

Raquel Cherem Schwarz Friedrich

**ASPECTOS SOBRE A TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO  
DE *OPHIOCORDYCEPS NUTANS* COMPLEX  
(OPHIOCORDYCEPTACEAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos

Coorientador: Dr. Bhushan Shrestha



**Florianópolis  
2015**

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

Friedrich, Raquel

ASPECTOS SOBRE A TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO DE  
OPHIOCORDYCEPS NUTANS COMPLEX (OPHIOCORDYCEPTACEAE) /  
Raquel Friedrich ; orientador, Elisandro Ricardo  
Drechsler- Santos ; coorientador, Bhushan Shrestha. -  
Florianópolis, SC, 2015.

98 p.

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

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Ascomycota.  
3. Entomopatógenos. 4. Cordyceps. 5. Parasitas de percevejo  
(Hemiptera). I. Drechsler- Santos, Elisandro Ricardo. II.  
Shrestha, Bhushan. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos,  
Algas e Plantas. IV. Título.

**“Aspectos sobre a taxonomia e distribuição de  
*Ophiocordyceps nutans* (Ophiocordyceptaceae)”**


por


**Raquel Cherem Schwarz  
Friedrich**


Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. .22/PPGFAP/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas - UFSC, composta pelos Professores Doutores:


Banca Examinadora:

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

  
Prof.ª Dra. Andréa Romero (Universidade de Buenos Aires/CONICET)

  
Prof. Dr. Marcus Arduvino Reck (CCB/UFSC)

  
Prof. Dr. Rafael Trevisan (CCB/UFSC)

  
Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos,  
Algas e Plantas

Florianópolis, 12 de junho de 2015.





Este trabalho é dedicado aos meus mestres, orientadores e inspiradores, a mãe natureza, aos meus pais e ao meu amado.



## AGRADECIMENTOS

Meu muito obrigado ao meu orientador por tudo, pelas discussões, paciência, ensinamentos. Ao meu coorientador que apesar de ainda não me conhecer pessoalmente sempre esteve disposto e solícito para todas as questões.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro em forma de bolsa.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Departamento de Botânica e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas por todo o suporte oferecido na execução do projeto.

Aos docentes e pesquisadores do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas que de várias formas contribuíram para o meu crescimento e para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, Parque Municipal da Lagoa do Peri, Unidade de Conservação Ambiental Desterro (UCAD) (Florianópolis, SC), Parque estadual da Serra do Tabuleiro (Sul do estado de Santa Catarina), Parque Nacional Chapada dos Guimarães (Mato Grosso, MT) pelas permissões e apoios durante as expedições de coletas.

Aos curadores e assistentes dos herbários, FLOR, NYBG, pela disponibilização de materiais para estudo.

Ao Dr. Fumito Sasaki, pelo material de referência enviado para estudo e pelas discussões e compartilhamento do seu conhecimento.

Agradeço, aos MiCOlegas e agregados pelo companheirismo em todas as horas, seja nas disciplinas, no laboratório, nas coletas e pelo compartilhamento de seus conhecimentos nas reuniões, discussões e também nas confraternizações. Aos amigos feitos durante esse tempo, muitos de longe e que deixarão saudades, ficarão para sempre.

Gratidão ao João pelos desenhos, Carlitos e Mateus pelas discussões e ensinamentos, Fernando por compartilhar a paixão pelo mundo dos *Cordyceps*, Genis, Gesi, Val, Diogo, Alti, Salo,

Ari, Cel, Júlia, Fer, Cauê, Jaime, Meli, Caio, M.A., família Micolab!

Gratidão aos meus pais e ao meu marido pela compreensão, apoio, força e paciência nessa caminhada.

Agradeço ao universo e a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

E claro a mãe natureza que contribuiu lindamente com essa pesquisa mostrando sua diversidade de relações interespecíficas.

Raquel Cherem Schwarz Friedrich





“Eu quero dizer agora o oposto do que eu disse antes, eu prefiro ser essa metamorfose ambulante, do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo...”

(Raul Seixas)



## RESUMO

Os fungos entomopatógenos (Hypocreales, Ascomycota), conhecidos de modo geral como *Cordyceps s.l.*, utilizam diferentes espécies de artrópodes como hospedeiros, onde desenvolvem parte do seu ciclo de vida. São responsáveis pelo equilíbrio de populações de insetos, contaminam os insetos hospedeiros e utilizam seus corpos como substrato para a produção de estruturas reprodutivas sexuais e ou assexuais. Os estudos sobre *Cordyceps s.l.* no Brasil são antigos ou escassos para uma diversidade potencialmente grande. Com o objetivo de contribuir para o conhecimento desses fungos no Brasil e na região Neotropical, foram estudados aspectos sobre ecologia, morfologia e molecular de *Cordyceps s.l.* com foco em um táxon em especial, pertencente ao gênero *Ophiocordyceps*. *Ophiocordyceps nutans* (Pat.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora é morfologicamente caracterizado por apresentar estipe filiforme, preto, com a região fértil bem delimitada, intumescida, vermelha. Foi descrita a partir de espécimes do Japão e é comumente encontrado na Coréia em meio à serapilheira, parasitando obrigatoriamente insetos da ordem Hemiptera. No Brasil espécimes morfologicamente relacionados vêm sendo coletados, parasitando a mesma ordem de insetos, e sendo assim previamente determinados como o táxon asiático, *O. nutans*. A fim de confirmar se o táxon que ocorre no Brasil representa a mesma espécie coletada no Japão foram coletados mais de 100 espécimes com morfologia semelhante a *O. nutans*. Foram realizadas análises morfológicas e moleculares, bem como a obtenção de culturas, os dados ecológicos também foram considerados neste estudo. No capítulo 1, são apresentadas evidências de que o táxon corresponda a um complexo de espécies crípticas, composto por duas linhagens Asiáticas e uma linhagem Neotropical. No capítulo 2, com base na filogenia gerada a partir de sequências ITS de DNA ribossomal, provenientes de espécimes Asiáticos e Brasileiros, foram observadas as três linhagens mencionadas, sendo, por tanto, proposta a espécie nova, *Ophiocordyceps neonutans sp. nov. ad int.* No capítulo 3 é apresentada uma possível nova espécie de *Ophiocordyceps*, que parasita insetos da ordem Hemiptera, no entanto da subordem Homoptera. Os peritécios ovoides e os esporos fusoides são as principais

características diagnósticas desta espécie. Por fim, considerando o apresentado, os registros de *O. nutans* para o resto do mundo precisam ser revisados. Além disso, novas coletas e análises moleculares (multiloci) deste complexo se fazem necessárias, principalmente considerando as evidências ecológicas (hospedeiro e distribuição geográfica) para o entendimento das linhagens como espécies a serem descritas.

**Palavras-chave:** Sistemática. Hypocreales. *Cordyceps*, Pentatomidae.



## ABSTRACT

The entomopathogenic fungi (Hypocreales, Ascomycota), broadly known as *Cordyceps* s.l, use different arthropod species as hosts, where they develop part of their life cycle. Responsible for the balance of insect populations, they infect specific hosts contaminating their bodies using it as a substrate for production of sexual or asexual reproductive structures. Under the research project MICOLAB / UFSC which aims to contribute to the knowledge of these fungi in Brazil and in the Neotropics were studied aspects of ecology, morphology and molecular in *Cordyceps* s.l. focusing on a taxon in particular belonging to *Ophiocordyceps* genre. *Ophiocordyceps nutans* (Pat.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007 is morphologically characterized by having threadlike stipe, black, with a fertile region well delimited swollen, red. It was described from Japan specimens and is commonly found in Korea amid the leaf litter, necessarily parasite insects of the order Hemiptera. In Brazil morphologically related specimens have been collected, parasitizing the same order of insects, so they were predetermined as the Asian taxon, *O. nutans*. In order to confirm if the taxon that occurs in Brazil is the same species collected in Japan, were collected in Brazilian field expeditions more than 100 specimens with similar morphology to *O. nutans*. Morphological and molecular analyzes were performed, as well as obtaining cultures, ecological data were also considered in this study. In Chapter 1, evidence were presented that the taxon corresponds to a complex of cryptic species, composed of 2 Asian lineages and one geographically distinct Neotropical lineage of *Ophiocordyceps nutans*. In chapter 2, based on the phylogeny generated from ribosomal DNA ITS sequences, from Asian and Brazilian specimens. Three distinct lineages were observed, and was proposed a new species. *Ophiocordyceps neonutans* sp. nov. Ad int. parasitizing Pentatomidae (Hemiptera) in Brazilian territory. Chapter 3 presents a possible new species of *Ophiocordyceps* that parasitizes insects of the Hemiptera order, however in the suborder Homoptera. Perithecia ovoid and fusiform spores are the main diagnostic features of this species. Finally, considering the presented, *O. nutans* records for the rest of the

world need to be reviewed. In addition, new collections and molecular analyzes (multiloci) of this complex are necessary, especially considering the ecological evidence (Host and geographical distribution) to understand the lineages as species to be described.

**Keywords:** Systematic. Hypocreales. Cordyceps, Pentatomidae.





## LISTA DE FIGURAS

### Material e métodos

Fig. 1. Áreas de amostragem no Brasil de fungos de entomopatógenos com morfologia relacionada à *Ophiocordyceps nutans*..... 29

### Capítulo 1

Fig. 1. Brazilian (A, B) and Japanese (C) specimens of *Ophiocordyceps nutans* s.l. (scale bar = 15mm). ..... 44

Fig. 2. Phylogenetic relationship of *O. nutans*, *O. neonutans* and other *Ophiocordyceps* species based on rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences. Consensus tree (MV) obtained from the heuristic search is presented. .... 62

### Capítulo 2

Fig. 1. A. Specimens of *O. nutans* from Asian. B. Specimens of *O. neonutans* from Brazil. C. Fertile part of *O. nutans*. D. Perithecial ascomata of *O. nutans*. E. *O. neonutans* with two stromatas. F. Fertile part of *O. neonutans* (1.50mm). G. Perithecial ascomata of *O. neonutans*. (scale bars: A = 10cm, B = 10cm, C = 1.5mm, D = 1000µm, E = 10mm, F= 1000µm). ..... 63

Fig. 2. Spores of *O. neonutans* starting the germination. B. Ascospore, showing the prominent apex (cap). C. Stroma of the fertile part crowded of immersed perithecia, obliquely distributed. (scale bars: A = 10µm, B = 8µm, C = 700µm) ..... 64

Fig. 3. Figure 4. A. Ascospores discharge of *O. neonutans* on slide glass. B. Spore print of *O. neonutans* in agar-agar plates. C. Fertile region of *O. neonutans* with spores. D. Spore print of *O. neonutans* in a petri dishe with slide glasses. E., F. Spores development of *O. neonutans*, third day. G. Ascospores development, fifth day. H. Ascospores development seventh day. I. Part spores development seventh day. (scale bars: A, B, D = 5cm, C = 1.5mm, D = 1000µm, E, F = 10µm, G = 50µm, H = 20µm). ..... 65

Fig. 4. A., B. Integrity ascospores of *O. neonutans* with 64 part spores in wich one. C., D. SEM of ascospores and part spores. E. MO of Ascospores. F. Part spores starting its germination. (scale bars: A, B = 100µm, C, D = 5µm, D = 1000µm, E, F = 10µm). ..... 66

Fig. 5. Anamorphic structures of *O. neonutans* A. Micelia inside insect body of *O. neonutans*. B. Elipsoid anamorph spore and the teleomorph spore of *O. neonutans*. C. Hyphal layer of the aperithecial *O. neonutans*. D. Aperithecial specimen of *O. neonutans*. (scale bars: A = 2cm B = 10µm, C = 10µm, D = 10µm). ..... 67

Fig. 6. Barcoding Gap analysis between Japanese, Chinese ant Brazilian lineages of *O. nutans*. A. showing interspecific genetic distances and B. intraspecific genetic distances. .... 68

### Capítulo 3

Fig. 1. *Ophiocordyceps* sp.1. A. vista geral do espécime fúngico e hospedeiro. 1. B. Região fértil. C. Secção longitudinal do ascoma

mostrando o estroma e disposição dos peritécios. D. Hospedeiro Homoptera. E. Peritécios ovoides, imersos no estroma. F. *Cap* bem pronunciado dos ascosporos (30  $\mu\text{m}$ ). G. *Part spores* fusoides. (escalas: A = escala = 10mm, B = 2mm, C = 1,8mm, D = 2mm, E = 400  $\mu\text{m}$ , F = 15  $\mu\text{m}$ )..... 79



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1.

Table 1. <i>Ophiocordyceps nutans</i> s.l. Macromorphology comparison of Japanese, Thailand and Brazilian specimens of <i>O. nutans</i> .....	46
---	----

### Capítulo 2.

Table 1. Species and respectively hosts used in the phylogenetic analysis. ....	69
Table 2. Specimens and voucher used in the phylogenetic analysis .....	70
Table 3. Morphological microscopically comparison into the <i>Ophiocordyceps nutans</i> species-complex. ....	72



## LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A. Culturas obtidas .....	84
Apêndice B. Sequências ITS.....	85
Apêndice C. Espécimes de <i>O. neonutans</i> coletados.....	86
Apêndice D. Espécimes de herbários analisados .....	90





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARF – Atlantic rain forest.

cm – centímetros.

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

Fig., Figs. – Figura, Figuras.

*i.e* – do latim *id est*, isto é.

Ibid. – do latim *ibidem*, no mesmo lugar.

KOH - Hidróxido de potássio, em solução a 3-5%

m – metros.

mm – milímetros.

SP – São Paulo.

MT – Mato Grosso.

SC – Santa Catarina.

PR – Paraná.

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

*Ad int.* – do latim *ad interim*, provisoriamente.

*sp. nov.* – do latim *species nova*, nova espécie.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
4.1 <i>Ophiocordyceps nutans</i> (Hypocreales, Ascomycota): a generalist and widely distributed species or a taxonomic complex of cryptic species? .....	34
4.2. <i>Ophiocordyceps neonutans</i> sp. nov. (Ascomycota, Hypocreales), a neotropical species of zombie-bugs fungus ( <i>Ophiocordyceps nutans</i> species-complex) from Brazil, based on morphological, molecular and ecological data .....	47
4.3. Análises morfológicas revelam uma possível espécie nova de <i>Ophiocordyceps</i> (Ascomycota, Hypocreales) que ataca percevejos Homoptera no Brasil .....	73
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	80
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	81





## 1. INTRODUÇÃO

### Fungos entomopatógenos

Os fungos entomopatógenos compreendem aproximadamente 500 espécies descritas, amplamente conhecidas como *Cordyceps.s.l* (Shrestha 2011). Hypocreales Lindau é a ordem de Ascomycota Wittaker com maior número de gêneros e espécies entomopatógenas, que utilizam invertebrados, principalmente membros da classe Insecta. Entre os hospedeiros, estão as ordens Coleoptera, Homoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Isoptera, Heteroptera, Orthoptera e Odonata, também ocorrendo em membros da classe Arachnida, representada por aranhas e opiliões principalmente (Evans *et al.* 1999; Nikoh & Fukatsu 2000). A grande maioria apresenta níveis de especialização por hospedeiros em particular, podendo infectar e utilizar desde uma ordem inteira como hospedeiro, ou até mesmo especificamente uma única espécie (Sasaki *et al.* 2012).

Esses fungos apresentam mecanismos especializados para reconhecer o hospedeiro, entretanto estes mecanismos ainda são pouco conhecidos. Acredita-se que o fungo consiga infectar o hospedeiro através da cutícula ou através das aberturas corporais (Tanada & Kaya 1993, Vega *et al.* 2009), atingindo o sistema imunológico do hospedeiro e consumindo sua hemolinfa até que o fungo consiga se reproduzir. Isto revela uma estratégia de sincronização do seu de ciclo de vida com o do hospedeiro (Bianco & Maizels 1989, Nikoh & Fukatsu 2000).

