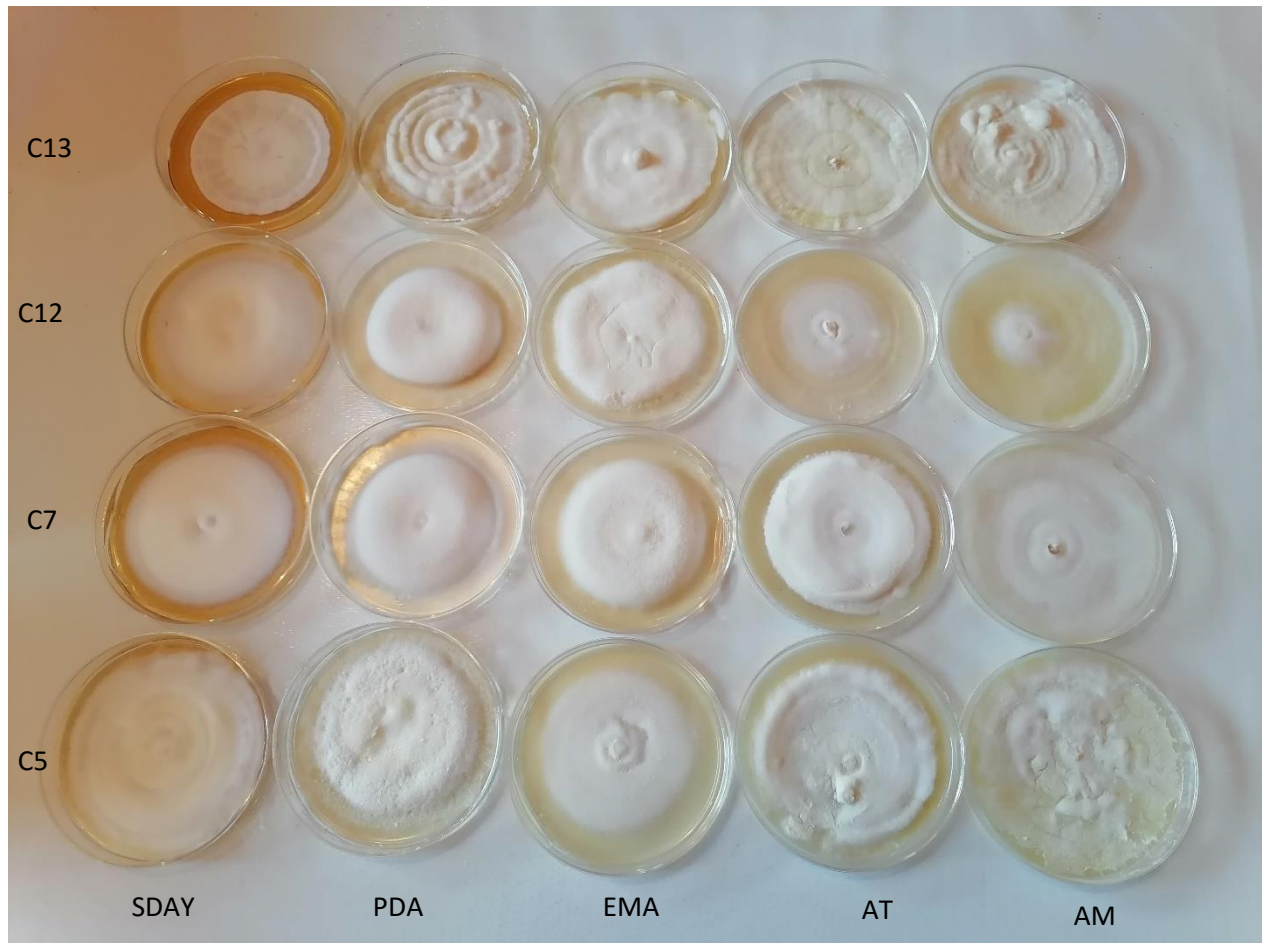


FIG. 4. Cepas de *Cordyceps mexicana* en diferentes medios de cultivo.