Os fungos entomopatógenos do gênero *Ophiocordyceps*, em sua maioria são estipitados, produzem estroma flexível, pigmentado com cores escuras, que frequentemente apresentam o ápice aperitecial (Sung *et al.* 2007). Tais fungos frequentemente causam episódios epizooticos naturais em populações de insetos, como relatado por Araújo *et al.* (2014). Neste trabalho, é relatado um epizódio onde são encontrados fungos infectando uma grande quantidade de indivíduos numa mesma área. Devido à especificidade por hospedeiro, muitos autores afirmam que membros deste grupo de fungos, principalmente em suas formas anamórficas (assexual), podem ser utilizados como agentes de controle seletivo de pragas (Ito & Hirano 1997; Sato *et al.* 1997; Evans *et al.* 1999; Nikoh & Fukatsu 2000, Vega *et al.* 2009). Neste sentido, o cultivo destes fungos apresenta grande interesse, mas esta é uma das grandes dificuldades encontradas no estudo de *Cordyceps s.l*. Muitas espécies são difíceis de cultivar, devido principalmente a esta especificidade pelo substrato, o que dificulta a manutenção e desenvolvimento das culturas em meios artificiais não específicos. O conhecimento sobre *Cordyceps*

*s.l.* na região Neotropical ainda é bastante limitado, havendo escassez de dados acerca de diversidade, distribuição, hospedeiros, entre outros aspectos importantes para o conhecimento deste grupo de fungos. Muitas espécies de *Ophiocordyceps* como *O. sinensis* (Berk) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, e *O. nutans* (Pat.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora por exemplo, vem sendo estudadas e cultivadas com interesse tanto biotecnológico como de biocontrole. Dentre as espécies de *Ophiocordyceps*, pela frequência que vem sendo coletado no Brasil, *O. nutans* merece atenção especial e será melhor estudada neste trabalho.

*Ophiocordyceps nutans* foi originalmente descrito como *Cordyceps nutans* a partir de material coletado no Japão. Apresenta distribuição disjunta, sendo registrado para diversos países como Taiwan, China, Nova Guiné, Sri Lanka, Gana (Samson e Evans 1975), Congo, Coreia, Rússia, Nepal (Shrestha 2011), Tailândia (Schumacher 1982), Zaire (Moureau 1949), Sibéria e Colômbia (Kobayasi 1981). Já existem registros deste táxon na literatura para a região Neotropical e no Brasil foi registrado para a Mata Atlântica do estado do Paraná (Meijer 2006).

Morfológicamente, o táxon *Ophiocordyceps nutans* (Pat.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora é caracterizado por apresentar estipe afilado, de coloração escura e região fértil intumescida, em forma de bastão, variando sua coloração entre amarelo, alaranjado e vermelho. *Ophiocordyceps nutans* apresenta dois estágios distintos de desenvolvimento, um estágio sexual (teleomorfo) e um estágio assexual (anamorfo). Espécimes deste táxon são encontrados parasitando especificamente insetos da ordem Hemiptera, subordem Heteroptera (Sasaki *et al.* 2012). Esta espécie vem sendo principalmente estudada no Oriente, pelo fato de ser uma das espécies de *Ophiocordyceps* mais comuns na Coreia (Sasaki *et al.* 2012), além disso, utiliza como hospedeiro, uma ordem de insetos que é uma das principais pragas de plantações; apresentando potencial uso como pesticida natural e possivelmente propriedades medicinais (Sasaki *et al.* 2012).

### **Variação morfológica e relação com hospedeiros**

No que diz respeito à morfologia, Mains (1959) realizou uma análise das espécies de *Cordyceps* da América do Norte. Dentre as espécies analisadas estava o espécime tipo de *O. nutans* da coleção de Patouillard, o qual encontra-se atualmente no Herbário Farlow da Universidade de Harvard (FH). Também analisou nesse trabalho espécimes de *O. nutans* provenientes da China (National Fungus

Collections) e da Argentina, coletados por Rolf Singer (MICH). Mains (1959) menciona que apesar da identificação do hospedeiro e da morfologia macroscópica serem proximamente relacionados, foram observadas algumas variações na coloração e tamanho dos ascomas. Também foram observadas variações microscópicas, como por exemplo, tamanho dos peritécios. Segundo Mains (1959), exceto pelo estroma bicolor, *O. nutans* é bastante similar a *Ophiocordyceps tricenri* (Yasuda) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, também registrada como parasita de Hemiptera no Japão. Além disso, Mains menciona que existem algumas espécies parasitas de formiga como *O. australis* (Speg) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora e parasitas de besouros como *O. curculionum* (Tul. & C. Tul) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, que apresentam o padrão bicolor do ascoma bastante semelhante ao de *O. nutans*. Todavia estas espécies apresentam ascoma de formato globoso.

No trabalho realizado por Sasaki *et al.* (2008), foi registrada a ocorrência de *O. nutans* parasitando nove diferentes espécies de hospedeiros, de cinco diferentes gêneros de Hemiptera. Foi possível observar neste trabalho, a partir de uma tabela de comparações, as variações no tamanho de algumas estruturas microscópicas, principalmente dos peritécios.

Essa possível relação ecológica específica com hospedeiros em particular é outro aspecto que chama muito a atenção e pode apresentar relevância taxonômica na identificação de linhagens biogeográficas. No caso do trabalho realizado por Karun *et al.* (2003), na Índia, os autores demonstraram que a relação específica envolve, além do fungo *O. nutans* e do inseto hospedeiro, neste caso *Halyomorpha halys* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae), a planta *Cassine glauca* (Rottb.). Ou seja, o inseto se alimenta da planta e é sob ela que são encontrados diversos insetos mortos parasitados pelo fungo. Os autores defendem a importância dessa relação para a conservação dos organismos envolvidos ao sugerir que estes apresentam certa interdependência.

Hywel-Jones (1995) registrou *Hymenostilbe nutans* Samson & H.C. Evans como fase anamórfica de *O. nutans*, para a Tailândia. Além disso, neste mesmo trabalho, o autor menciona uma ampla variação de tonalidade nas cores do estroma quando observados frescos (coloração mais forte e avermelhada) e depois de desidratados (coloração mais pálida e amarelada), fator que deve ser levado em consideração principalmente em análises de materiais de Herbários que normalmente estão muito desidratados.



Trabalhos de diversidade como de Schumacher (1982) e de Shrestha (2011) são importantes principalmente para a compreensão e conhecimento de outras espécies de *Cordyceps s.l* que ocupam nichos ecológicos semelhantes e são encontradas frequentemente próximas.

### **Obtenção de culturas e de sequências de DNA**

As primeiras tentativas de isolamento de *O. nutans* foram apresentadas por Sasaki *et al.* em 2004. Foram utilizados principalmente pedaços do estroma do fungo além de pedaços do micélio encontrados no interior do corpo do inseto. Também foi testado o método de isolamento de ascósporos, onde a descarga de esporos foi realizada sobre uma placa de petri estéril. O método de descarga de esporos foi possível apenas em alguns espécimes de *O. nutans* e os isolados obtidos a partir destes cresceram muito lentamente. Segundo a literatura, as cores das colônias de *O. nutans* obtidas a partir do isolamento da região fértil ou do micélio dos insetos hospedeiros, apresentaram certa variação de cores entre amarelo pálido, branco, róseo e vermelho amarronzado e ficaram cobertas por um micélio aéreo.

Em 2012, Sasaki *et al.* Obteve sequências ITS de vários espécimes de *O. nutans*, provenientes dos isolados obtidos em 2004 (Japão). A filogenia apresentada neste trabalho mostrou que existe uma distinção genética entre espécimes de *O. nutans* que parasitam espécies diferentes de Hemiptera (Sasaki *et al.* 2012).

### **Status taxonômico de *Ophiocordyceps nutans***

De modo geral, como observado na literatura citada, é possível observar que existe uma variação na coloração dos estromas e tamanho dos peritécios encontrados em diferentes hospedeiros e diferentes regiões, cuja ocorrência do táxon já foi registrada. Diante do analisado, duas possibilidades devem ser estudadas: 1. *O. nutans* é uma espécie com ampla distribuição geográfica e generalista, ou seja, não apresenta níveis de especialização com hospedeiros de gêneros ou espécies de Hemiptera em particular, e por conta disso, aparentemente, apresenta também ampla variação morfológica; 2. *O. nutans* representa um complexo de espécies de difícil separação morfológica, que podem apresentar alta especificidade em relação ao hospedeiro e distribuição mais restrita, possivelmente sobrepondo a ocorrência dos insetos que infecta.

## 2. OBJETIVOS

Investigar aspectos ecológicos e taxonômicos dos espécimes de fungos entomopatógenos que atacam Hemiptera no Brasil, morfologicamente relacionados a *O. nutans*.

Especificamente:

- Revisar macro e micromorfologicamente os espécimes brasileiros previamente identificados como *O. nutans*, e comparar com materiais representativos e de referência;
- Extrair, amplificar e sequenciar a região ITS do rDNA nuclear de materiais coletados (Brasil);
- Realizar análises filogenéticas e juntamente com as análises morfológicas (macro, micro e ultra – estruturais) e aspectos ecológicos (distribuição e hospedeiros) interpretar o táxon em estudo;
- Descrever novidades científicas relacionados ao táxon em estudo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudo, coletas e processamento do material

Espécimes de fungos Hypocreales entomopatogenos coletados em expedições nos ecossistemas do Cerrado (MT) e Mata Atlântica (SC, PR, SP e ES) foram utilizados neste estudo (fig. 1). Também foram analisados materiais de referência depositados nos herbários KW, KEW, Cornell University, New York Botanical Garden, IBOT, URM e da coleção particular do Dr. Fumito Sasaki (Japão). Os espécimes coletados foram levados para o laboratório e desidratados por pouco tempo em uma desidratadora de frutas ou em sílica quando muito pequenos e delicados. Foram armazenados pequenos fragmentos em tubos *Eppendorfs* com sílica a fim de preservar o DNA para estudos moleculares. Todos os espécimes estudados estão listados nos apêndices I e II e todos os espécimes coletados estão depositados no herbário FLOR. Os acrônimos dos herbários estão de acordo com a base de dados *Index Herbariorum* (Thiers, atualizado continuamente).

Os espécimes encontrados em estado imaturo foram levados para o laboratório e acondicionados em câmaras úmidas para que pudessem completar o estágio de desenvolvimento da estrutura sexual até a fase de esporulação.

Para a descrição macroscópica e identificação do hospedeiro, foi observado o local em que o fungo estava (sob ou sobre folhas, na serrapilheira, dentro de troncos), sazonalidade, dimensões do ascoma (estipe, região fértil), bem como caracteres da região fértil (ostíolos), do substrato (hospedeiro: possível identificação).



Fig. 0-1. Áreas de amostragem no Brasil de fungos de entomopatógenos com morfologia relacionada à *Ophiocordyceps nutans*.

### 3.2. Coleta de esporos e desenvolvimento ontogenético dos espécimes

Os ascosporos são ejetados pelos ostíolos em condições de maturação do espécime e de temperatura e umidade adequadas. Para isso foram montadas câmeras úmidas para a coleta dos esporos. A observação dos ascosporos íntegros, assim como a contagem dos segmentos dos esporos (*part-spores*), somente foi possível para muitas espécies quando coletados desta forma.

### 3.3. Culturas

O meio de cultivo ágar-ágar foi utilizado para a coleta dos ascosporos. Foi observado o tempo que os esporos levaram para iniciar a germinação. Para acompanhamento do crescimento foi transferida a cultura contida na placa de ágar-ágar para uma placa de petri contendo Ágar-batata, as culturas foram mantidas em placas de Petri no escuro à temperatura constante de 26°C.

### 3.4. Análises morfológicas

Para observação dos caracteres microscópicos foram realizadas secções dos ascomas (região fértil) a mão livre para observação da trama hifal, peritécios, ascos, ascosporos e segmentos dos ascosporos (“part-spores”). Os cortes foram montados em lâminas e lamínulas: KOH 2-3% (hidratante para observação da coloração natural do material), Floxina

1% (corante citoplasmático para observar as estruturas com conteúdo citoplasmático, por exemplo, ascos e ascosporos) e Lactofuxina (corante viscoso para observar as estruturas como ascos e ascosporos, assim como permite a fixação em lâminas semi-permanentes).

A observação e mensuração (N=20) das estruturas foram realizadas em microscópio óptico com ocular micrométrica.

As observações ultraestruturais dos ascosporos, “partes” (segmentos de ascosporo) e padrão de germinação dos esporos foram conduzidos a partir de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) do Laboratório Central de Microscopia (LCM) da UFSC. Os esporos foram coletados em lamínulas redondas e cima destas mesmas, desidratados em desidratadora de frutas por poucos minutos, após este processo, as lamínulas foram fixadas com fita adesiva em um suporte metálico (stub) e recobertas com metalização direta de ouro a 10 nm. Para observação da germinação dos esporos as lamínulas foram desidratadas alguns dias (3°, 4° e 5°) após a coleta dos ascosporos.

### 3.5. Análises moleculares

Para as análises moleculares foram realizadas extrações de DNA total dos espécimes coletados seguindo o protocolo de Doyle & Doyle (1987) modificado por Góes-Neto *et al.* (2005). Para as amplificações foi utilizado o mesmo protocolo usado por Sasaki *et al.* (2012). Os primers utilizados para a amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) foram ITS1 e ITS4 (White *et al.* 1990). O sequenciamento foi realizado no sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) do Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz – Belo Horizonte/MG, no âmbito do Projeto Identificação Molecular de Fungos no Brasil. As sequências foram editadas manualmente no *software* Geneious (Biomatters). Foi montada uma matriz ITS contendo sequências geradas por este trabalho e acrescida de outras disponíveis no Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)). Todas as sequências geradas serão depositadas no mesmo banco de dados (Genbank). O alinhamento foi realizado com o *software* MAFFT (Kato *et al.* 2009) e inspecionados/editados manualmente no *software* MEGA v.6 (Tamura *et al.* 2013). O melhor modelo evolutivo foi selecionado com o parâmetro BIC (Bayesian Information Criterion) com o *software* Jmodeltest (Darriba *et al.* 2012; Guindon & Gascuel 2003). A análise Bayesiana foi realizada com o *software* MR Bayes v.2 (Bouckaert *et al.* 2014) e a de verossilhança com o RaxML, disponível na plataforma Cipres (maior detalhamento das análises disponível no cap. 2).



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados no presente estudo um total de 199 espécimes de fungos entomopatógenos. Dentre os espécimes coletados, 86 estão distribuídos aproximadamente em 14 espécies de fungos entomopatógenos (Hypocreales) sendo 46 relacionados morfológicamente e ecologicamente (hospedeiros) com *Ophiocordyceps nutans*. Também foram estudados espécimes, previamente determinados como *Ophiocordyceps nutans*, coletados por colaboradores no âmbito de projetos desenvolvidos no MICOLAB/UFSC durante os anos de 2011 a 2015, o que totaliza 101 espécimes do Brasil.

Culturas de algumas espécies estão sendo mantidas no MICOLAB/UFSC, entre elas: *O. cf. australis*, *O. cf. gracilioides*, *O. cf. melolonthae*, *Cordyceps cf. locustiphila*, *C. cf. cardinalis*, *Metacordyceps cf. martialis*, *O. sp1.*, *O. sp2.*, *O. neonutans*. O método mais eficiente foi o cultivo através de ascósporos, entretanto algumas espécies como *C. cf. locustiphila* e *O. cf. australis* se mostraram mais fáceis de serem isoladas a partir de pedaços do estroma.

O foco taxonômico deste estudo foi direcionado para os 101 espécimes com morfologia semelhante a *O. nutans* e os resultados e discussão serão apresentados a seguir em três capítulos. No Capítulo 4.1 são apresentadas e discutidas evidências morfológicas e ecológicas (hospedeiro e distribuição) para o entendimento de *Ophiocordyceps nutans* como um complexo taxonômico. No Capítulo 4.2, a partir de análises morfológicas e filogenéticas, é apresentada uma espécie nova, devidamente suportada por aspectos ecológicos (distribuição e hospedeiros). Ainda, filogeneticamente é corroborada a proposta do complexo taxonômico do Cap. 4.1. No Capítulo 4.3 é apresentada e discutida a possibilidade de mais uma nova espécie parasita de Hemiptera (Homoptera), encontrada no Brasil, a partir de uma morfologia distintiva, destacada principalmente pelo formato fusiforme dos segmentos de ascósporos (*part spores*).