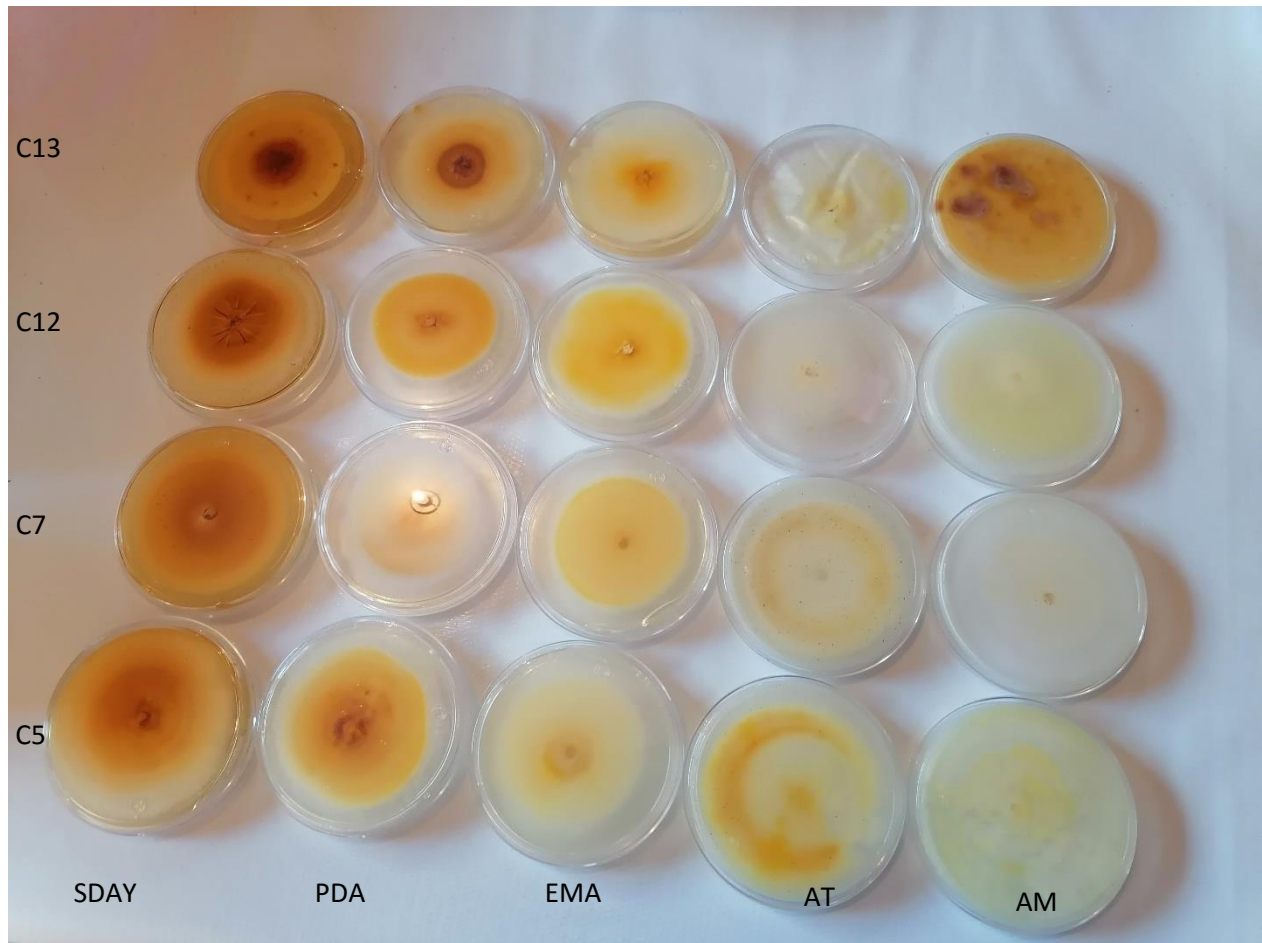


FIG. 5. Base de las cepas de *Cordyceps mexicana* en diferentes medios de cultivo, donde se observa la coloración amarilla predominante en medio SDAY.

Bioensayos de fructificación en diferentes sustratos

El cultivo superficial se realizó considerando las variables de temperatura, humedad y luz utilizadas en el cultivo de *Cordyceps militaris*. Sin embargo, en ningún tratamiento de arroz con tenebrios o arroz con chinicuil se desarrollaron estromas. En los sustratos con arroz y arroz con insectos, el micelio invadió completamente, lo que difirió fue el tiempo de invasión y el tiempo en desarrollo de primordios (Tabla 6), siendo el medio de arroz en el cual se presentó menor tiempo de invasión y desarrollo de primordios. El sustrato de maíz no fue invadido completamente por el micelio y comúnmente los cultivos se contaminaban. Debido a que la velocidad de invasión no puede ser medida cuantitativamente y no se desarrollaron cuerpos fructíferos, los datos presentados en este apartado son cualitativos.

Tabla 6. Tiempo de invasión y desarrollo de primordios en bioensayos de fructificación de *Cordyceps mexicana*.

Sustrato	Tratamientos	Tiempo de invasión (días) (Proceso en incubadora)	Tiempo en desarrollar primordios (días) (Proceso en cuarto rústico)
Arroz integral	• Control	30-40	20-30
Arroz integral + larva chinicuil	3. 60gr arroz/4gr chinicuil	30-40	60
	4. 60gr arroz/1gr chinicuil		
Arroz integral + larva de tenebrio	4. C:N; 20:1	40-60	90
	5. C:N; 30:1		
	6. C:N; 40:1		
Maíz palomero	• 60 gr de maíz	50	90

Shrestha *et al.* (2004a) mencionan que la producción de cuerpos fructíferos es inestable en aislados multiespóricos. El aislamiento monoespórico es muy lento, requiere de un buen laboratorio y ambiente esteril., en contraste, el aislamiento multi-ascospórico es una buena opción para el establecimiento de cultivo.

Los aislamientos multiespóricos no son favorables para la formación de cuerpos fructíferos estables y uniformes, sin embargo, permiten probar la capacidad de fructificación (Shrestha *et al.*, 2012) y la selección de aislamientos de múltiples ascosporas pueden ser utilizados para producir cuerpos fructíferos estables (Sung *et al.*, 2006).

Conclusiones

Este es el primer estudio que describe el crecimiento micelial *in vitro*, cultivo sólido y producción de primordios de *Cordyceps mexicana*. Los resultados indican que es fácil su cultivo *in vitro* en medio sólido y líquido. Las características de crecimiento micelial y producción de biomasa difieren de acuerdo con el medio de cultivo, siendo el medio rico en nutrientes SDAY el que optimiza la densidad micelial y producción de biomasa. La menor producción de biomasa se

presenta en medios de harina de trigo y maíz, por lo tanto, la fuente de carbono almidón no se recomienda en cultivo sólido. La coloración de las cepas varía de acuerdo con el contenido nutrimental de los medios de cultivo, por lo tanto, conocer la relación entre el contenido de pigmentos carotenoides y péptidos con respecto a la coloración, es una pregunta a resolver. Las cepas presentaron un desarrollo de primordios inestables, sin embargo, estas tienen la capacidad de invadir completamente sustratos de arroz, arroz adicionado con chinicuil (lepidóptero), arroz adicionado con larva de tenebrios (coleóptero). Esto indica que las cepas de *C. mexicana* tienen el potencial de ser cultivadas en un futuro. Por lo tanto, se sugiere realizar investigaciones haciendo incapie en las variables bióticas y abióticas de la fase de inducción de fructificación.

Referencias

- Avalos, J., & Carmen-Limón, M. (2015). Biological roles of fungal carotenoids. *Current Genetics*, *61*, 309-324.
- Bary, A. (1867). Zur kenntniss insectentodtender Pilze. *Botanische Zeittung*, *25*, 1-21.
- Coherent Market Insights. (2018). *Cordyceps sinensis* and *C.militaris* Extract Market Analysis. Recuperado en: <https://www.coherentmarketinsights.com/market-insight/cordyceps-sinensis-and-militaris-extract-market-2578>
- Chen, R. Y., & Ichida, M. (2002). Infection of the silkworm, *Bombyx mori* with *Cordyceps militaris*, *Journal Insect Biotechnology*, *71*, 61-63.
- Das, S.K., Masuda, M., Sakurai, A., & Sakakibara, M. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia*, *81*, 961–968.
- Dong, J. Z., Lei, C., Zheng, X. J., Ai, X. R., Wang, Y., & Wang, Q. (2013). Light wavelengths regulate growth and active components of cordyceps militaris fruit bodies. *Journal of Food Biochemistry*, *37*, 578-584.
- Dong, C., Guo, S., Wang, W., & Liu, X. (2015). Cordyceps industry in China. *Mycology*, *6*, 121-129.
- Gazis, R., Skaltsas, D., & Chaverri, P. (2014). Novel endophytic lineages of *Tolyocladium* provide new insights into the ecology and evolution of Cordyceps-like fungi. *Mycologia*, *10*, 1090-1105.
- Holliday, J. (2017). *Cordyceps*: a highly coveted medicinal mushroom. In *Medicinal Plants and Fungi: Recent Advances in Research and Development* (pp. 59-91). Springer, Singapore.
- Hong, I. P., Kang, P. D., Kim, K. Y., Nam, S. H., Lee, M. Y., Choi, Y. S., Kim, N. S., Kim, H. K., Lee, K. G., Humber, R. A. (2010). Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*, *38*, 128-32.
- Jedrejko, K.J., Lazur, J., & Muszynska, B. (2021). *Cordyceps militaris*: An Overview of Its Chemical Constituents in Relation to Biological Activity. *Foods*, *10*, 1-24.
- Kumar, A., & Sagar A. (2006). *In vitro* isolation and influence of nutritional conditions on the mycelial growth of the entomopathogenic and medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Plant Pathology Journal*, *5*, 315-321.

- Lee, B. J., Lee, M. A., Kim Y. G., Lee K. W., Choi Y. S., Lee B. E., & Song H. Y. (2013). Cultural characteristics of *Cordyceps militaris* strain 'Yedang 3' on various media and nutritional conditions. *Journal of Mushroom Science and Production*, *11*, 124-130.
- Ma YX. (2010). *Ophiocordyceps sinensis* resource and its management in China. En: Grassland Monitoring and Management Center, Ministry of Agriculture, Ed. *Ophiocordyceps sinensis* resources and environment. Lanzhou: Lanzhou University Press. p. 3–6.
- Ng, T.B., & Wang H.X. (2005). Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *Journal Pharmacy and Pharmacology*, *57*, 1509-1519.
- Nguyen, L.T., Le, V. V., Nguyen, B. T. T., Ngo, N. X., Nguyen, H. T. T., Nguyen Q. D., & Mulla, S. (2020). Cultural characteristics and cordycepin production of some *Cordyceps militaris* strains under artificial cultivation conditions. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, *101*, 135-145.
- Oh, J., Yoon, D. H., Shrestha, B., Choi, H. K., & Sung, G. H. (2019). Metabolomic profiling reveals enrichment of cordycepin in senescence process of *Cordyceps militaris* fruit bodies. *Journal of Microbiology*, *57*(1), 54-63.
- Patthanajuck, V., & Bunnag, S. (2021). Effects of carbon and nitrogen sources on fruiting body formation and cordycepin production of *Cordyceps militaris* (L.) Link. *Khon Kaen Agriculture Journal*, *49*, 274-283.
- Phull, A.R., Ahmed, M., & Park, H.J. (2022). *Cordyceps militaris* as a Bio Functional Food Source: Pharmacological Potential, Anti-Inflammatory Actions and Related Molecular Mechanisms. *Microorganisms*, *10*, 1-31.
- Raethong, N., Wang, H., Nielsen, J., & Vongsangnak, W. (2020). Optimizing cultivation of *Cordyceps militaris* for fast growth and cordycepin overproduction using rational design of synthetic media. *Computational and structural biotechnology journal*, *18*, 1-8.
- Shrestha, B., Park, Y. J., Han, S. K., Choi, S. K., & J. M. (2004a). Instability *in vitro* fruiting of *Cordyceps militaris*. *Journal Mushroom Science and Production*, *2*, 140-144.
- Shrestha, B., Kim, H. K., Sung G. H., Spatafora, J. W., Sung, J. M. (2004b). Bipolar Heterothallism, a Principal Mating System of *Cordyceps militaris in vitro*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *9*, 440-446.