4.1 *Ophiocordyceps nutans* (Hypocreales, Ascomycota): a generalist and widely distributed species or a taxonomic complex of cryptic species?

***Ophiocordyceps nutans* (Hypocreales, Ascomycota): a generalist and widely distributed species or a taxonomic complex of cryptic species?**

RAQUEL CHEREM SCHWARZ FRIEDRICH<sup>1\*</sup>, FERNANDO MAFALDA FREIRE<sup>1</sup>, BHUSHAN SHRESTHA<sup>2</sup>, ELISANDRO RICARDO DRECHSLER-SANTOS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Campus Universitário, Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil;

<sup>2</sup>Institute of Life Science and Biotechnology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Republic of Korea.

*raquelfriedrich@gmail.com\**

**ABSTRACT**

***Ophiocordyceps nutans* (Hypocreales, Ascomycota): a generalist and widely distributed species or a taxonomic complex of cryptic species?**

*Ophiocordyceps nutans* is an entomogenous fungus growing on stinkbugs (Hemiptera) with worldwide distribution. During forays of entomogenous fungi in Brazil, specimens morphologically similar to *O. nutans* were collected from Atlantic Forest and Cerrado domains. The Neotropical occurrence of this taxon and its taxonomic implications need to be re-evaluated. Here, we discuss *O. nutans* as a taxonomic complex with distinct geographic lineages and host specificity.

**Key words:** *Cordyceps s.l.*, entomogenous fungi, Pentatomidae, Hemiptera, stinkbugs.

**RESUMO**

***Ophiocordyceps nutans* (Hypocreales, Ascomycota): uma espécie generalista e amplamente distribuída ou um complexo taxonômico de espécies crípticas?** *Ophiocordyceps nutans* é um fungo entomopatógeno que cresce em percevejos (Hemiptera) e apresenta ampla distribuição. Durante expedições em busca de fungos entomopatógenos no Brasil, espécimes morfologicamente similares a *O. nutans* foram coletados nos domínios da Mata Atlântica e do Cerrado. A ocorrência neotropical desse táxon e suas implicações taxonômicas necessitam ser reavaliadas. Aqui *O. nutans* é discutido como um complexo taxonômico com distintas linhagens geográficas associadas à hospedeiros específicos.

**Palavras chaves:** *Cordyceps s.l.*, fungos entomopatógenos, Pentatomidae, Hemiptera, percevejo.

**INTRODUCTION**

*Ophiocordyceps* Petch (Ophiocordycipitaceae, Hypocreales, Ascomycota) is a large entomogenous genus comprising nearly 200 species (Sung *et al.* 2007, Ban *et al.* 2015). The genus is usually characterized by its darkly pigmented, rough, pliant or wiry stromata that grow on larvae and adults of different arthropods orders, Coleoptera, Hymenoptera, Orthoptera, Hemiptera, Araneae, among others (Sung *et al.* 2007).

*Ophiocordyceps nutans* (Pat.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (≡ *Cordyceps nutans* Pat.) was originally described from

Japan on adult stinkbug (Hemiptera) (Patouillard 1887). Morphologically, it is easy to recognize this species in the natural habitat, mainly because of its yellow to orange or red apical cylindrical head, and the black stipe (Schumacher 1982). Additionally, it is found mainly among the leaf litter growing on different species of stinkbugs (Sasaki *et al.* 2008). This taxon has been frequently reported from Asia (Japan, Taiwan, China, Korea, Russia, Thailand, Nepal, New Guinea), while sporadically from Africa (Congo, Ghana) and South America (Brazil, Colombia) (Kobayasi 1981, Evans 1982, Schumacher 1982, Shrestha 1985, Hywel-Jones 1995, de Meijer 2006; Shrestha 2011, Sasaki *et al.* 2012). In Japan, Sasaki *et al.* (2012) observed *O. nutans* on 11 different bug species belonging to four families (Coreidae, Urostylidae, Acanthosomatidae and Pentatomidae) of Hemiptera, and showed two lineages (Type I and II) of this taxon on distinct host families. The Type I was showed as occurring on Coreidae hosts, suggesting that this parasitic relationship should be specific.

The record of *O. nutans* in Brazil was previously presented for the Southern Atlantic Forest domain, in Paraná state (24°36' S 51°23' W), on Pentatomidae bugs by de Meijer (2006); however, no description was given and up to now the taxon as well as most of great diversity of entomogenous hypocrealean fungi species from Brazil are actually still poorly understood.

During surveys of entomogenous fungi in Brazil, we collected several specimens with morphological similarity to *O. nutans* on different Pentatomidae bugs. This situation led us to question: is *O. nutans* a generalist and widely distributed species or a taxonomic complex of cryptic species? The Neotropical occurrence of this taxon is herein re-evaluated and its taxonomic implications are discussed on the basis of ecological and morphological evidences.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study area and hosts**

Surveys of entomogenous fungi from 2011 to 2015 were carried out in the Atlantic Forest and Cerrado domains of Brazil. Collections were made from Atlantic Forest of Paraná, Santa Catarina and São Paulo states (Ombrophilous Forest of different conservation units) and Cerrado domain of Mato Grosso state (Valley Forest of Chapada dos Guimarães National Park). Specimens growing on adult stink bugs were collected and transported to the laboratory for identification. Families and

subfamilies of host insects were confirmed with the help of expert entomologists.

### **Specimens and morphological studies**

Entomogenous specimens and their hosts were dried at 40°C and then microscopic observations were made. Free-hand longitudinal sections of the apical head were mounted in lacto fuchsin to observed perithecial structures, asci, ascospores and part-spores, measured (n=20) following the method of Sasaki *et al.* (2008), using Olympus CX21. Vouchers are deposited at FLOR herbarium and only the most representative ones, of each locality, are presented: BRAZIL. Santa Catarina. Corupá, 05.X.2012, Mafalda-Freire FMF05; Florianópolis, *sine datum*, 2013, Mafalda-Freire FMF50; *ibidem*, Costão do Santinho, Trilha das aranhas, 23.IX.2013, Friedrich KEL56; *ibidem*, 27.I.2014, Friedrich KEL129; *ibidem*, Lagoa do Peri, 12.II.2013, Simon JS052; *ibidem*, Morro da lagoa da Conceição, 02.XII.2013, Friedrich KEL60; *ibidem*, Naufragados, 28.X.2012, Urrea-Valencia SURREA185; *ibidem*, Naufragados, 30.IV.2013, Mafalda-Freire FMF101; *ibidem*, Naufragados, 28.X.2013, Furtado ANMF349; *ibidem*, Naufragados, 10.I.2014, Friedrich KEL105; *ibidem*, UCAD, 20.XII.2011, Jaeger MJ103A; *ibidem*, UCAD, 09.XI.2013, Friedrich KEL46; Joinville, Vale do Pirafá, 25.I.2014, Linhares FTF109; Joaçaba, 06.VIII.2012, Urrea-Valencia SURREA160; Santo Amaro da Imperatriz, Trilha da cachoeira, 30.X.2012, Magnago ACM448; *ibidem*, Trilha da cachoeira, 02.II.2013; *ibidem*, Trilha da cachoeira, 21.III.2014, Friedrich KEL158; *ibidem*, Trilha da pousada, 16.XI.2013, Magnago ACM545. Paraná. Curitiba, Parque Barigui, 26.I.2014, Linhares FTF120; Paranaguá, Piraquara, Morro do canal, 04.IX.2013, Mafalda-Freire FMF123; *ibidem*, Morro do canal, 26.I.2014, Linhares, FTF121. Mato Grosso. Parque Nacional Chapada dos Guimarães, 26.III.2013, Mafalda-Freire FMF88.

Reference specimens [JAPAN. Fukushima, XIII.2006, 06Fuka1, *ibidem*, XIII.2006, 06Fuka2, *ibidem*, XIII.2006, 06Fuka3, *ibidem*, XIII.2006, 06Fuka7; Kagoshima, *sine datum*, 2004, 04Yak1, *ibidem*, 2004, 04Yak2; Kagoshima, IX.2006, 06Yak1; Hokkaido, Ebetsu city, X.2006, 6N11; Kyoto, VI.2006, 06Tank1, *ibidem*, VI.2006, 06Tank2, *ibidem*, VI.2006, 06Tank11. UKRAINE. Primorski land, Khasanski district, valley forest: 27.VII.1957, E.Z. Koval s/n (KW 5674)] from KW herbarium and personal collections of Sasaki (Sasaki *et al.* 2012) were observed for morphological comparisons. Herbaria acronyms follow Index Herbariorum according to (Thiers B., continuously updated).

## **RESULTS**

Around 100 specimens at different stages of development, mostly producing terminal cylindrical head, were collected growing on adult stink bug (Pentatomidae, Hemiptera). A total of 58 specimens were found parasitizing hosts of the subfamilies Edessinae, 30 of Pentatominae and eight of Discocephalinae. Most of specimens (91) are from the Atlantic Forest of Santa Catarina, three from Paraná and one from São Paulo states and only one specimen was found in the Cerrado domain from the state of Mato Grosso. Although our specimens were collected in different ecosystems, they were always found near rivers or in areas with high rainfall. Consequently, it is possible that this factor contributes to the occurrence of this taxon only in lowland regions.

In general, Brazilian specimens (Fig. 1 A,B. 2 A.) produced solitary stromata, but some of them exhibited two stromata. The stromata are filiform, erect or somewhat curved ( $32\text{--}170 \times 1\text{--}2$  mm), mainly arising from the thorax region of the host, with black and filiform stipe, ( $23\text{--}151 \times 1$  mm) glabrous, cylindrical to fusoid ( $5\text{--}19 \times 0.9\text{--}2$  mm) fertile head (Fig. 2B). The uppermost part of the stipe, up to 5–10 mm below the fertile head, is orange or, red head when immature (Fig. 2A). The fertile region is apical and well delimited, punctated by ostioles of perithecia and with the same color of the uppermost part of the stipe. Perithecia are completely immersed and obliquely vertical in the stroma (Fig. 2C), with a curved neck ( $550\text{--}1200 \times 130\text{--}350$   $\mu\text{m}$ ); cylindrical Asci ( $220\text{--}900 \times 3\text{--}8$   $\mu\text{m}$ , 8-spored) having a pronounced cap (Fig. 2D) and the filiform ascospores are easily breaking into 64 part-spores at maturity. These part-spores are cylindrical or slightly barrel-shaped (Fig. 2E.,  $6\text{--}15 \times 1\text{--}2.5$   $\mu\text{m}$ ).

## DISCUSSION

*Ophiocordyceps nutans* is traditionally recognized mainly by its yellow to orange or red, apical, cylindrical narrowly ovoid head, obliquely immersed perithecia, with ascospores that easily fragmenting into part-spores, and stink bugs as hosts (Schumacher 1982; Shrestha 2011). Brazilian materials shared many of these characters; however, the fertile orange region was cylindrical to fusoid and the apical region possessed narrower and longer perithecia. The studied materials sometimes showed the head not completely formed and possessed needle-like apex on the stipe indicating that the specimens were either immature or aperithecial, as mentioned by Sasaki *et al.* (2004) from their observations on Japanese materials. The size of perithecia of Brazilian materials ( $550\text{--}1200 \times 130\text{--}350$   $\mu\text{m}$ ) was comparable to those of Japanese ( $550\text{--}1170 \times 190\text{--}560$   $\mu\text{m}$ ), Thai ( $550\text{--}800 \times 130\text{--}300$   $\mu\text{m}$ )

and Nepalese (800–900 × 300 µm) materials, as reported by Sasaki *et al.* (2008), Hywel-Jones (1995) and Shrestha & Sung (2005), respectively. Microscopically, the difference of our materials in length with Japanese is not so clear, compared to those of both Thai and Nepalese materials, but the diam difference between Japanese *O. nutans* and Brazilian material is evident. Macroscopically, stromata and the fertile region of Japanese materials are thinner and more delicate than the Brazilians, which are robuster (Fig. 1). According to the measures given by Hywel-Jones (1995), the specimens from Thailand appear to have a wider fertile region than others (Tab. 1).

All Brazilian specimens of *O. nutans* were found on Pentatomidae (subfamilies Edessinae, Pentatominae and Discocephalinae) hosts. Since species level identification of Pentatomidae hosts was not possible in this study, they are visibly different from Japanese, *i.e.*, hosts of Brazilian fungus specimens are larger than those of Japanese (Fig. 1), accompanied by rugged stromata.

Specimens collected in Brazil were mainly found in the rainy season, as observed by Hywel-Jones (1995) for Thai specimens; however we have noticed it growing throughout the year in the surveyed areas although mature specimens were collected in the Spring and Summer only. Moreover, despite the taxon being recurrently recorded for different vegetation types, the moist environment seems to be a prime condition to find it, as described by Hywel-Jones (1995).

Up to now, the morphological differences between Japanese and Brazilian specimens are sufficient to recognize it as a typical case of species complex. Recent studies have shown that there are a larger number of cryptic species in entomopatogenous hypocrealean fungi than previously known from morphological characters (Evans 1982, Evans & Samson 1984; Kaitsu *et al.* 2013; Sanjuan *et al.* 2014). Evans *et al.* (2011), while studying zombie ant fungi in Brazil, recognized *Ophiocordyceps unilateralis* (Tul. & C. Tul.) Petch as a species complex. Based on few morphological differences and host specificity Evans *et al.* (2011) described four new species growing on carpenter ants: *Ophiocordyceps camponoti-rufipedis* H.C. Evans & D.P. Hughes, *O. camponoti-balzani* H.C. Evans & D.P. Hughes, *O. camponoti-melanotici* H.C. Evans & D.P. Hughes, and *O. camponoti-novogranadensis* H.C. Evans & D.P. Hughes, three of them coexisting in the same area of Atlantic Forest of Minas Gerais state. For Amazon region of Brazil, Araújo *et al.* (2014) recently described three new species of *Ophiocordyceps* parasitizing Camponotini ants, the species delimitation was mostly based on morphological characters, hosts and

ascospore germination, although molecular evidences were also provided.

In our case, considering the morphological (width and color of the fertile part, shape of perithecia) and ecological (geographic and host) differences between Japanese and Brazilian specimens, we recognize the occurrence and geographic expansion of the *O. nutans* complex with a new specie and a different lineage for Neotropical region. Additionally, the phylogenetic work of Sasaki *et al.* (2012) has shown two distinct clades of *O. nutans*, named as Type I and Type II. The clade Type I presents Chinese, Thailand and Japanese specimens, which are parasites of Coreoidea (Coreidae) hosts. The second clade (Type II) presents only Japanese specimens that parasitize Pentatomoidea (Pentatomidae, Acanthosomatidae and Urostylididae) hosts. Type II is closely related to the new Neotropical lineage. As proposed by Evans *et al.* (2011) and Araújo *et al.* (2014), for *Ophiocordyceps unilateralis* species-complex, cryptic species are likely to occur under other *Ophiocordyceps* species like *O. nutans*. Future studies, with molecular analysis accompanied by identification of host, will help to describe new Brazilian species, as well as to corroborate that *O. nutans* is not a widely distributed generalist parasite; in fact, it probably is a taxonomic species-complex of distinct geographic and phylogenetic lineages associated with specific hosts.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank J.C. Pinho (UFSC) and J. Grazia (UFRGS) for host identifications at family level; A. Demetrio and C.S. Montoya for field and discussion contribution; F. Sasaki and curators of Herbaria for the loan of exsiccates and managers of the study areas for the permission to sample collection. CAPES and CNPq grants were awarded to RCSF and FMF for master's scholarships (PPGFAP/UFSC).