- Shrestha, B., Lee, W. H., Han, S. K., & Sung, J. M. (2006). Observations on some of the mycelial growth and pigmentation characteristics of *Cordyceps militaris* isolates. *Mycobiology* 34: 83–91.
- Shrestha, B., Zhang, W., Zhang, Y., & Liu, X. (2012). The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. *Mycological progress*, 11, 599-614.
- Shrestha, B., Han, S. K., Sung, J. M., & Sung, G. H. (2012). Fruiting body formation of *Cordyceps militaris* from multi-ascospore isolates and their single ascospore progeny strains. *Mycobiology* 40, 100-106.
- Shrestha, B., Tanaka, E., Hyun, M. W., Han, J. G., Kim, C. S., Jo, J. W., & Sung, G. H. (2016). Coleopteran and Lepidopteran hosts of the entomopathogenic genus *Cordyceps* sensu lato. *Journal of Mycology*, 2016, 1-14.
- Shrestha, B., Kubatova, A., Tanaka, E., Oh, J., Yoon, D. H., Sung, J. M., & Sung, G. H. (2019). Spider-pathogenic fungi within Hypocreales (Ascomycota): their current nomenclature, diversity, and distribution. *Mycological Progress*, 18, 983-1003.
- Sung, J. M., Choi, Y. S., Shrestha, B. & Park, Y. J. (2002). Cultural characteristics of mycelial growth by *Cordyceps militaris*. *The Korean Journal of Mycology*. 30, 1-5.
- Sung, J. M., Park, Y. J., Lee, J. O, Han, S. K, Lee, W. H, Choi, S. K., & Shrestha, B. (2006). Effect of preservation periods and subcultures on fruiting body formation of *Cordyceps militaris* *in vitro*. *Mycobiology*, 34, 196-199.
- Sung, G. H., Sung, J. M., Hywel-Jones, N. L., & Spatafora, J. W. (2007a). A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular phylogenetics and evolution*, 44, 1204-1223.
- Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J. M., Luangsa-Ard, J. J., Shrestha, B., & Spatafora, J. W. (2007b). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in mycology*, 57, 5-59.
- Thananusak, R., Laoteng, K., Raethong, N., Zhang, Y., & Vongsangnak W. (2020). Metabolic responses of carotenoid and cordycepin biosynthetic pathways in *Cordyceps militaris* under light-programming exposure through genome-wide transcriptional analysis. *Biology*, 9, 1.14.
- Yang Z.L. 2020. *Ophiocordyceps sinensis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Recuperado en: http://iucn.ekoo.se/iucn/species_view/504340

- Yang, T., Sun, J., Lian, T., Wang, W., & Dong, C.H. (2014). Process optimization for extraction of carotenoids from medicinal caterpillar fungus, *Cordyceps militaris* (ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *16*, 125-135.
- Zheng, P., Xia, Y., Xiao, G., Xiong, C., Hu, X., Zhang, S., & Wang, C. (2011). Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional chinese medicine. *Genome Biology*, *12*, 1-21.

Conclusión general

Cordyceps s.l. es un grupo de ascomicetos muy interesantes en sentido evolutivo, ecológico, biotecnológico, agrícola, farmacológico, nutricional y medicinal. De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, actualmente en México se distribuyen 30 especies, de las cuales *Cordyceps mexicana* es un nuevo taxón descrito en esta investigación.

La descripción de *C. mexicana* implicó el trabajo de aproximadamente 5 años y el apoyo de micólogos mexicanos y la asesoría y colaboración con un micólogo coreano y una investigadora colombiana, quienes están especializados en el grupo *Cordyceps* s.l. Adicionalmente, la asesoría de una entomóloga. Las principales actividades realizadas fueron recolectas de especímenes en diferentes años, recolecta e incubación de hospederos inmaduros para obtención de adultos, caracterización macroscópica y microscópica de especímenes, obtención de material genético de diferentes loci y realización de análisis filogenéticos. Lo cual indica que el estudio de estos hongos lleva tiempo, sin embargo es posible de manera multidisciplinaria.

Cordyceps mexicana se distribuye en bosques de *Quercus-Pinus* y es parasita de pupas de polillas del género *Paradirphia* sp. Filogenéticamente es hermana del complejo *Cordyceps militaris*, el cual incluye a *C. changbaiensis*, *C. changchunensis*, *C. jingyuetanensis*, *C. kyusyuensis*, *C. militaris*, *C. ningxiaensis*, *C. oncoerae*, *C. roseostromata* y *C. shuifuensis*.

La morfología de *Cordyceps mexicana* es similar macro y microscópicamente a *C. militaris*. Las características que la diferencian son una coloración amarilla brillante del estroma, cordones miceliares blancos del hospedero al estroma, tallas más grandes en longitud de estroma, peritecios, ascosporas y el tipo de conidiación.

El cultivo *in vitro* en medios sólidos generales y ricos en nutrientes es posible, sin embargo, es difícil la obtención de cepas viables para fructificar. En cultivo sólido, el medio SDAY optimiza la producción de biomasa, y también es en el que se observa mayor coloración en la base. La menor producción de biomasa se obtuvo en los medios de trigo y maíz, que contienen almidón como fuente de carbono, por lo que no se recomienda la utilización de estos medios. Las cepas C1, C3, C5, C8, C10, C13 y C19 crecen e invaden completamente el sustrato de arroz blanco, arroz adicionado con larvas de chinicuil (lepidópteros) y larva de tenebrios (coleópteros), adicionalmente

desarrollan primordios, sin embargo, no desarrollaron cuerpos fructíferos (estromas), lo cual indica que tienen la capacidad de fructificar, pero es necesario realizar bioensayos que evalúen variables como temperatura, aireación, luz y bases de sustrato

Perspectivas

Como perspectivas de este estudio, es indispensable crear una línea de investigación en la cual se efectúe investigación básica y aplicada de las especies silvestres del grupo *Cordyceps* s.l. distribuidas en México.

Con respecto al cultivo de *Cordyceps mexicana* es necesario realizar la evaluación de variables abióticas y bióticas en la fase de inducción de fructificación, para completar su ciclo de cultivo en laboratorio. Al mismo tiempo iniciar investigación de metabolitos, compuestos nutraceuticos, actividad bioactiva como antibacteriana, antioxidante, antiviral, anticancerígena, entre otras. Lo cual permitirá su aprovechamiento farmacológico, medicinal y alimenticio para beneficio de la sociedad.

Referencias bibliográficas

- Adnan, M., Ashraf, S. A., Khan, S., Alshammari, E., & Awadelkareem, A. M. (2017). Effect of pH, temperature and incubation time on cordycepin production from *Cordyceps militaris* using solid-state fermentation on various substrates. *Journal of Food*, *15*(4), 617-621.
- Araújo, J. P., & Hughes, D. P. (2016). Diversity of entomopathogenic fungi: which groups conquered the insect body? *Advances in genetics*, *94*, 1-39.
- Araújo, J. P. M., Evans, H. C., Kepler, R., & Hughes, D. P. (2018). Zombie-ant fungi across continents: 15 new species and new combinations within *Ophiocordyceps*. I. *Myrmecophilous hirsutella* species. *Studies in Mycology*, *90*(1), 119-160.
- Baral, B., Shrestha, B., & da Silva, J. T. (2015). A review of Chinese *Cordyceps* with special reference to Nepal, focusing on conservation. *Environmental and Experimental Biology*, *13*(2), 61-73.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American journal of botany*, *98*(3), 426-438.
- Carilli, A., & Pacioni, G. (1977). Growth and sporulation of *Cordyceps militaris* (Linn. ex Fr.) Link in submerged culture. *Transactions of the British Mycological Society*, *68*(2), 237-243.
- Carrera, D. M. (2018). Importancia de la producción de hongos comestibles, funcionales y medicinales en la alimentación y el desarrollo nacional. *Agro Productividad*, *3*(3), 16-20
- Chang, S. T., & Miles, P. G. (2004). *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. CRC press.
- Chaverri, P., Liu, M., & Hodge, K. T. (2008). A monograph of the entomopathogenic genera *Hypocrella*, *Moelleriella*, and *Samuelsia* gen. nov. (Ascomycota, Hypocreales, Clavicipitaceae), and their aschersonia-like anamorphs in the Neotropics. *Studies in Mycology*, *60*, 1-66.
- Chen, W., Liang, J., Ren, X., Zhao, J., Han, Y., & Liang, Z. (2021). Cryptic Diversity of Isaria-like Species in Guizhou, China. *Life*, *11*(10), 1093.
- Chen, W. H., Han, Y. F., Liang, J. D., Tian, W. Y., & Liang, Z. Q. (2021). Multi-gene phylogenetic evidence indicates that *Pleurodesmospora* belongs in Cordycipitaceae (Hypocreales, Hypocreomycetidae) and *Pleurodesmospora lepidopterorum* sp. nov. on pupa from China. *MycKeys*, *80*, 45-55.

- Chirivi, J., Danies, G., Sierra, R., Schauer, N., Trenkamp, S., Restrepo, S., & Sanjuan, T. (2017). Metabolomic profile and nucleoside composition of *Cordyceps nidus* sp. nov. (Cordycipitaceae): a new source of active compounds. *PLoS One*, *12*(6), e0179428.
- Cunningham, K. G., Manson, W., Spring, F. S., & Hutchinson, S. A. (1950). Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. *Nature*, *166*(4231), 949-949.
- Cunningham, K. G., Hutchinson, S. A., Manson, W., & Spring, F. S. (1951). Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) link. Part I. Isolation and characterisation. *Journal of the Chemical Society*, *508*, 2299-2300.
- Dong, J. Z., Lei, C., Zheng, X. J., Ai, X. R., Wang, Y., & Wang, Q. (2013). Light wavelengths regulate growth and active components of cordyceps militaris fruit bodies. *Journal of Food Biochemistry*, *37*(5), 578-584.
- Gao, S., Meng, W., Zhang, L., Yue, Q., Zheng, X., & Xu, L. (2021). *Parametarhizium* (Clavicipitaceae) gen. nov. With Two New Species as a Potential Biocontrol Agent Isolated From Forest Litters in Northeast China. *Frontiers in microbiology*, *12*, 131.
- Gazis, R., Skaltsas, D., & Chaverri, P. (2014). Novel endophytic lineages of *Tolypocladium* provide new insights into the ecology and evolution of Cordyceps-like fungi. *Mycologia*, *106*(6), 1090-1105.
- Guo, C., Zhu, J., Zhang, C., & Zhang, L. (1998). Determination of adenosine and 3'-deoxyadenosine in *Cordyceps militaris* (L.) Link. by HPLC. *China Journal of Chinese Materia Medica*, *23*(4), 236-256.
- Guzmán, G., Morón, M. A., & Ramírez-Guillen, F. (2001). Entomogenous *Cordyceps* and related genera from México with discussion on their hosts and new records. *Mycotaxon*, *78*, 115-126.
- Guzmán, G. (2008). Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *10*(3), 209-217.
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological research*, *95*(6), 641-655.
- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology spectrum*, *5*(4), 1-17.