## REFERENCES

- Araújo, J., Evans, H. C., Geiser, D. M., & Hughes, D. P. 2014. Unravelling the diversity behind *Ophiocordyceps unilateralis* complex: Three new species of Zombie-Ant fungus from Brazilian Amazon. *bioRxiv*. <http://dx.doi.org/10.1101/003806>
- Ban, S., Sakana, T. & Nakagiri A. 2015. Three new species of *Ophiocordyceps* and overview of anamorph types in the genus and the family Ophiocordycipitaceae. *Mycological Progress* DOI 10.1007/s11557-014-1017-8
- Evans, H.C. 1982. Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems: an appraisal. *In Ecological Entomology*, v.7, n.1, p. 47–60.
- Evans, C. H. & Samson, R. A. 1984. *Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic of ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems II. The *Camponotus* (Formicinae) complex. *In Trans. Br. Myco. Soc.*, v. 82, p. 127-150.
- Evans, H. E., Elliot, S. L. & Hughes, D. P. 2011. Hidden diversity behind the zombie-ant fungus *Ophiocordyceps unilateralis*: Four new species described from carpenter ants in Minas Gerais, Brazil. *In PloS One*, v. 4, p. 5, p. 598 – 602.
- Hywel-Jones, N. L. 1995. Notes on *Cordyceps nutans* and its anamorph, a pathogen of hemipteran bugs in Thailand. *In Mycological Research*, v. 99, n. 6, p. 724–726.
- Kaitsu, Y., Shimizu, K., Tanaka, E., Shimano, S., Uchiyana, S., Tanaka, C., Kinjo, N. 2013. *Ophiocordyceps sessilis* sp. nov., a new species of *Ophiocordyceps* on *Camponotus* ants in Japan. *In Mycological Progress*, v. 13, n. 4, p. 755-761.
- Kobayasi, Y. 1981. Revision of the genus *Cordyceps* and its allies 2. *In Bulletin of the National Science Museum Tokyo*, v. 7, p. 123–129.
- Meijer, A. A. R. 2006. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná. *In Boletim do Museu Botânico Municipal (Curitiba)*, v.68, p. 1–55.
- Patouillard, N. 1887. Contributions a letude des Champignons extra-europeens. *In Bulletin de la Société Mycologique de France*, v.3, p. 119–131.
- Petch, T. 1931. Notes on entomogenous fungi. *In Transactions of the British Mycological Society*, v. 16, n. 1, p. 55–75.
- Sanjuan, T., Tabima, J., Restrepo, S., Læssøe, T., Spatafora, J. W. & Franco-Molano, A. E. 2014. Entomopathogens of Amazonian stick insects and locusts are members of the *Beauveria* species complex (*Cordyceps sensu stricto*). *In Mycologia*, v. 106, n. 2, p. 260-275.
- Sasaki, F., Miyamoto, T., Yamamoto, A., Tamai, Y. & Yajima, T. 2012. Relationship between intraspecific variations and host insects of

- Ophiocordyceps nutans* collected in Japan. *In Mycoscience*, v. 53, n.2, p. 85–91.
- Sasaki, F., Miyamoto, T. Yamamoto, A., Tamai, Y. & Yajima, T. 2008. Morphological and genetic characteristics of the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps nutans* and its host insects. *In Mycological research*, v. 112, n. 10, p. 1241–1244.
- Sasaki, F., Miyamoto, T., Tamai, Y., & Yajima, T. 2004. Isolation of vegetable wasps and plantworms, *Cordyceps nutans*, from fruit-body tissue. *In Journal of invertebrate pathology*, v. 85, n. 2, p. 70–3.
- Schumacher, T. 1982. Ascomycetes from Northern Thailand. *Nordic Journal of Botany*, v. 2, n. 3, p. 257–263.
- Shrestha, B. 2011. Diversity of *Cordyceps* Fungi in Nepal. *In Nepal Journal of Science and Technology*, v. 12, p. 103–110.
- Shrestha, B. & Sung, J. 2005. Notes on *Cordyceps* species collected from the central region of Nepal. *In Mycobiology*, v. 33, n. 4, p. 235–239.
- Shrestha, K. 1985. *Cordyceps nutans* Pat. from Lato Manang. *In Journal of Natural History Museum*, v. 9, p. 111-114.
- 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. *In Studies in Mycology*, v. 57, p. 5–59.

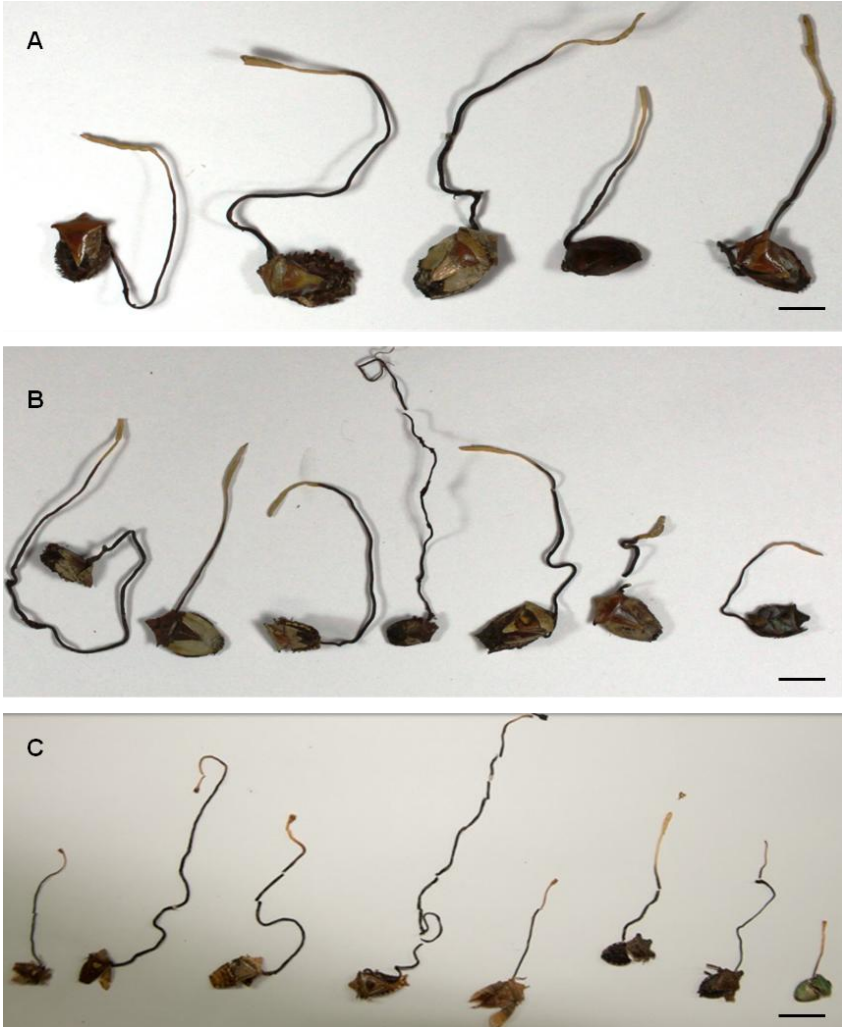


Fig. 1. Brazilian (A, B) and Japanese (C) specimens of *Ophiocordyceps nutans* s.l. (scale bar = 15mm).



Fig 2. Brazilian specimens morphologically similar to *Ophiocordyceps nutans*. A. specimens in the field. B. enlarged head with brown ostioles. C. perithecia. D. mature ascus with ascospores. E. fragmented part spores. (scale bars: A,B = 15mm, C,D = 300 $\mu$ m, E = 15  $\mu$ m)

Table 1. Macromorphology comparison of Japanese, Thailand and Brazilian specimens of *O. nutans s.l.*

	Total Stroma (mm)	Below fertile head Length (mm)	Fertile head (mm)
Thailand (Hywel-Jones 1995)	50–90	8–12	6–17 × 3–5
Japan (Sasaki et. al 2008)	32–112	7–12 × 0.5	2.5–14 × 1.5–3.7
<u>Brazil (examined material)</u>	23–170	5–10 × 0.5	6–19 × 0.9–2

4.2. *Ophiocordyceps neonutans* sp. nov. (Ascomycota, Hypocreales), a neotropical species of zombie-bugs fungus (*Ophiocordyceps nutans* species-complex) from Brazil, based on morphological, molecular and ecological data

***Ophiocordyceps neonutans* sp. nov. (Ascomycota, Hypocreales), a neotropical species of zombie-bugs fungus (*Ophiocordyceps nutans* species-complex) from Brazil, based on morphological, molecular and ecological data**

RAQUEL CHEREM SCHWARZ FRIEDRICH<sup>1</sup>\*, BHUSHAN SHRESTHA<sup>2</sup>, ELISANDRO RICARDO DRECHSLER-SANTOS<sup>1</sup>

raquelfriedrich@gmail.com\*

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Campus Universitário, Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil;

<sup>2</sup>Institute of Life Science and Biotechnology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Republic of Korea.

### ABSTRACT

During the revision of the zombie bugs fungus from Atlantic Forest in southern Brazil, some specimens collected on Pentatomidae hosts, morphologically related to the *Ophiocordyceps nutans* species-complex, revealed to be an undescribed species, *Ophiocordyceps neonutans* sp. nov. Morphologically is characterized and distinct from *O. nutans* by its more robust stipe, always orange and cylindrical fertile region and slightly narrower perithecia. Also, this species is founded on different host species. Molecular phylogeny inferred from ITS sequences data confirmed its new species closely related to species that present similar stromata on Hemiptera or Hymenoptera hosts, and distantly related to Asian clade of *Ophiocordyceps nutans* species-complex. Barcoding gap analysis corroborated this new Neotropical species.

**Key words:** *Cordyceps s.l.*, Taxonomy, Pentatomidae, ITS.

### INTRODUCTION

*Ophiocordyceps nutans* (Pat.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora is morphologically characterized by its black stipe and the yellow to orange or red apical cylindrical head, with perithecia

obliquely immersed, parasitizing stinkbugs (Hemiptera); found mainly among the leaf litter (Sasaki *et al.* 2008, Friedrich *et al.* unpublished data, Cap. 5.1). The most important contributions to this taxon were made by Kobayasi (1941), Moureau (1949) [as *C. bicephala* subsp. *nutans* (Pat) Moureau], Samson *et al.* (1975, 1982) Hywel-Jones (1995), Shrestha (2005, 2011) and Sasaki *et al.* (2004, 2005, 2008, 2012).

Phylogenetic work of Sasaki *et al.* (2012) has shown that *O. nutans* specimens from Japan, have a genetic divergence according with the parasitized specie, in this case, specimens traditionally treated as *O. nutans* could hide cryptic lineages. Two distinct clades of *O. nutans*, named as Type I and Type II, were observed. The clade Type I presents Chinese, Thailand and Japanese specimens, which are parasites of Coreoidea (Coreidae) hosts. The second clade (Type II) presents only Japanese specimens that parasitize Pentatomoidea (Pentatomidae, Acanthosomatidae and Urostylididae) hosts. Brazilian lineage are closely related to Type II.

Most records of *O. nutans* are from Asia (Patouillard 1887; Esaki 1929; Kobayasi 1941; Shimizu 1994; Sasaki *et al.* 2012). However, the occurrence of this taxon was reported several times for tropical and subtropical regions of the world (Moureau 1949, Samson & Evans 1975; Schumacher 1982). In South America, *O. nutans* has been reported for Colombia (Kobayasi, 1981), Argentina (Robledo personal communication), and Brazil (Meijer 2006). However, those records should deserve special taxonomic attention being revised based on morphological, ecological and molecular data.

In this context, a taxonomic revision of stinkbugs fungus, previously determined as *O. nutans*, collected from Brazil, was carried out. Ecological (host and geographic distribution), detailed morphological and molecular analysis (phylogenetic and barcoding gap of ITS rDNA region)

## **MATERIAL & METHODS**

### **Field collections**

More than 100 specimens were collected during 2011 to 2015 in the Atlantic Forest domain of Santa Catarina, Paraná and São Paulo states, and in the Valley forest of Cerrado domain of Mato Grosso state of Brazil. According to Köppen classification, the Atlantic Forest, domain presents well distributed rains during the year and rigorous climate during the summer, with rainy, climate of subtropical and humid



regions; the climate in Cerrado domain is characterized as hot and humid, with rainy (October to March) and dry (April to September) seasons, climate of tropical regions. Carefully, leaf litter was examined to detect the stromata and dead insect. Specimens were dried in plastic bags with silica and kept at the FLOR Herbarium.

### **Morphological studies**

Collected material as well as those Japanese specimens from personal collection of Dr. Fumito Sasaki were microscopically observed with lactofuchsin. Perithecia, asci, ascospores and partspores were examined in detailed (n=20) (Fig.4, 5, 6B). Electronic microscopy (SEM) (Fig.4F., 5C,D).

To observe the pattern of *part spores*, ascospores and spore germination SEM analysis was conducted at Central lab. of eletronical microscopy (LCME) of the UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina). Spores were collected on cover slips and dried in a fruit dryer (45°), the cover slip was fixed under a stub and covered by gold (10 nm). For observation of the development of the spores, the slide glasses were dried few (3, 4, 5) days after the spores discharge, allowing further germination.

### **Spores discharge and spores development**

Spores discharge was induced of two different techniques: 1. Specimens were fixed in the upper part of a Petri dish with agar-agar, to observe spores development and to isolate and grow some spores (Fig.4.B) and 2. Cover slips were placed under the specimens, in a humid condition (Fig.4.D) to collect and account full ascospores. Complete ascospores, number and germination/development of part-spores were observed under optical microscopy and SEM (Fig.5.). Cultures were checked every day for seven days (Fig.4.E, G,H,I).

### **DNA extraction and sequencing**

Extraction of total genomic DNA from dried stromata followed Doyle & Doyle (1987) adapted by Góes-Neto *et al.* (2005). Primers ITS1-R and ITS4-F (White *et al.* 1990) were used for polymerase chain reaction of ITS1-5.8S-ITS2 region, according to the cycle parameters described in Sasaki *et al.* (2012). Sequencing was performed with *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit* following manufacturer procedures, using the same primers cited, performed at Centro de Pesquisas René Rachou Fiocruz (Brazil). The fungus species and respectively parasitized hosts are listed in table 1.

### **Phylogenetic analyses**

Sequences generated for this study were aligned with additional sequences downloaded from Genbank (Table 2). Sequences were

manually checked and edited with the software Geneious v.6.1.X (Biomatters). The alignment of the ITS dataset was accomplished with the software MAFFT (Kato *et al.* 2009), following the Q-INS-i criteria. Finally, the dataset were manually edited in MEGA v.6 (Tamura *et al.* 2013). The best fit model of nucleotide evolution to dataset, as well the estimated base frequencies, transition/transversion ratio, gamma shape parameter and proportion of invariant sites, were obtained according AIC (Akaike Information Criterion), as implemented in the software Jmodeltest v.2.1.4 (Guindon & Gascuel, 2003; Durrin *et al.*, 2012). Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BPP) searches were applied to the dataset. The ML analysis were carried out in the PhyML software, available in the phylogeny.fr platform, under a GTR+I+G model, with four gamma categories to account the rate heterogeneity across the sites, with no proportion of invariant sites. The gamma shape was 0.2110, 500 bootstrap pseudoreplications (BS) were used to assess the reliability of internal branches.

The Bayesian analysis was performed in the software MrBayes v.3.1.2, as implemented in the Cipres Science Gateway (Miller *et al.*, 2010; <http://www.phylo.org/>), under a HKY model with four gamma categories, with no proportion of invariant sites. Gamma shape value was the same used in ML. The parameters used were two independent runs, each one with four simultaneous independent chains for 10000000 ( $10^6$ ) generations, starting from random trees, and keeping one tree every 1000<sup>th</sup> generation. All trees sampled after convergence average standard deviation of split frequencies <0.01 and confirmed using Tracer v1.5. (Drummond & Rambaut 2007) were used to reconstruct a 50% majority-rule consensus tree (BC) and to estimate posterior probabilities (PP). The fraction of the sampled values discarded as burning was 0.25. A node was considered to be well supported if it showed a PP > 0.9 and/or BS > 70%. *Metarhizium taii* Z.Q. Liang & A.Y. Liu was defined as outgroup.

### **Barcoding analysis**

Barcode analyses were carried out using sequences of Asian (Type I Type II) and Brazilian specimens, representing three different hypothesis-species. Hypotheses were tested by traditional method (distance-based) and ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery).