- Holliday, J., & Cleaver, M. P. (2008). Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). A review. *International journal of medicinal mushrooms*, 10(3), 219-234.
- Holliday, J. (2017). *Cordyceps*: a highly coveted medicinal mushroom. In *Medicinal Plants and Fungi: Recent Advances in Research and Development* (pp. 59-91). Springer, Singapore.
- Hu, J. J., Zhao, G. P., Tuo, Y. L., Dai, D., Guo, D. Z., Rao, G., & Zhang, B. (2021). Morphology and molecular study of three new Cordycipitoid fungi and its related species collected from Jilin Province, northeast China. *MycKeys*, 83, 161-180.
- Kato, T., Nishimura, K., Suparmin, A., Ikeo, K., & Park, E. Y. (2021). Effects of cordycepin in *Cordyceps militaris* during its infection to Silkworm Larvae. *Microorganisms*, 9(4), 681.
- Kepler, R. M., Luangsa-Ard, J. J., Hywel-Jones, N. L., Quandt, C. A., Sung, G. H., Rehner, S. A., & Shrestha, B. (2017). A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). *IMA fungus*, 8(2), 335-353.
- Kuo, H. C., Huang, I. C., & Chen, T. Y. (2015). *Cordyceps sl* (Ascomycetes) species used as medicinal mushrooms are closely related with higher ability to produce cordycepin. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(11), 1077-1085.
- Lei, W., Zhang, G., Peng, Q., & Liu, X. (2015). Development of *Ophiocordyceps sinensis* through plant-mediated interkingdom host colonization. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 17482-17493.
- Lennon, M. B., & Suhadolnik, R. J. (1976). Biosynthesis of 3'-deoxyadenosine by *Cordyceps militaris*: mechanism of reduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 425(4), 532-536.
- Li, X., Wang, J., Zhang, H., Xiao, L., Lei, Z., Kaul, S. C., & Zhang, Z. (2021). Low Dose of Fluoride in the Culture Medium of *Cordyceps militaris* Promotes Its Growth and Enhances Bioactives with Antioxidant and Anticancer Properties. *Journal of Fungi*, 7(5), 342.
- Lo, H. C., Hsieh, C., Lin, F. Y., & Hsu, T. H. (2013). A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in DongChongXiaCao and related bioactive ingredients. *Journal of traditional and complementary medicine*, 3(1), 16-32.
- López Rodríguez, L. (2017). *Aislamiento de cepas y obtención de metabolitos secundarios del género entomopatógeno Cordyceps sensu lato del estado de México* (Tesis maestría, UAEMex). Recuperado de: <https://docplayer.es/146726200-Universidad-autonoma-del->

- López-Rodríguez, L., & Burrola-Aguilar, C. (2019). Hongos parásitos de insectos y otros hongos: una alternativa de alimento funcional. *AGROProductividad*, 12(5), 57-63.
- Mehra, A., Zaidi, K. U., Mani, A., & Thawani, V. (2017). The health benefits of *Cordyceps militaris*-A review. *Kavaka*, 48(1), 27-32.
- Meng, Z., Wen, T., Kang, J., Lei, B., & Hyde, K. D. (2014). *Cordyceps pruinosa* produces cordycepin and N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine in culture. *Archives of Biological Sciences*, 66(4), 1411-1421.
- Mishra, S., Kumar, P., Malik, A., & Satya, S. (2011). Adulticidal and larvicidal activity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), in laboratory and simulated field bioassays. *Parasitology Research*, 108(6), 1483-1492.
- Mongkolsamrit, S., Kobmoo, N., Tسانathai, K., Khonsanit, A., Noisripoom, W., Srikitikulchai, P., & Luangsa-Ard, J. J. (2012). Life cycle, host range and temporal variation of *Ophiocordyceps unilateralis/Hirsutella formicarum* on Formicine ants. *Journal of invertebrate pathology*, 111(3), 217-224.
- Mongkolsamrit, S., Noisripoom, W., Thanakitpipattana, D., Wutikhun, T., Spatafora, J. W., & Luangsa-Ard, J. (2018). Disentangling cryptic species with *Isaria*-like morphs in Cordycipitaceae. *Mycologia*, 110(1), 230-257.
- Mongkolsamrit, S., Noisripoom, W., Tسانathai, K., Khonsanit, A., Thanakitpipattana, D., Himaman, W., & Luangsa-ard, J. J. (2020). Molecular phylogeny and morphology reveal cryptic species in *Blackwellomyces* and *Cordyceps* (Cordycipitaceae) from Thailand. *Mycological Progress*, 19(9), 957-983.
- Ng, T. B., & Wang, H. X. (2005). Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(12), 1509-1519.
- Nikoh, N., & Fukatsu, T. (2000). Interkingdom host jumping underground: phylogenetic analysis of entomoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Molecular biology and evolution*, 17(4), 629-638.

- ODS-Sédoc. (2015). *Memoria del secretario general sobre la labor de la Organización*. Nueva York: Naciones Unidas. Recuperado de <https://documents-dds-ny.un.org/doc/UNDOC/GEN/N15/228/31/PDF/N1522831.pdf?OpenElement>
- Oh, J., Yoon, D. H., Shrestha, B., Choi, H. K., & Sung, G. H. (2019). Metabolomic profiling reveals enrichment of cordycepin in senescence process of *Cordyceps militaris* fruit bodies. *Journal of Microbiology*, 57(1), 54-63.
- Padmini, P. C. P., & Padmaja, V. (2010). Impact of different relative humidities on in vitro growth and sporulation of entomopathogenic fungal isolates of *Beauveria* species. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1, 355-359.
- Patel, K. J., & Ingalhalli, R. S. (2013). *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Link-An Important Medicinal Mushroom. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(1), 315-319.
- Paterson, R. R. M. (2008). *Cordyceps*—a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? *Phytochemistry*, 69(7), 1469-1495.
- Pérez-González, V. H., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., Hernández-López, J., Hernández-López, A., Carrillo-Benítez, M. G., & Baverstock, J. (2014). Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. *Journal of invertebrate pathology*, 119, 54-61.
- Pérez-Silva, E. (1977). Algunas especies del género *Cordyceps* (Pyrenomycetes) en México. *Scientia Fungorum*, (11), 145-153.
- Pérez-Silva, E. (1978). Nuevos registros del género *Cordyceps* (Pyrenomycetes) en México. *Scientia Fungorum*, (12), 19-25.
- Pérez-Silva, E. (1979). Nota sobre la posible relación del género *Cordyceps* (Pyrenomycetes) con los tlalomites de los Aztecas. *Scientia Fungorum*, (13), 253-256.
- Pérez-Villamares, J. C., Burrola-Aguilar, C., Aguilar-Miguel, X., Sanjuan, T., & Jiménez-Sánchez, E. (2017). Nuevos registros de hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* *sl* (Ascomycota: Hypocreales) del Estado de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 88(4), 773-783.
- Pintathong, P., Chomnunti, P., Sangthong, S., Jirarat, A., & Chaiwut, P. (2021). The Feasibility of Utilizing Cultured *Cordyceps militaris* Residues in Cosmetics: Biological Activity Assessment of Their Crude Extracts. *Journal of Fungi*, 7(11), 973.