## **RESULTS**

### **Molecular phylogeny**

Six new sequences from Brazilian specimens, previously determined as *O. aff. nutans*, were generated during this study. The ITS dataset

included sequences from 40 specimens that represent seven taxa, and a total of 619 bps length (including gaps), of which 306 were constant, 313 variable informative and 239 parsimony informative. All sequences used to construct the dataset are showed in table 1. The model of nucleotide evolution selected was GTR +I+ G and the estimated base frequencies are: freqA = 0.2925, freqC = 0.2077, freqG = 0.1944, freqT = 0.3054. The trees generated by both phylogenetic searches (BPP and ML) showed similar topologies. Twelve of the internal branches (in-group) in BPP and ten in ML appear with significant support values. Only the topology from BPP analysis is presented, while both BPP and ML values are showed in the branches (Fig.1). Two distinct clades with those asiatic specimens, as previously observed by Sasaki *et al.* (2012), are well supported in BPP analysis (BPP = 0.93 and ML = 54). This two well supported Asian clades can be identified: one composed by specimens (Type II) that parasites Pentatomoidea hosts (BPP = 0.82 and ML= 100) and another one by specimens (Type I) that parasites Coreidae hosts (BPP = 0.84 and ML= 100). Our topology showed that Brazilian specimens are more closely related to another *Ophiocordyceps* species of “sphecocephala” clade [*Ophiocordyceps irangiensis* (Moureau) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, *Ophiocordyceps sphecocephala* (Klotzsch ex Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, *Ophiocordyceps myrmecophila* (Ces.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora; *Ophiocordyceps tricentri* (Yasuda) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora} than Asian specimens of *O. nutans*.

### **Barcoding analysis**

The tree species hypothesis, one Brazilian and two Asian (Type I and II), were confirmed based on analysis of genetic distance of sequences (Fig. 7). The Barcoding Gap analysis corroborated that the Brazilian specimens are in fact a new neotropical species, as well the Asian specimens as two distinct molecular species, associated with two different hosts, as showed by Sasaki *et al.* (2012, Type I on Coreidae and Type II on Pentatomoidea). For *O. nutans* species-complex there is a distinct barcode gap (5-17%) between the two ranges of genetic variability datasets (inter and intraspecific). The intraspecific variety is low, *i.e.* there is little fluctuation; however, there is a high interspecific fluctuation between the groups, showing a barcode gap ranging about 5–17%.

### **Taxonomy treatment**

***Ophiocordyceps neonutans*** Friedrich, Shrestha & Drechsler-Santos sp. nov. *Ad int.*  
(Fig.3,4,5,6)

**Holotype** — Brazil, Santa Catarina, Florianópolis, Naufragados, 10-Mar- 2014, KEL113 (FLOR).

**Diagnose** — Perithecia presents a distinct curved neck and the perithecial head is always orange and cylindrical; none more than two stromata are found growing on Pentatomidae hosts in the Atlantic forest and Cerrado domains.

**Etymology** — “neo” in reference to the Neotropical region and “nutans” to the closely morphology and similar hosts of *O. nutans*.

**Description**— Stromata solitary, occasionally two, simple or branched, (32–170 × 1–2 mm). Stipe filiform, erect or somewhat curved, black (23–151 × 1 mm), becoming orange to orange reddish (47/48) towards the uppermost part of the stipe when fresh, similar to head in color (Fig.2.B, G), pale yellow (9/8) when dry. Fertile head apical, well delimited (5–19 × 0.9–2 mm), cylindrical, to fusiform, orange punctate with brown (12) ostioles of perithecia. Perithecia crowded, obliquely vertical in stroma, completely immersed, piriform always with a long curved neck, (550 – 1200 x 130 – 360 mm) (Fig.2.E.). Asci 8-spored, cylindrical, hyaline, (220 – 770 x 3 – 8 µm), possessing a prominent cap. Ascospores parallel, smooth, filiform, almost with the same length of asci, hyaline, multiseptate, easily fragmenting into 64 part-spores; part spores cylindrical (6 – 15 x 1.2 – 3 µm), or slightly barrel-shaped. Conidia ellipsoidal (7–10 x 4–5 µm), apiculate at the base (Fig.4.E, Fig.5.E). The anamorph could occur in the stroma, the fertile head in the orange part of the stipe, or in another stroma (Fig.6.C). Conidiogenous cell form a layer of hymenium-like (Fig.6.B, D).

#### **Ascospores discharge and part spores germination**

Spore print white. Spores germination occurred between 48 to 72 hours, after ascospores discharge. Most of part spores were observed germinating before they broke into part spores. A pattern of part spores germination were not recognized, *i.e.*, some spores germinate on the left or on the right and others on both sides (Fig.4.A,B,C,D,E,F).

#### **Host and distribution**

On adult, stinkbugs of the subfamilies Edessinae, Discocephalinae and Pentatominae (Pentatomidae, Hemiptera, Heteroptera). Most of fertile specimens were collected between November and April; however some aperiithecial specimens were collected in September. Founded in the Cerrado and commonly in Atlantic forest domains of Brazil.

## Remarks

*Ophiocordyceps neonutans* is frequently collected as single, small, black stromata, with a cylindrical orange head, arising laterally from the thorax portion of the stinkbug, buried in the upper 1–2 cm of the leaf litter. However, it was possible to find specimens with branched stromata, never more than two (Fig. 2.B, E). The arrangement of ascospores within the asci is parallel for the entire length of the asci, indicating that the ascospores are approximately of the same length of asci. *Ophiocordyceps neonutans* is similar to *O. nutans* from Asia (Type I and Type II), however differs in color and shape of stromata, shape and width of perithecia (Fig.2.A-F), hosts species and geographic distribution. *Ophiocordyceps neonutans* is most similar in micromorphology to *O. nutans* Type I, as described by Sasaki *et al.* (2012), but in both macromorphology and ecology is similar to *O. nutans* Type II. Brazilian material appears to be larger and more robust than those Asian specimens. Additionally, Brazilian material present a stroma more crowded of perithecia and are orange only, never red.

## Specimens examined

Vouchers are deposited at FLOR herbarium and only the most representative ones, of each locality, are presented: Brazil: Florianopolis, *sine datum*, FMF50; *sine datum*, 2012, KEL36; UCAD, 20 Dez 2011, MJ103B, MJ103C; 9 Dez 2013, KEL46; Lagoa do Peri, 2 Dez 2013, JS52; Morro da lagoa, 2 Dez 2014, KEL60; Caieira da barra do sul, 20 Sept 2014, KEL197; 28 Dez 2015, KEL204; Naufragados, Serra do Tabuleiro National Park, 1 Jan 2014, KEL105; 10 Jan 2014, KEL109, KEL112, KEL113 (Holotype), KEL114, KEL115, KEL117, KEL119, KEL120, KEL121, KEL123; 20 Jan 2014, KEL 111; Morro das aranhas, 23 Nov 2013, KEL52, KEL53, KEL54, KEL55; 20 Jan 2014, KEL129, KEL130, KEL131, KEL132, KEL133, KEL135, KEL136, KEL137, KEL138, KEL139, KEL140, KEL141, KEL142; 27 Jan 2014 KEL138, KEL142; Santo Amaro da Imperatriz, 2 Fev 2013, KEL1, ACM545; 25 Jan 2014 LDA119; 21 Marc2014, KEL158; Sao Francisco do Sul, Reserva Volta Velha, 7 Aug 2014, FMF264; Joinville, 25 Jan 2014, ACM899; Joaçaba, 6 Aug 2012, S.URREA160; 27 Sept 2014, FMF266, FMF267, FMF268, FMF269, FMF270, FMF271, FMF273, FMF277, FMF278, FMF288, FMF291, FMF293; Curitiba, 26 Jan 2014, FTF120; Chapada dos Guimarães, 26 Marc2013, FMF88;

## Additional specimens examined (*Ophiocordyceps nutans* species-complex)

JAPAN. Fukushima, XIII.2006, 06Fuka1, *ibidem*, XIII.2006, 06Fuka2, *ibidem*, XIII.2006, 06Fuka3, *ibidem*, XIII.2006, 06Fuka7; Kagoshima, *sine datum*, 2004, 04Yak1, *ibidem*, 2004, 04Yak2; Kagoshima, IX.2006, 06Yak1; Hokkaido, Ebetsu city, X.2006, 6N11; Kyoto, VI.2006, 06Tank1, *ibidem*, VI.2006, 06Tank2, *ibidem*, VI.2006, 06Tank11.  
 UKRAINE. Primorski land, Khasanski district, valley forest: 27.VII.1957, E.Z. Koval s/n (KW 5674).

## DISCUSSION

### ***Ophiocordyceps neonutans* and its phylogenetic and morphological position**

Brazilian specimen's clade, in this work, is distinct and well supported when compared to other two clades of *O. nutans* (Type1 and Type2), composed by Japanese specimens (Sasaki *et al.* 2012) (Fig.1.). Moreover, in the phylogeny that included more species of *Ophiocordyceps* genus, we can observe that the species that are part of the "sphecocephala" (Hymenoptera-Hemiptera hosts) clade are in the same topology of other phylogenetic works, Sung *et al.* (2007) and Tian *et al.* (2010). Nevertheless, the strains of *O. myrmecophila*, *O. tricentri*, *O. sphecocephala* and *O. irangiensis* appeared more related to the Brazilian than the Japanese (Fig.1.). Specimens of *O. nutans* from China and Thailand, used in the phylogenetic analysis were morphologically related to *O.nutans* Type I, sharing the same host of Coreidae family, as observed in the phylogeny of Sasaki *et al.* (2012).

Some species of this clade (called sphecocaphala clade), that parasitize Hemiptera hosts, for example *O. nutans* and *O. tricentri* from Japan, have the same form and similar Hemiptera hosts (Heteroptera and Homoptera), but they are morphologically distinct species, essentially different in their spores as well as their coloration of the fertile structure. For this, observations of those species should be made with fresh specimens because they look similar when dried. In addition, *O. tricentri* has a distinct geographical range, is an Asiatic species, never recorded occurring in American continent, like *O. nutans s.s.*

Morphologically, some Japanese and Thailand specimens present perithecia without the curved neck, as described by Sasaki *et al.* (2012) when distinguish *O. nutans* Type I from Type II. Asiatic specimens of *O. nutans* commonly present wider perithecia than those of Brazilian specimens. Curve neck of perithecia is the characteristic and always present in *O. neonutans*. Additionally some Japanese and Thailand specimens of *O. nutans* show sometimes a red and globose fertile part,

never observed in *O. neonutans*, and the perithecial head of *O. neonutans* is always cylindrical (Fig. 2.).

The number of part-spores is 64, same number of those from Japanese specimens (according with Ihara, naro.affrc.go.jp). The initial pattern of spores development is similar to that described by Ihara for *O. nutans*; nevertheless we were not able to observe longer structures like hyphae growing from the spores, neither phialides or secondary spores.

### ***Cordyceps* species that parasitize Hemiptera and range of hosts of *O. nutans* species-complex**

Up to now, six *Cordyceps* species *C. nutans*, *C. pentatomae* (Koval), *C. sichuanensis* (Z. Q. Liang & Bo Wang), *C. tricornis*, *C. lutea* (Moureau) and *C. atewensis* (Samson, H.C. Evans & Hoekstra); all now transferred to *Ophiocordyceps* except *C. atewensis*, have been reported on adults of Hemiptera under two suborders Heteroptera and Auchenorrhyncha (also called Homoptera). Two more species, *C. bicephala* ssp. *nutans* (from Africa) and *C. dimeropoda* P. Syd. (from New Guinea), are recognized as synonyms of *O. nutans*. Out of above six species, *O. nutans* was for long time recognized as a parasite of the widest dimension of hosts within suborder Heteroptera. Before this work, *O. nutans* was considered the most widely distributed species among them, reported from three continents (Asia, Africa and South America). Other three species (*O. pentatomae*, *O. sichuanensis* and *O. tricornis*) are restricted to Asia and other two (*C. atewensis* and *O. lutea*,) to Africa. *Ophiocordyceps pentatomae* and *O. sichuanensis* share the same host family (Pentatomidae) with *O. nutans*, but are morphologically quite different from the latter.

Patouillard (1887) did not mention the host species of *O. nutans* in the protologue. As early as 1929, Esaki summarized 15 host species of Japanese *O. nutans* under five families and two super families. Latter authors added few more host species mainly from Japan and few from Africa and New Guinea. Among the nine family hosts of *O. nutans* species-complex, only Pentatomidae has been reported from all three continents. Acanthosomatidae, Urostylididae, Dinidoridae and Coreidae are reported as hosts for *O. nutans* for Asia, Tessaratomidae for New Guinea, and Pyrrhocoridae and Reduviidae for Africa. Plataspidae was reported for Asia and Africa. In total, *O. nutans* species-complex parasitizes two infraorders, four super families, nine families and around 30 species in Asia, Africa and South America. In the case of Brazilian specimens of *O. neonutans* were found on three subfamilies of Pentatomidae



hosts, which Discocephalinae and Edessinae occur only in the Neotropical region.

According to Sasaki *et al.* (2012), genetic variation correlated to host species is possible to find in some entomogenous fungi. From the phylogenetic point of view, perhaps using a multi-gene analysis, we can expect that *O. neonutans* could be more related to *O. nutans*. On the other hand, up to now, we believe that those fungi are morphologically similar because they have similar substrate/host (Hemiptera).

The multi-gene phylogeny of Brazilian and Japanese specimens possibly, solve the phylogenetic relationship with *O. nutans* Type I and Type II and other species of “sphecocephala” clade. In conclusion, despite of the new neotropical species, named here as *O. neonutans*, in fact *O. nutans* is confirmed as a species complex, wich could comprises many distinct geographic lineages around the world.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to Dr. Fumito Sasaki, for the loan of the reference material, to Dra. Jocelia Grazia for subfamilies hosts identification; to Dr. Matheus Reck, to Aristoteles Goes-Neto and Marcelo Ribeiro for the support in the molecular and barcode Gap analysis. For *Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior* (CAPES) for providing master’s scholarship to RCSF.

## REFERENCES

- Anonymous. 1969. Flora of British fungi colour identification chart. In Edinburgh, UK: Royal Botanic Garden Edinburgh, Her Majesty's Stationery Office.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *In Nature methods*, 9(8), 772-772.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L.; Hortorium, L.H.B., 1987 Isolation of plant DNA from fresh tissue. *In Focus*, v.12, n.1, p. 13-15.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *In BMC evolutionary biology*, 7(1), 214.
- Guindon, S., & Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *In Systematic biology*, 52(5), 696-704.
- Hu, B., & Chen, Y. 2010. Molecular phylogeny of the entomopathogenic fungi of the genus *Cordyceps* (Ascomycota : Clavicipitaceae) and its evolutionary, 48(6), 435-444. doi:10.1111/j.1759-6831.2010.00100.x
- Hywel-Jones, N. L. 1995. Notes on *Cordyceps nutans* and its anamorph, a pathogen of hemipteran bugs in Thailand. *In Mycological Research*, v. 99, n. 6, p. 724-726.
- Katoh, K., Asimenos, G., & Toh, H. 2009. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *In Bioinformatics for DNA sequence analysis* (pp. 39-64). Humana Press.
- Kobayasi, Y. 1981. Revision of the genus *Cordyceps* and its allies 2. *In Bulletin of the National Science Museum Tokyo*, v. 7, p. 123-129.
- Köppen, W., & GEIGER, R. 1928. Klimate der Erde. Gotha: Verlag Justus Perthes. *In Wall-map 150cmx200cm.*
- Meijer, A. A. R. 2006. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná. *In Boletim do Museu Botânico Municipal (Curitiba)*, v.68, p. 1-55.
- Miller MA, Holder M, Vos R, Midford P, Liebowitz T, Chan L, Hoover P, Warnow T. The CIPRES Portals 2010. URL: <http://www.phylo.org/portal2/login!input.action>. Accessed: 5 October 2010. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/5tFwiKMK8>).
- Moureau J., 1949. *Cordyceps* du Congo Belge. *In Memoirs Institute Royal Colonial Belge* 7: 1-58.
- Petch, T. 1931. Notes on entomogenous fungi. *In Transactions of the British In Mycological Society*, v. 16, n. 1, p. 55-75.