- Qin, Q. L., Zhou, G. L., Zhang, H., Meng, Q., Zhang, J. H., Wang, H. T., & Li, X. (2018). Obstacles and approaches in artificial cultivation of Chinese Cordyceps. *Mycology*, *9*(1), 7-9.
- Quandt, C. A., Kepler, R. M., Gams, W., Araújo, J. P., Ban, S., Evans, H. C., & Spatafora, J. W. (2014). Phylogenetic-based nomenclatural proposals for Ophiocordycipitaceae (Hypocreales) with new combinations in Tolypocladium. *IMA fungus*, *5*(1), 121-134.
- Quandt, C. A., Patterson, W., & Spatafora, J. W. (2018). Harnessing the power of phylogenomics to disentangle the directionality and signatures of interkingdom host jumping in the parasitic fungal genus *Tolypocladium*. *Mycologia*, *110*(1), 104-117.
- Raethong, N., Wang, H., Nielsen, J., & Vongsangnak, W. (2020). Optimizing cultivation of *Cordyceps militaris* for fast growth and cordycepin overproduction using rational design of synthetic media. *Computational and structural biotechnology journal*, *18*, 1-8.
- Rubio-Bustos, S., Guzmán-Dávalos, L., & Navarrete-Heredia, J. L. (1999). Especies entomopatógenas de *Cordyceps* (fungi, Ascomycotina) en México. *Boletín del Instituto de Botánica*, *7*(1-3), 135-157.
- Sanjuan, T. I., Franco-Molano, A. E., Kepler, R. M., Spatafora, J. W., Tabima, J., Vasco-Palacios, A. M., & Restrepo, S. (2015). Five new species of entomopathogenic fungi from the Amazon and evolution of neotropical Ophiocordyceps. *Fungal Biology*, *119*(10), 901-916.
- Sharma, S. (2004). Trade of *Cordyceps sinensis* from high altitudes of the Indian Himalaya: conservation and biotechnological priorities. *Curret Science Bangalore*, *86*, 1614-1618.
- Shrestha, B., Kim, H. K., Sung, G. H., Spatafora, J. W., & Sung, J. M. (2004). Bipolar heterothallism, a principal mating system of *Cordyceps militaris* in vitro. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *9*(6), 440-446.
- Shrestha, B., Lee, W. H., Han, S. K., & Sung, J. M. (2006). Observations on some of the mycelial growth and pigmentation characteristics of *Cordyceps militaris* isolates. *Mycobiology*, *34*(2), 83-91.
- Shrestha, B. (2011). Diversity of *Cordyceps* fungi in Nepal. *Nepal Journal of Science and Technology*, *12*, 103-110.
- Shrestha, B., Han, S. K., Sung, J. M., & Sung, G. H. (2012). Fruiting body formation of *Cordyceps militaris* from multi-ascospore isolates and their single ascospore progeny strains. *Mycobiology*, *40*(2), 100-106.

- Shrestha, B., Zhang, W., Zhang, Y., & Liu, X. (2012). The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. *Mycological progress*, *11*(3), 599-614.
- Shrestha, B., Tanaka, E., Hyun, M. W., Han, J. G., Kim, C. S., Jo, J. W., & Sung, G. H. (2016). Coleopteran and Lepidopteran hosts of the entomopathogenic genus *Cordyceps* sensu lato. *Journal of Mycology*, *2016*, 1-14.
- Shrestha, B., Kubatova, A., Tanaka, E., Oh, J., Yoon, D. H., Sung, J. M., & Sung, G. H. (2019). Spider-pathogenic fungi within Hypocreales (Ascomycota): their current nomenclature, diversity, and distribution. *Mycological Progress*, *18*(8), 983-1003.
- Spatafora, J. W., Sung, G. H., Sung, J. M., Hywel-Jones, N. L., & White Jr, J. F. (2007). Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Molecular ecology*, *16*(8), 1701-1711.
- Spatafora, J. W., Quandt, C. A., Kepler, R. M., Sung, G. H., Shrestha, B., Hywel-Jones, N. L., & Luangsa-Ard, J. J. (2015). New species combinations in Ophiocordycipitaceae (Hypocreales). *IMA fungus*, *6*(2), 357-362.
- 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.
- Su, C. H., & Wang, H. H. (1986). *Phytocordyceps*, a new genus of the Clavicipitaceae. *Mycotaxon*, *26*, 337-344.
- Sugiyama, J., Hosaka, K., & Suh, S. O. (2006). Early diverging Ascomycota: phylogenetic divergence and related evolutionary enigmas. *Mycologia*, *98*(6), 996-1005.
- Sung, G. H., & Spatafora, J. W. (2004). *Cordyceps cardinalis* sp. nov., a new species of *Cordyceps* with an east Asian-eastern North American distribution. *Mycologia*, *96*(3), 658-666.
- Sung, G. H., Sung, J. M., Hywel-Jones, N. L., & Spatafora, J. W. (2007). A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular phylogenetics and evolution*, *44*(3), 1204-1223.
- Sung, G. H., 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.

- Sung, G. H., Shrestha, B., Han, S. K., Kim, S. Y., & Sung, J. M. (2010). Growth and cultural characteristics of *Cordyceps cardinalis* collected from Korea. *Mycobiology*, 38(4), 274-281.
- Suparmin, A., Kato, T., Dohra, H., & Park, E. Y. (2017). Insight into cordycepin biosynthesis of *Cordyceps militaris*: Comparison between a liquid surface culture and a submerged culture through transcriptomic analysis. *PloS ONE*, 12(11), 1-16.
- Suparmin, A., Kato, T., Takemoto, H., & Park, E. Y. (2019). Metabolic comparison of aerial and submerged mycelia formed in the liquid surface culture of *Cordyceps militaris*. *Microbiologyopen*, 8(9), 1.21.
- Takahashi, S., Tamai, M., Nakajima, S., Kato, H., Johno, H., Nakamura, T., & Kitamura, M. (2012). Blockade of adipocyte differentiation by cordycepin. *British journal of pharmacology*, 167(3), 561-575.
- Tian, L. H., Hu, B., Zhou, H., Zhang, W. M., Qu, L. H., & Chen, Y. Q. (2010). Molecular phylogeny of the entomopathogenic fungi of the genus *Cordyceps* (Ascomycota: Clavicipitaceae) and its evolutionary implications. *Journal of Systematics and Evolution*, 48(6), 435-444.
- Tsang, C. C., Chan, J. F., Pong, W. M., Chen, J. H., Ngan, A. H., Cheung, M., & Woo, P. C. (2016). Cutaneous hyalohyphomycosis due to *Parengyodontium album* gen. comb. nov. *Medical Mycology*, 54(7), 699-713.
- Tuli, H. S., Sandhu, S. S., & Sharma, A. K. (2014). Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to Cordycepin. *3 Biotech*, 4(1), 1-12.
- Vázquez-Martínez, M. G., Cirerol-Cruz, B. E., Torres-Estrada, J. L., & López, M. H. R. (2014). Potential for entomopathogenic fungi to control *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas disease in Mexico. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47, 716-722.
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., & Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *fungus ecology*, 2(4), 149-159.
- Wang, Y. B., Wang, Y., Fan, Q., Duan, D. E., Zhang, G. D., Dai, R. Q., & Yu, H. (2020). Multigene phylogeny of the family Cordycipitaceae (Hypocreales): new taxa and the new systematic

- position of the Chinese cordycipitoid fungus *Paecilomyces hepiali*. *Fungal Diversity*, 103(1), 1-46.
- Willis, K. J. (2018). State of the world's fungi 2018. Report. *State of the world's fungi 2018. Report*.
- Winkler, D. (2009). Caterpillar fungus (*Ophiocordyceps sinensis*) production and sustainability on the Tibetan Plateau and in the Himalayas. *Asian Medicine*, 5(2), 291-316.
- Wong, Y. Y., Moon, A., Duffin, R., Barthet-Barateig, A., Meijer, H. A., Clemens, M. J., & de Moor, C. H. (2010). Cordycepin inhibits protein synthesis and cell adhesion through effects on signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 285(4), 2610-2621.
- Wongsa, P., Tasanatai, K., Watts, P., & Hywel-Jones, N. (2005). Isolation and in vitro cultivation of the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis*. *Mycological research*, 109(8), 936-940.
- World Economic Forum. (2022). *The Global Risks Report 2022 17th Edition*. Switzerland: World Economic Forum. Recuperado de <https://www.weforum.org/reports/global-risks-report-2022>.
- Wu, F., Yan, H., Ma, X., Jia, J., Zhang, G., Guo, X., & Gui, Z. (2012). Comparison of the structural characterization and biological activity of acidic polysaccharides from *Cordyceps militaris* cultured with different media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 2029-2038.
- Xia, F., Chen, X., Guo, M. Y., Bai, X. H., Liu, Y., Shen, G. R., & Zhou, X. W. (2016). High-throughput sequencing-based analysis of endogenetic fungal communities inhabiting the Chinese *Cordyceps* reveals unexpectedly high fungal diversity. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- Xiang, L., Li, Y., Zhu, Y., Luo, H., Li, C., Xu, X., & Chen, S. (2014). Transcriptome analysis of the *Ophiocordyceps sinensis* fruiting body reveals putative genes involved in fruiting body development and cordycepin biosynthesis. *Genomics*, 103(1), 154-159.
- Yang, Z. L. (2020). *Ophiocordyceps sinensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020. Recuperado de http://iucn.ekoo.se/iucn/species_view/504340
- Yu, F. M., Thilini Chethana, K. W., Wei, D. P., Liu, J. W., Zhao, Q., Tang, S. M., & Hyde, K. D. (2021). Comprehensive Review of *Tolypocladium* and Description of a Novel Lineage from Southwest China. *Pathogens*, 10(11), 1389.

- Zhang, Y., Li, E., Wang, C., Li, Y., & Liu, X. (2012). *Ophiocordyceps sinensis*, the flagship fungus of China: terminology, life strategy and ecology. *Mycology*, 3(1), 2-10.
- Zhang, Q., Liu, Y., Di, Z., Han, C., & Liu, Z. (2016). The strategies for increasing cordycepin production of *Cordyceps militaris* by liquid fermentation. *Fungal Genom Biol*, 6, 1-5.
- Zhao, X., Zhang, G., Li, C., & Ling, J. (2019). Cordycepin and pentostatin biosynthesis gene identified through transcriptome and proteomics analysis of *Cordyceps kyushuensi*. *Microbiological research*, 218, 12-21.
- Zheng, P., Xia, Y., Xiao, G., Xiong, C., Hu, X., Zhang, S., & Wang, C. (2011). Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional chinese medicine. *Genome Biology*, 12, 1-21
- Zhou, Y., Wang, M., Zhang, H., Huang, Z., & Ma, J. (2019). Comparative study of the composition of cultivated, naturally grown *Cordyceps sinensis*, and stiff worms across different sampling years. *PloS ONE*, 14(12), 1-15.