- Samson RA, Evans HC, 1975. Notes on entomogenous fungi from Ghana. 3. The genus *Hymenostilbe*. *In* Proceedings, Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (series C) 78: 73–80.
- Samson, R. A., Evans, H. C., & Hoekstra, E. S. 1982. Notes on entomogenous fungi from Ghana. VI. The genus *Cordyceps*. *In* Proceedings-Nederlandse Akademie van Wetenschappen. Series C: Biological and medical sciences.
- Sasaki F, Miyamoto T, Tamai Y, Yajima T, 2004. Isolation of vegetable wasps and plant worms, *Cordyceps nutans*, from fruit-body tissue. *In* Journal of Invertebrate Pathology 85: 70–73.
- Sasaki F, Miyamoto T, Tamai Y, Yajima T, 2005. Optimum temperature and pH for mycelial growth of *Cordyceps nutans* Pat. (ascomycetes). *In* International Journal of Medicinal Mushrooms 7: 301–304.
- Sasaki, F., Miyamoto, T. Yamamoto, A., Tamai, Y. & Yajima, T. 2008. Morphological and genetic characteristics of the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps nutans* and its host insects. *In* Mycological research, v. 112, n. 10, p. 1241–1244.
- Sasaki, F., Miyamoto, T., Yamamoto, A., Tamai, Y. & Yajima, T. 2012. Relationship between intraspecific variations and host insects of *Ophiocordyceps nutans* collected in Japan. *In* Mycoscience, v. 53, n.2, p. 85–91.
- Schumacher, T. 1982. Ascomycetes from Northern Thailand. *In* Nordic Journal of Botany, v. 2, n. 3, p. 257–263.
- Shrestha, B. 2011. Diversity of *Cordyceps* Fungi in Nepal. *In* Nepal Journal of Science and Technology, v. 12, p. 103–110.
- Shrestha, B. & Sung, J. 2005. Notes on *Cordyceps* species collected from the central region of Nepal. *In* Mycobiology, v. 33, n. 4, p. 235–239.
- Shrestha, K. 1985. *Cordyceps nutans* Pat. from Lato Manang. *In* Journal of Natural History Museum, v. 9, p. 111–114.
- 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. *In* Studies in Mycology, v. 57, p. 5–59.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *In* Molecular biology and evolution, 30(12), 2725–2729.
- 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. *In* Journal of Systematics and Evolution, 48(6), 435–444.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.

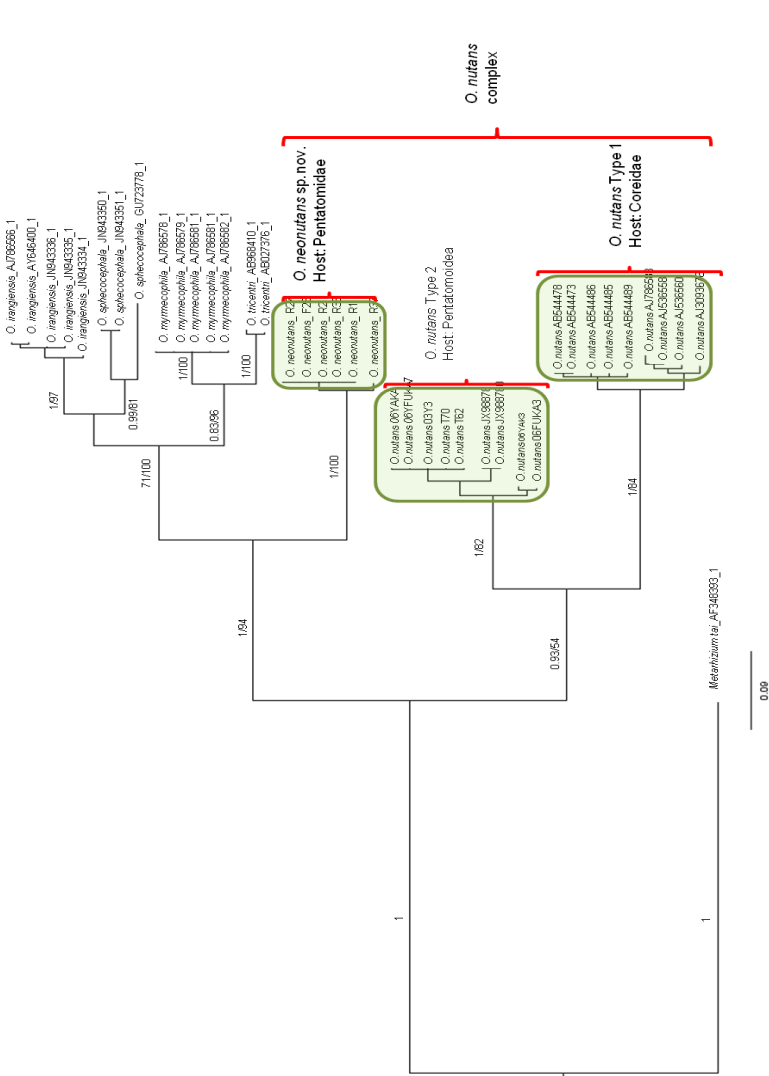


Fig. 1. Phylogenetic relationship of *O. nutans*, *O. neonutans* and other *Ophiocordyceps* species based on rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences. Consensus tree (MV) obtained from the heuristic search is presented.

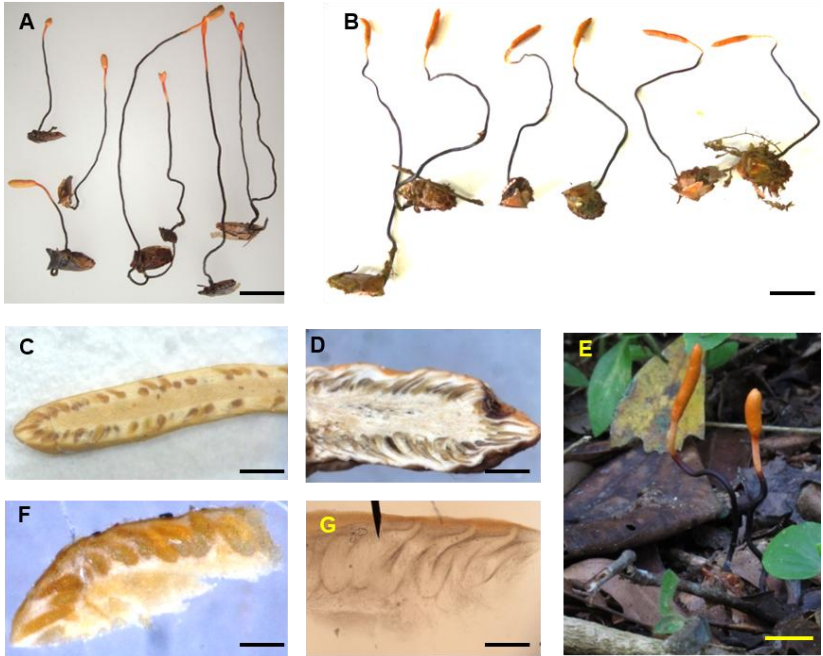


Fig. 2. A. Specimens of *O. nutans* from Asian. B. Specimens of *O. neonutans* from Brazil. C. Fertile part of *O. nutans*. D. Perithecial ascomata of *O. nutans*. E. *O. neonutans* with two stromatas. F. Fertile part of *O. neonutans* (1.50mm). G. Perithecial ascomata of *O. neonutans*. (scale bars: A = 10cm, B = 10cm, C = 1.5mm, D = 1000 $\mu$ m, E = 10mm, F= 1000 $\mu$ m).

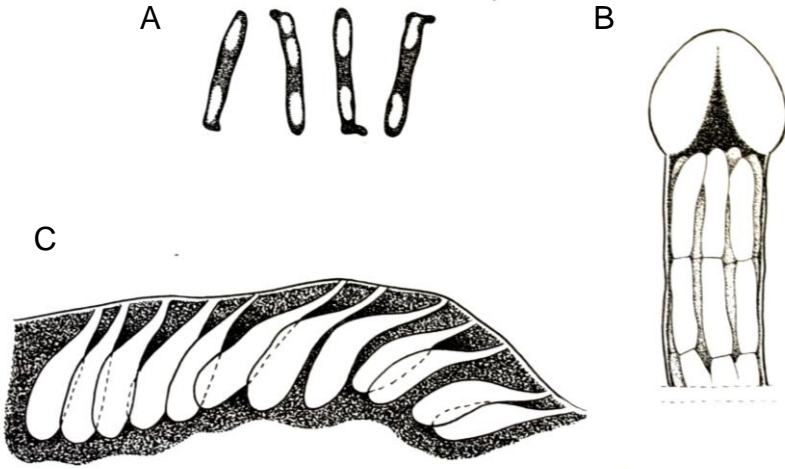


Fig. 3. Spores of *O. neonutans* starting the germination. B. Ascospore, showing the prominent apex (cap). C. Stroma of the fertile part crowded of immersed perithecia, obliquely distributed. (scale bars: A = 10 $\mu$ m, B = 8 $\mu$ m, C = 700 $\mu$ m)

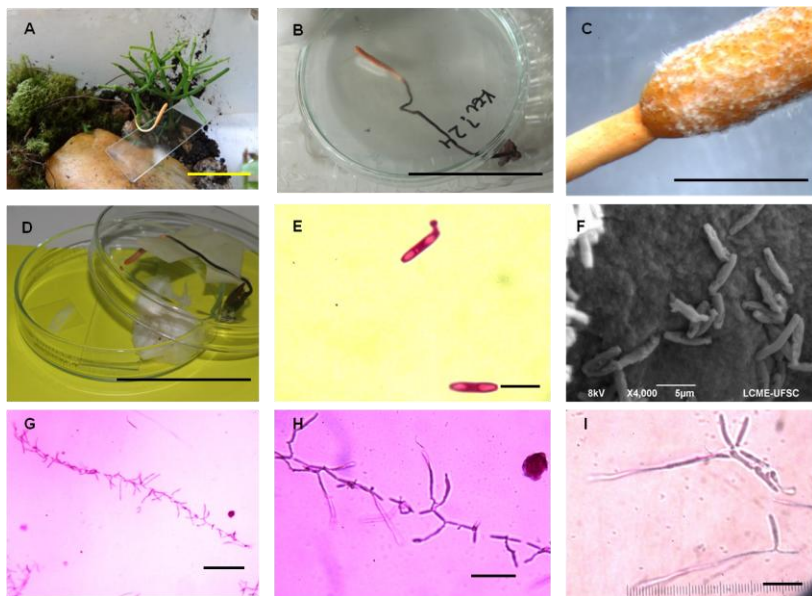


Fig. 4. Spores discharge and spores development of *O. neonutans* A. Ascospores discharge of on slide glass. B. Spore print in agar-agar plates. C. Fertile region with spores. D. Spore print in a petri dish with slide glasses. E., F. Spores development, third day. G. Ascospores development, fifth day. H. Ascospores development seventh day. I. Part spores development seventh day. (scale bars: A, B, D = 5cm, C =1.5mm, D = 1000μm, E, F = 10μm, G = 50μm, H = 20μm).



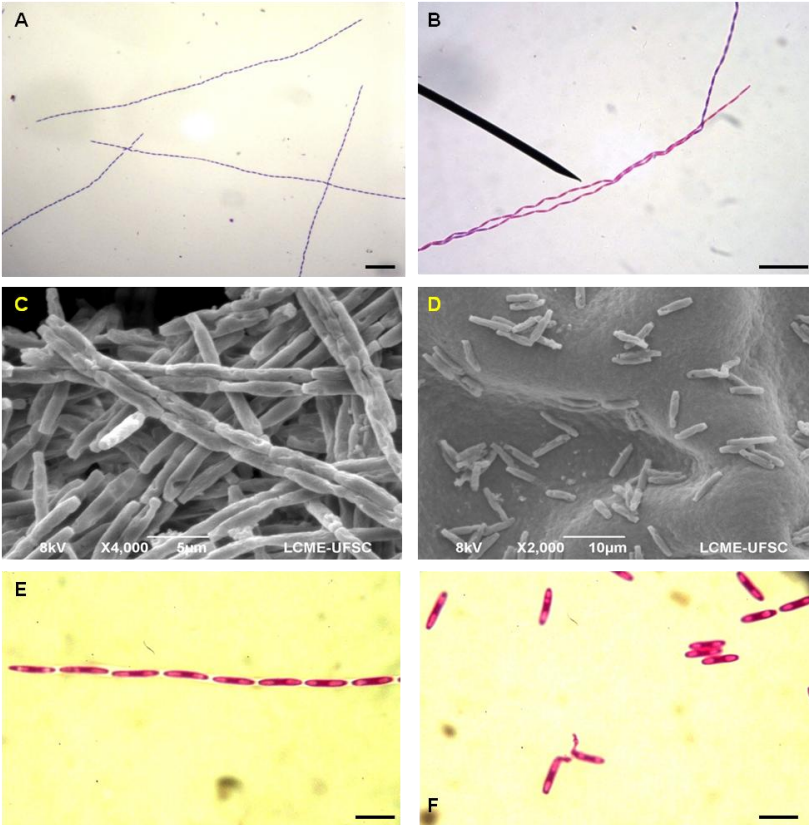


Fig. 5. A., B. Integrity ascospores of *O. neonutans* with 64 part spores in which one. C., D. SEM of ascospores and part spores. E. MO of Ascospores. F. Part spores starting its germination. (scale bars: A, B = 100 $\mu$ m, C, D = 5 $\mu$ m, D = 1000 $\mu$ m, E, F = 10 $\mu$ m).

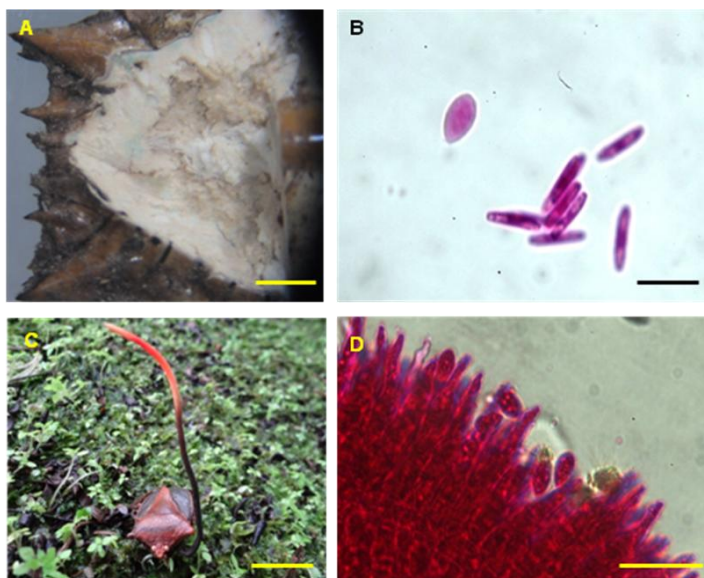


Fig. 6. Anamorphic structures of *O. neonutans* A. Micelia inside insect body. B. Elipsoid anamorph spore and the teleomorph spores. C. Aperiithecial specimen. D. Hyphal layer of the aperiithecial. (scale bars: A = 2cm B = 10 $\mu$ m, C = 10 $\mu$ m, D = 10 $\mu$ m).

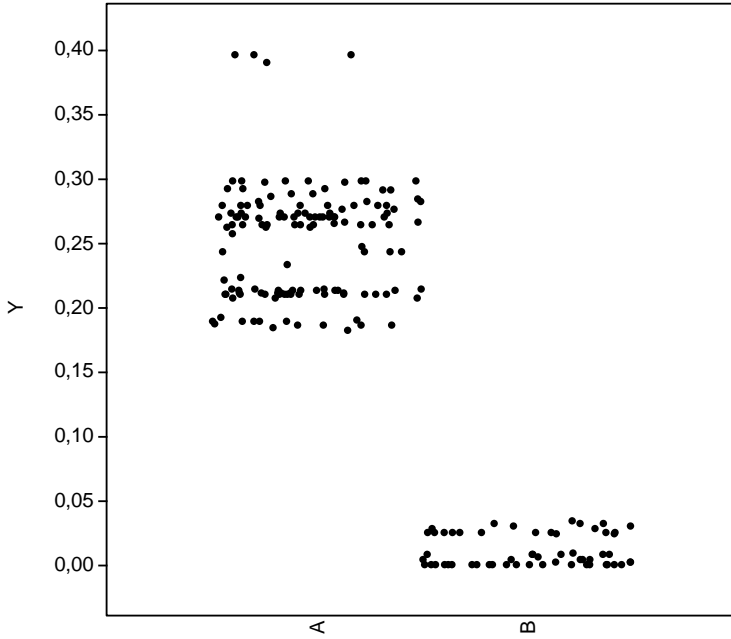


Fig. 7. Barcoding Gap analysis between Japanese, Chinese and Brazilian lineages of *O. nutans*. A. showing interspecific genetic distances and B. intraspecific genetic distances.

Table 1. Species and respectively hosts used in the phylogenetic analysis.

Species and respectively hosts used in the phylogenetic analysis	Hosts
<i>Ophiocordyceps nutans</i> (Pat.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	Hemiptera - Heteroptera
<i>Ophiocordyceps tricenri</i> (Yasuda) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	Hemiptera - Homoptera
<i>Ophiocordyceps australis</i> (Speg.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	Hymenoptera - Formicidae
<i>Ophiocordyceps neonutans</i> Schwarz-Friedrich, Shrestha and Drechsler-Santos 2015 sp. nov.	Hemiptera - Heteroptera
<i>Ophiocordyceps myrmecophila</i> (Ces.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	Hymenoptera - Formicidae
<i>Ophiocordyceps sphecocephala</i> (Klotzsch ex Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	Hymenoptera - Ichneumonidae
<i>Ophiocordyceps irangiensis</i> (Moureau) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	Hymenoptera - Formicidae
<i>O. forquignoni</i> (Quél) G. H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	Hymenoptera - Formicidae
<i>O. formicarum</i> (Kobayasi) G. H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	Hymenoptera – Formicidae
<i>Metacordyceps. Taii</i> (Z. Q. Liang & A. Y. Liu) G. H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007	
<i>Nectria cinnabarina</i> (Tode) Fr.	Outgroup

Table 2. Specimens and voucher used in the phylogenetic analysis

Species	Location	Source of sequences	Reference n.	GenBank accession n.
<i>O. nutans</i>	Thailand	Stensrud <i>et al.</i> 2005	UoO-113/78	AJ786583
<i>O. nutans</i>	Japan	Sasaki <i>et al.</i> 2012	06Yaka1	AB544491.1
<i>O. nutans</i>	Japan	Sasaki <i>et al.</i> 2012	06Fuka7	AB544467.1
<i>O. nutans</i>	Japan	Sasaki <i>et al.</i> 2012	03Y3	AB544452.1
<i>O. nutans</i>	Japan	Sasaki <i>et al.</i> 2012	T70	AB366623.1
<i>O. nutans</i>	Japan	Sasaki <i>et al.</i> 2012	T62	AB366626.1
<i>O. nutans</i>	Japan	Sasaki <i>et al.</i> 2012	06Yak3	AB544490.1
<i>O. nutans</i>	Japan	Sasaki <i>et al.</i> 2012	06Fuka3	AB544463.1
<i>O. nutans</i>		XIANG		JX988781.1
<i>O. nutans</i>		XIANG		JX988780.1
<i>O. nutans</i>	Japan	Sasaki <i>et al.</i> 2012	06Tank11.H	AB544478.1
<i>O. nutans</i>	Japan	Sasaki <i>et al.</i> 2012	06Tank22	AB544486.1
<i>O. nutans</i>	Japan	Sasaki <i>et al.</i> 2012	06Tank1	AB544473.1
<i>O. nutans</i>	Japan	Sasaki <i>et al.</i> 2012	06Tank21	AB544485.1
<i>O. nutans</i>	Japan	Sasaki <i>et al.</i> 2012	06Yak2	AB544489.1
<i>O. nutans</i>	Thailand	GenBank		AJ786583
<i>O. nutans</i>	China	GenBank		AJ536558
<i>O. nutans</i>	China	TIAN		AJ536560.1
<i>O. nutans</i>	China	GenBank		AJ309367
<i>O. neonutans</i>	Brazil	This work	R1	
<i>O. neonutans</i>	Brazil	This work	R33	
<i>O. neonutans</i>	Brazil	This work	R37	
<i>O. neonutans</i>	Brazil	This work	R2	
<i>O. neonutans</i>	Brazil	This work	F25	
<i>O. neonutans</i>	Brazil	This work	R27	
<i>O. irangiensis</i>	Thailand	Stensrud <i>et al.</i> 2005	NHJ3	AJ786566
<i>O. irangiensis</i>		GenBank/Kwong		AY646400.1

<i>O.irangiensis</i>	Schoch <i>et al.</i> 2012		JN943336.1
<i>O.irangiensis</i>	Schoch <i>et al.</i> 2012		JN943335.1
<i>O.irangiensis</i>	Schoch <i>et al.</i> 2012		JN943334.1
<i>O.myrmecophila</i>	Stensrud <i>et al.</i> 2005		AJ786582.1
<i>O.myrmecophila</i>	Stensrud <i>et al.</i> 2005		AJ786581.1
<i>O.myrmecophila</i>	Stensrud <i>et al.</i> 2005		AJ786580.1
<i>O.myrmecophila</i>	Stensrud <i>et al.</i> 2005		AJ786578.1
<i>O.myrmecophila</i>	Stensrud <i>et al.</i> 2005		AJ786579.1
<i>O.tricentri</i>	GenBank		AB027376.1
<i>O.tricentri</i>	GenBank		AB968410.1
<i>O.sphecocephala</i>	Schoch <i>et al.</i> 2012		JN943350.1
<i>O.sphecocephala</i>	Schoch <i>et al.</i> 2012		JN943351.1
<i>O.sphecocephala</i>	LuangsaArd		GU723778.1
<i>M. taii</i>	GenBank/Tian	HMIGD 20926	EF495101.1
<i>M. taii</i>	GenBank; Huang <i>et al.</i> , unpubl.		AF348393
<i>Nectria cinnabarina</i>	GenBank		HM484699.1

---

Table 3. Morphological microscopically comparison into the *Ophiocordyceps nutans* species-complex.

Host families	Perithecia	Asci	Ascospores
<i>O. nutans</i> s.s (Type II) -			
Japan Pentatomidae	610 – 1150 x 190 – 560	225 – 850 x 5 – 9	4 – 20 x 1,5 – 2
<i>O. nutans</i> s.s (Type II) -			
Japan			
Acanthosomatidae	610 – 1170 x 200 – 500	200 – 875 x 5 – 9	3,5 – 14,5 x 1,5 – 2,5
<i>O. nutans</i> s.s (Type II) -			
Japan Urostylidae	720 – 1170 x 220 – 360	275 – 740 x 5 – 9	7 – 11 x 1 – 2
<i>O. nutans</i> Type I - Japan			
Coreidae	950 – 970 x 250 – 260	N/A	N/A
<i>O. neonutans</i> - Brazil			
Pentatomidae	630 – 1200 x 130 – 360	220 – 770 x 3 – 8	6 – 15 x 1,2 – 3

4.3. Análises morfológicas revelam uma possível espécie nova de *Ophiocordyceps* (Ascomycota, Hyprocreales) que ataca percevejos da ordem Homoptera no Brasil



Análises morfológicas revelam uma possível espécie nova de *Ophiocordyceps* (Ascomycota, Hyprocerales) que ataca percevejos da ordem Homoptera no Brasil

## INTRODUÇÃO

O táxon *Ophiocordyceps nutans* (Pat.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora é caracterizado por apresentar ascos e ascosporos que se rompem com facilidade, em *part-spores* cilíndricos com as extremidades arredondadas, estrutura assexual presente logo abaixo da região fértil que é terminal e bem delimitada, podendo também estar presente em um stroma isolado, quando da ausência da região fértil. Além disso, parasitam insetos da subordem Heteroptera (Hemiptera).

Durante as pesquisas com fungos patógenos de percevejos no Brasil mais de 100 espécimes foram coletados em diferentes ecossistemas (Mata Atlântica e Cerrado), parasitando a subordem Heteroptera (Hemiptera), e a partir de análises morfológicas e moleculares foi possível reconhecer uma espécie distinta, *Ophiocordyceps neonutans*. Diferentemente, outro espécime coletado, encontrado parasitando insetos da subordem Homoptera (Hemiptera), com macro morfologia similar e micro morfologia bastante distinta de *O. nutans* e *O. neonutans* merece especial atenção taxonômica. Além de o espécime coletado apresentar disposição dos peritécios diferenciada, tem como caracter dignóstico os segmentos de esporo (*part spores*) fusoides, entre outras características que serão discutidas. Com o objetivo de contribuir para o conhecimento das espécies entomopatógenas de Hemiptera é apresentada uma possível novidade científica com base na morfologia particular e novidade em relação ao hospedeiro.

## MATERIAL E METODOS

### Area de estudo, coleta e procedimento para estudo

O espécime estudado foi coletado em meio a serra pilheira, em Santo Amaro da Imperatriz, sul do estado de Santa Catarina em uma expedição realizada no dia 27 de fevereiro de 2014. Foi armazenado em uma caixa plástica e levado para o laboratório (MICOLAB – UFSC) onde foram realizadas análises morfológicas, culturas e separação de material para extração de DNA. Posteriormente o material foi desidratado em uma desidratadora de frutas.

O material coletado foi analisado microscopicamente utilizando lactofuxina. Foi realizada manualmente uma secção longitudinal na região fértil do estroma, expondo os peritécios. Peritécios, ascos e ascosporos foram observados, examinados e medidos (n=20).

No laboratório foi retirada uma pequena porção do estroma ainda fresco para posterior extração de DNA e também para cultivo. O cultivo foi realizado em placas de Petri contendo de ágar-ágar, e armazenados em câmara escura a 25°C.

***Ophiocordyceps* sp. 1** (Fig. 1)

**Descrição** — Estroma solitário, filiforme, ligeiramente curvado (85 × 0,5 - 1mm) emergindo a partir da região torácica do hospedeiro. Estipe filiforme (75 × 0,5 mm), preto amarronzado, com a região fertil, amarela pálida a dourada, glabra e cilíndrica (10 × 1 mm) (Fig. 1A); região fertil apical, bem delimitada, pontuada por ostíolos do peritécio, a região final do estipe até 10mm abaixo da região fertil apresenta coloração similar a da região fertil (Fig. 1B). Peritécios completamente imersos (600-800 × 280 × 440 µm), perpendicularmente no estroma (Fig. 1C). Ascospores cilíndricos (460 × 5 µm), 8-ascosporos, região apical do cap bem pronunciada (Fig. 1D). Ascosporos filamentosos, fusiformes, fragmentam-se facilmente em segmentos de esporos fusóides (*part-spores*), 7–10 × 1–2 µm, extremidades afiladas (Fig. 1.E.).

**Hospedeiro** — Percevejo (Hemiptera, Homoptera) 5 x 10 mm.

**Material examinado**

BRAZIL. Santa Catarina. Santo Amaro da Imperatriz, Parque Estadual da Serra do Tabuleiro, 27, Fevereiro, 2014, Magnago ACM 932 (FLOR).

### Notas taxonômicas

O espécime encontrado é caracterizado por apresentar estroma amarelo pálido a dourado, peritécios ovoides perpendicularmente inseridos no estroma e *part-spores* fusóides.

A maior parte das informações existentes na literatura sobre fungos que atacam percevejos é de que estes insetos pertencem em sua grande maioria a subordem Heteroptera. Já aqueles que parasitam a subordem Homoptera são relatados como distribuídos principalmente no continente Asiático, na China e Tailândia, como por exemplo *O. tricornis*. Devido a falta de registro de espécies parasitas de homóptera para região Neotropical e principalmente pela morfologia particular dos peritécios e *part-spores* acredita-se que o espécime encontrado no Brasil corresponda a uma espécie nova. Esta espécie apresenta o mesmo padrão de coloração de *O. tricornis* (Yasuda) e *O. nutans* quando desidratado. No entanto a forma e disposição dos peritécios e *part-spores* não deixam dúvidas de que a espécie é diferente de qualquer uma destas. O padrão de coloração e da morfologia da *O. sp.1* se parece macroscopicamente com *O. neonutans*, apesar das cores serem diferentes, o estipe e o formato da região fértil são realmente similares. O hospedeiro apesar de ser da ordem Hemiptera, pertence a uma subordem distinta, Homoptera. Quando fresco se parece com um ascoma de *O. nutans* desidratado, entretanto a tonalidade dourada da coloração da *O. sp.1* é única. Ambas as espécies (*O. neonutans* e *O. sp.1*) apresentam peritécios totalmente imersos, entretanto, com formatos e disposição diferentes. *Ophiocordyceps neonutans* apresenta peritécios completamente imersos, oblíquos em relação ao estroma, piriformes e com uma curva do pescoço. Já em *Ophiocordyceps sp.1* os peritécios são completamente imersos, mas ovóides e perpendiculares entre si. Ambas as espécies têm seus ascósporos fragmentados com facilidade, com a simples pressão da lamínula, entretanto a maior diferença está nos *part-spores*. *Ophiocordyceps neonutans* apresenta *part-spores* dentro do padrão de *Ophiocordycepsaceae*, esporos cilíndricos. Já em *Ophiocordyceps sp.1* o formato é completamente diferente das demais espécies de *Ophiocordyceps*, *Cordyceps* e *Metacordyceps* coletadas no Brasil. Os *part-spores* são fusóides. Ainda, os ascos da *O. sp. 1* apresentam “cap” bem pronunciado, diferente do padrão observado para *O. neonutans* e *O. nutans*, que são mais largos que compridos. Embora a morfologia seja particular há a necessidade de encontrar e estudar mais espécimes para descrição desta novidade científica. Além disso, seqüências de DNA não só corroborarão a novidade como também

contribuirão para a filogenia deste grupo de fungos que ataca Hemiptera morfológicamente relacionados ao complexo taxonômico *O. nutans*.

#### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem A. Magnago pela coleta do material estudado; aos responsáveis pelas áreas de estudos pelas permissões de acesso às áreas e amostragens. Ao PPGFAP pela bolsa de mestrado para RCSF.

**REFERÊNCIAS**

- Hywel-Jones, N. L. 1995. Notes on *Cordyceps nutans* and its anamorph, a pathogen of hemipteran bugs in Thailand. *In* Mycological Research, v. 99, n. 6, p. 724–726.
- Patouillard, N. 1887. Contributions a letude des Champignons extra-europeens. *In* Bulletin de la Société Mycologique de France, v.3, p. 119–131.
- Petch, T. 1931. Notes on entomogenous fungi. *In* Transactions of the British Mycological Society, v. 16, n. 1, p. 55–75.
- Schumacher, T. 1982. Ascomycetes from Northern Thailand. *Nordic Journal of Botany*, v. 2, n. 3, p. 257–263.
- Shrestha, B. 2011. Diversity of *Cordyceps* Fungi in Nepal. *In* Nepal Journal of Science and Technology, v. 12, p. 103–110.
- Shrestha, B. & Sung, J. 2005. Notes on *Cordyceps* species collected from the central region of Nepal. *In* Mycobiology, v. 33, n. 4, p. 235–239.

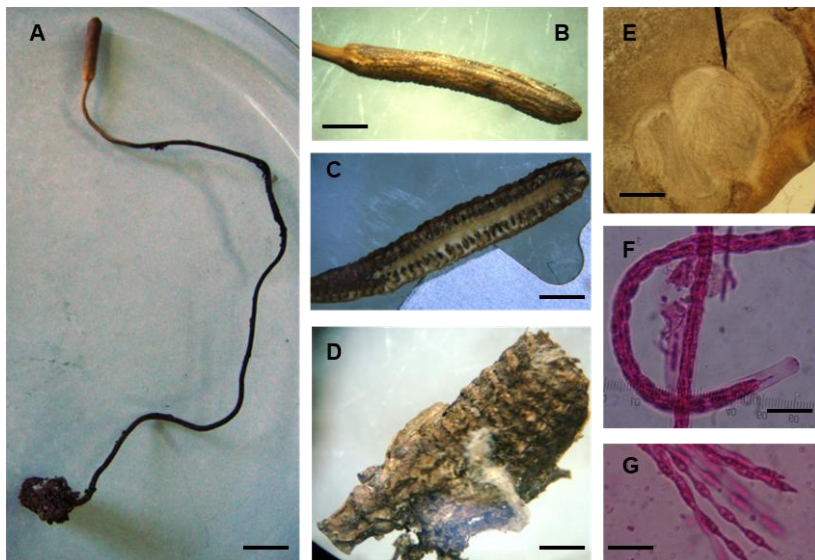


Fig. 1. *Ophiocordyceps* sp.1. A. vista geral do espécime fúngico e hospedeiro. . B. Região fértil. C. Secção longitudinal do ascoma mostrando o estroma e disposição dos peritécios. D. Hospedeiro Homoptera. E. Peritécios ovoides, imersos no estroma. F. *Cap* bem pronunciado dos ascosporos (30  $\mu$ m). G. *Part spores* fusoides. (escalas: A = escala = 10mm, B = 2mm, C = 1,8mm, D = 2mm, E = 400  $\mu$ m, F = 15  $\mu$ m)

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dos espécimes brasileiros, coletados na Mata Atlântica e Cerrado, há pelo menos duas novas espécies com morfologia similar à *O. nutans*. *O. neonutans* é caracterizado por parasitar também insetos da ordem Hemiptera (Heteroptera), entretanto apenas da Família Pentatomidae, e *Ophiocordyceps* sp. 1 por parasitar insetos da ordem Hemiptera, da subordem Homoptera. Sendo assim *O. nutans* não pode ser considerado como ocorrente no Brasil. Ainda, as evidências moleculares apontam duas linhagens asiáticas, que merecem atenção taxonômica, pelo menos para definição de *O. nutans* s.s. O Tipo II se encaixa melhor nas descrições de *O. nutans* s.s. e a segunda linhagem (tipo I) pode ser uma diferente espécie a ser descrita.

Considerando as afirmações acima fica claro a necessidade de revisão de todas as coleções de *O. nutans* s.l., registradas como ocorrentes em outras regiões do Globo. Registros da América do Sul podem representar exemplares de *O. neonutans*, principalmente coleções da Colômbia e Argentina, ou até mesmo novas espécies pertencentes ao complexo *O. nutans*.

Para a proposição de *Ophiocordyceps* sp. 1, como descrita no cap.3, de hospedeiro distinto e com morfologia micro e macroscópica diferente de *O. nutans* e *O. neonutans*, é necessário realizar mais coletas, pois até o momento há apenas um exemplar. Também será importante ter os resultados das análises moleculares de ITS e LSU. O sequenciamento de mais marcadores moleculares contribuirá para o melhor entendimento das relações entre os fungos parasitas de Hemiptera encontrados no Brasil e de outras regiões e continentes, além da confirmação e descoberta de novos táxons.

## 6. REFERENCIAS

- Araújo, J., Evans, H. C., Geiser, D. M., & Hughes, D. P. 2014. Unraveling the diversity behind *Ophiocordyceps unilateralis* complex: Three new species of Zombie-Ant fungus from Brazilian Amazon. *bioRxiv*. <http://dx.doi.org/10.1101/003806>
- Ban, S., Sakana, T. & Nakagiri A. 2015. Three new species of *Ophiocordyceps* and overview of anamorph types in the genus and the family Ophiocordycipitaceae. *Mycological Progress* DOI 10.1007/s11557-014-1017-8.
- Blackwell, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426-438.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *In Nature methods*, 9(8), 772-772.
- Bianco, A. E., & Maizels, R. M. 1989. Parasite development and adaptive specialization. *Parasitology*, 99(S1), S113-S123.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., & Drummond, A. J. 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 10(4), e1003537.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L.; Hortorium, L.H.B., 1987 Isolation of plant DNA from fresh tissue. *In Focus*, v.12, n.1, p. 13-15.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *In BMC evolutionary biology*, 7(1), 214.
- Góes-Neto, A., Loguercio-Leite, C., & Guerrero, R. T. 2005. DNA extraction from frozen fieldcollected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas*, 18(2), 19-32.
- Guindon, S., & Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *In Systematic biology*, 52(5), 696-704.
- Evans, H.C. 1982. Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems: an appraisal. *In Ecological Entomology*, v.7, n.1, p. 47-60.
- Evans, C. H. & Samson, R. A. 1984. *Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic of ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems II. The *Camponotus* (Formicinae) complex. *In Trans. Br. Myco. Soc.*, v. 82, p. 127-150.



- Evans, H. C., Smith, S. M., Katundu, J. M., & Kapama, J. T. (1999). A *Cordyceps* pathogen of sugar-cane white grubs in Tanzania. *Mycologist*, 13(1), 11-14.
- Evans, H. E., Elliot, S. L. & Hughes, D. P. 2011. Hidden diversity behind the zombie-ant fungus *Ophiocordyceps unilateralis*: Four new species described from carpenter ants in Minas Gerais, Brazil. *In PloS One*, v. 4, p. 5, p. 598 – 602.
- Hywel-Jones, N. L. 1995. Notes on *Cordyceps nutans* and its anamorph, a pathogen of hemipteran bugs in Thailand. *In Mycological Research*, v. 99, n. 6, p. 724–726.
- Kaitsu, Y., Shimizu, K., Tanaka, E., Shimano, S., Uchiyana, S., Tanaka, C., Kinjo, N. 2013. *Ophiocordyceps sessilis* sp. nov., a new species of *Ophiocordyceps* on *Camponotus* ants in Japan. *In Mycological Progress*, v. 13, n. 4, p. 755-761.
- Kobayasi, Y. 1981. Revision of the genus *Cordyceps* and its allies 2. *In Bulletin of the National Science Museum Tokyo*, v. 7, p. 123–129.
- Meijer, A. A. R. 2006. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná. *In Boletim do Museu Botânico Municipal (Curitiba)*, v.68, p. 1–55.
- 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.
- Patouillard, N. 1887. Contributions a letude des Champignons extra-europeens. *In Bulletin de la Société Mycologique de France*, v.3, p. 119–131.
- Petch, T. 1931. Notes on entomogenous fungi. *In Transactions of the British Mycological Society*, v. 16, n. 1, p. 55–75.
- Sato, H., N. Kamata and M. Shimazu. 1997 Aerial infection of *Cordyceps militaris* Link (Clavicipitales: Clavicipitaceae) against larvae of *Quadricalcarifella punctatella*(Motschulsky) (Lepidoptera: Notodondidae). *Appl. Entomol. Zool.* 32: 249–252.
- Sanjuan, T., Tabima, J., Restrepo, S., Læssøe, T., Spatafora, J. W. & Franco-Molano, A. E. 2014. Entomopathogens of Amazonian stick insects and locusts are members of the *Beauveria* species complex (*Cordyceps* sensu stricto). *In Mycologia*, v. 106, n. 2, p. 260-275.
- Sasaki, F., Miyamoto, T., Yamamoto, A., Tamai, Y. & Yajima, T. 2012. Relationship between intraspecific variations and host insects of

- Ophiocordyceps nutans* collected in Japan. *In Mycoscience*, v. 53, n.2, p. 85–91.
- Sasaki, F., Miyamoto, T., Yamamoto, A., Tamai, Y. & Yajima, T. 2008. Morphological and genetic characteristics of the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps nutans* and its host insects. *In Mycological research*, v. 112, n. 10, p. 1241–1244.
- Sasaki, F., Miyamoto, T., Tamai, Y., & Yajima, T. 2004. Isolation of vegetable wasps and plantworms, *Cordyceps nutans*, from fruit-body tissue. *In Journal of invertebrate pathology*, v. 85, n. 2, p. 70–3.
- Schumacher, T. 1982. Ascomycetes from Northern Thailand. *Nordic Journal of Botany*, v. 2, n. 3, p. 257–263.
- Shrestha, B. 2011. Diversity of *Cordyceps* Fungi in Nepal. *In Nepal Journal of Science and Technology*, v. 12, p. 103–110.
- Shrestha, B. & Sung, J. 2005. Notes on *Cordyceps* species collected from the central region of Nepal. *In Mycobiology*, v. 33, n. 4, p. 235–239.
- Shrestha, K. 1985. *Cordyceps nutans* Pat. from Lato Manang. *In Journal of Natural History Museum*, v. 9, p. 111–114.
- 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. *In Studies in Mycology*, v. 57, p. 5–59.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., & Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *In Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Tanada, Y. and H. K. Kaya. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego. 666 pp.
- 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. *Fungal Ecology*, 2(4), 149–159.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.
- Zheng, P., Xia, Y., Zhang, S., & Wang, C. (2013). Genetics of *Cordyceps* and related fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(7), 2797–2804.

## APÊNDICES

### Apêndice A. Culturas obtidas

Espécie	Cultura	Meio
<i>Ophiocordyceps cf. australis</i>	Branca, Rosa e Marrom	
<i>Cordyceps cf. locustiphila</i>	Alaranjada/Amarela	
<i>C. cf. cardinalis</i>	Branca	Vermelho
<i>O. sp1. nov.</i>	Creme Com Marrom	Marrom
<i>O. cf. gracilioides</i>	Rósea	
<i>O. cf. melolonthae</i>	Creme	
<i>O. cf. neonutans</i>	Rósea	
<i>Torrubiela sp.</i>	Branca	

## Apêndice B. Sequências ITS

N. extração	Espécie	N. coleta
R1	<i>O. neonutans</i>	KEL113
R2	<i>O. neonutans</i>	KEL114
F25	<i>O. neonutans</i>	FMF88
R27	<i>O. neonutans</i>	KEL138
RF37	<i>O. neonutans</i>	KEL142
RF33	<i>O. neonutans</i>	KEL110
RF35	Cultura <i>O. neonutans</i>	KEL130
RF 29	Cultura <i>O. neonutans</i>	KEL119
R3	<i>O. cf. gracilioides</i>	KEL99
RF07	<i>Cordyceps sp</i>	KEL06
RF09	<i>O. cf. amazonica</i>	ACM501
RF10	<i>Cordyceps cf. locustiphila</i>	FMF95
RF11	<i>M. cf. martialis</i>	DS781

Apêndice C. Espécimes de *O. neonutans* coletados e depositados no HERBÁRIO FLOR.

N. de coleta	DIA	Estado
MJ 85	10/12/2011	SC
MJ 103 E	20/12/2011	SC
MJ 103 D	20/12/2011	SC
MJ 103 C	20/12/2011	SC
MJ 103 B	20/12/2011	SC
MJ 103 A	20/12/2011	SC
LDA 119	25/01/2014	SC
S URREA 160	06/08/2012	SC
KEL 111	10/01/2014	SC
KEL 60	02/12/2013	SC
KEL 56	23/11/2013	SC
KEL 55	23/11/2013	SC
KEL 54	23/11/2013	SC
KEL 53	23/11/2013	SC
KEL 52	23/11/2013	SC
KEL 47	16/11/2013	SC
KEL 46	09/11/2013	SC
KEL 36	0/0/2012	SC
KEL 158	21/03/2014	SC
KEL 142	27/01/2014	SC
KEL 141	27/01/2014	SC
KEL 140	27/01/2014	SC
KEL 139	27/01/2014	SC
KEL 138	27/01/2014	SC
KEL 137	27/01/2014	SC
KEL 136	27/01/2014	SC
KEL 135	27/01/2014	SC
KEL 134	27/01/2014	SC
KEL 133	27/01/2014	SC

KEL 132	27/01/2014	SC
KEL 131	27/01/2014	SC
KEL 130	27/01/2014	SC
KEL 129	27/01/2014	SC
KEL 123	10/01/2014	SC
KEL 122	10/01/2014	SC
KEL 121	10/01/2014	SC
KEL 120	10/01/2014	SC
KEL 119	10/01/2014	SC
KEL 118	10/01/2014	SC
KEL 117	10/01/2014	SC
KEL 116	10/01/2014	SC
KEL 115	10/01/2014	SC
KEL 114	10/01/2014	SC
KEL 113	10/01/2014	SC
KEL 112	10/01/2014	SC
KEL 110	10/01/2014	SC
KEL 109	10/01/2014	SC
KEL 105	01/01/2014	SC
KEL 1	02/02/2013	SC
JS 52	02/12/2013	SC
FTF 27	28/10/2012	SC
FTF 121	26/01/2014	PR
FTF 120	26/01/2014	PR
FTF 109	25/01/2014	SC
FMF 88	26/03/2013	MT
FMF 59	05/10/2012	SC
FMF 50	01/03/2012	SC
FMF 123	04/09/2013	PR
FMF 103	30/04/2013	SC
FMF 102	30/04/2014	SC
FMF 101	30/04/2013	SC
ANMF 349	28/10/2013	SC

ACM 899	25/01/2014	SC
ACM 545	02/02/2013	SC
ACM 448	30/10/2012	SC
KEL 197	20/09/2014	SC
GAS 697	16/12/2014	SP
S URREA 185	28/10/2012	SC
FMF 264	07/08/2014	SC
FMF 265	27/09/2014	SC
FMF 266	27/09/2014	SC
FMF 267	27/09/2014	SC
FMF 268	27/09/2014	SC
FMF 269	27/09/2014	SC
FMF 270	27/09/2014	SC
FMF 271	27/09/2014	SC
FMF 272	27/09/2014	SC
FMF 273	27/09/2014	SC
FMF 274	27/09/2014	SC
FMF 276	27/09/2014	SC
FMF 277	27/09/2014	SC
FMF 278	27/09/2014	SC
FMF 279	27/09/2014	SC
FMF 280	27/09/2014	SC
FMF 281	27/09/2014	SC
FMF 282	27/09/2014	SC
FMF 283	27/09/2014	SC
FMF 284	27/09/2014	SC
FMF 285	27/09/2014	SC
FMF 286	27/09/2014	SC
FMF 287	27/09/2014	SC
FMF 288	27/09/2014	SC
FMF 289	27/09/2014	SC
FMF 290	27/09/2014	SC
FMF 291	27/09/2014	SC

FMF 292	27/09/2014	SC
FMF 293	27/09/2014	SC
KEL 199	27/09/2014	SC
KEL 200	27/09/2014	
KEL 204	28/12/2015	
JS 81		

---



## Apêndice D. Espécimes de herbários analisados

Herbário	Espécie	Voucher
IBOT	<i>C. bicefala</i> (Berk)	SP211651
IBOT	<i>C. bicephala</i>	SP212158
IBOT	<i>C. gracilis</i> (Grv.)	
IBOT	Durieu & Mont.	SP33646
KEW	<i>O. unilateralis</i>	
KEW	<i>O. gracilis</i>	
KEW	<i>Cordyceps</i> sp.	
	<i>O. kniphofioides</i>	
	(H.C Evans & Samson.)	
KEW		
KW	<i>O. nutans</i>	KW5647
CORNEL UNIVERSITY	<i>Cordyceps</i> sp.	CUP-A-S.N.
CORNEL UNIVERSITY	<i>O. variabilis</i> (Petch.)	CUP-A-042674
CORNEL UNIVERSITY	<i>C. militaris</i> (L.)Fr.	CUP-A-042685
CORNEL UNIVERSITY	<i>C. variabilis</i>	CUP-A-042673
CORNEL UNIVERSITY	<i>C. militaris</i>	CUP-A-57254
NY BOTANICAL GARDEN	<i>C. militaris</i>	603
NY BOTANICAL GARDEN	<i>C. militaris</i>	FUNG-543
NY BOTANICAL GARDEN	<i>C. militaris</i>	FUNG-544
NY BOTANICAL GARDEN	<i>C. militaris</i>	FUNG-545
NY BOTANICAL GARDEN	<i>C. militaris</i>	FUNG-546
	<i>C. submilitaris</i>	
NY BOTANICAL GARDEN	(Henn.)	3686
NY BOTANICAL GARDEN	<i>C. martialis</i> (Speg.)	73705
NY BOTANICAL GARDEN	<i>C. militaris</i>	3572
NY BOTANICAL GARDEN	<i>C. militaris</i>	569770
NY BOTANICAL GARDEN	<i>C. militaris</i>	60893
NY BOTANICAL GARDEN	<i>C. militaris</i>	4531