

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

"GERMINACIÓN DE ESCLEROCIOS Y FORMACIÓN DE ASCOSPORAS DE *Claviceps* *gigantea.*"

CELESTE ELIZABETH MORENO MANZANO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO


2014

La presente tesis titulada: ”Germinación de esclerocios y formación de ascosporas de *Claviceps gigantea*” realizada por la alumna: Celeste Elizabeth Moreno Manzano. bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO




Dr. Carlos De León

ASESOR



Dr. Cristian Nava Diaz

ASESOR



Dr. Ricardo Sánchez Palé

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Marzo de 2014

GERMINACIÓN DE ESCLEROCIOS Y FORMACIÓN DE ASCOSPORAS DE *Claviceps gigantea*

Celeste Elizabeth Moreno Manzano, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2014

RESUMEN

La germinación de esclerocios de *C. gigantea* se evaluó en diferentes sustratos (avena, carbón comercial, carbón residual y tierra) bajo condiciones de laboratorio. Se compararon las condiciones, el tiempo de germinación y formación de estructuras sexuales con las de campo. La variación en tamaño y profundidad de colocación de los esclerocios colectados en el período noviembre-diciembre 2012, no mostraron diferencia en la germinación. Los resultados mostraron que existen diferencias altamente significativas ($p < .0001$) cuando los esclerocios se colocaron sobre carbón residual en el que se obtuvo 55% de germinación de esclerocios, mientras que en los otros sustratos no hubo germinación. En laboratorio, la germinación inició seis meses después de permanecer a 4°C y dos meses a 22-24°C. Los primeros indicios de la germinación de los esclerocios fue la presencia de protuberancias globosas de color claro que corresponden a los primordios de las cabezuelas estromáticas. Las cabezuelas estromáticas maduras se observaron 15 días después de la aparición de los primordios. El promedio de cabezuelas estromáticas producidas fue de 5 por esclerocio. En campo, los primordios de las cabezuelas estromáticas de los esclerocios de *C. gigantea* aparecieron 64 días después de colocarlos en campo y las estructuras completamente desarrolladas aparecieron 23 días después de observar los primordios a temperatura promedio de 14.07°C, humedad relativa de 76.19% y una precipitación acumulada de 704.6 mm durante el ensayo (Junio – Septiembre 2013). Los primordios no germinaron ni maduraron al mismo tiempo en un mismo esclerocio, ni en condiciones de laboratorio ni

de campo. La liberación de ascosporas a partir de las cabezuelas estromáticas fue documentada pero no se pudo hacer una cuantificación de estas. Las dimensiones de los peritecios y ascosporas fueron más grandes que las reportadas por Fuentes *et al.* (1964). La extracción del ADN se llevó a cabo a partir de cabezuelas estromáticas y estípites utilizando un kit comercial (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La región del ITS fue amplificada utilizando los primers ITS1 e ITS4. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el NCBI y comparadas mediante nucleotide BLAST. Tanto características morfológicas como moleculares confirmaron la identidad del hongo como *Claviceps gigantea*.

**SCLEROTIAL GERMINATION AND FORMATION ASCOSPORES OF
*Claviceps gigantea***

Celeste Elizabeth Moreno Manzano, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2014

ABSTRACT

Sclerotia germination of *C. gigantea* from maize was tested on different substrates (whole oats, commercial charcoal, charcoal residues and soil) under laboratory conditions. The germination period and stromata formation of stalks and stromatic heads of *C. gigantea* were compared under laboratory and field conditions. Sclerotia collected during November - December 2012 were utilized. Variations in sclerotial size, placement (horizontal and vertical), and depth of placement had no effect on the germination. According to the results obtained from the analysis of the variance there was highly significant difference in the germination percentage among the various substrates used. Results showed that in charcoal residues the germination percentage was 55% however when other substrates were used the sclerotia did not germinate. The emergence of stromata initials or primordia started after eight months, initially incubated for six months at 4°C and two months at 22-24°C. Fully developed stromatic heads were observed 15 days after the emergence of stromata initials. Germinating sclerotia produced an average of 5 fleshy stalks, each with a stromatic head. Under field conditions of 12.79°C, 65.26% relative humidity and precipitation of 832.8 mm (June – September 2013), the emergence of stromata initials started 64 days after incubation and fully developed stromatic heads were observed 23 days after the emergence of primordia. The germination and maturation of the stromata primordial within the sclerotia did not occur at the same time. Ascospore discharge was observed by stereobinocular microscopy, however it was not possible to make quantitative assessments of spore discharge. Perithecia and ascospore measurements were larger than reported by

Fuentes *et al.* (1964). DNA extracted from stipes and stromatic heads was obtained according to the protocol of the commercial kit (Qiagen). The ITS region was amplified using the primers ITS1 – ITS4. The obtained sequences were submitted to the NCBI database and compared with other sequences using the nucleotide BLAST tool. Morphological and molecular characteristics confirm the identity of the fungi as *Claviceps gigantea*.

AGRADECIMIENTOS

Con gran respeto al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por darme la gran oportunidad de prepararme y realizar estudios de Maestría.

Al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT)

A la Universidad Autónoma del Estado de México.

A los profesores de mi comité académico:

En especial a mi consejero, Dr. Carlos De León por apoyarme y recibirme en su equipo de trabajo, cuando pensaba que nadie me recibiría. Mi más sincero agradecimiento y todo mi respeto por haber creído en mí y por su infinita paciencia conmigo. Por apoyarme en los momentos difíciles. Por todas sus enseñanzas e historias. Por su gran fortaleza y ejemplo de trabajo en el campo.

Dr. Cristian Nava Díaz por su ejemplo de sencillez, humildad y humanidad. Por siempre estar en la mejor disposición para ayudar y actitud positiva. Por su capacidad de transmitir su conocimiento de la manera más sencilla. Por sus palabras de ánimo y aliento, de siempre ir hacia adelante y trabajar lo mejor posible para obtener buenos resultados.

Dr. Ricardo Sánchez Pale por sus enseñanzas y conocimientos de campo.

A la Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce por todas sus atenciones y detalles, por poner el toque femenino al recibirme y darme mi espacio en su laboratorio, por siempre hacerme sentir cómoda y en confianza.

Dr. Sergio Aranda Ocampo por sus atenciones, consejos y acertadas sugerencias en la revisión de tesis.

A los doctores que fueron mis profesores porque cada uno transmitió sus conocimientos y experiencias y me dejaron muchas enseñanzas.

Al personal que conforman las secretarias de la Coordinación de Fitopatología en especial a Hilda y Michelle por su orientación y apoyo.

A mis compañeros que en alguna etapa me apoyaron y con los que pase momentos gratos, de estrés, de realizar prácticas de laboratorio y estudiar para exámenes, de diversión, etc. Adriana Pérez, Lolis Sanchez, Luis Aguilar (Chino), Gabriel Hernandez, Juan Manuel Tovar, Gil Olguín y Gregg Evans.

A mi familia.

DEDICATORIA

A mis padres ONESIMO MORENO RICO Y DORIS ELIZABETH MANZANO FLORES. Primeramente por darme la vida y porque ahora entiendo lo que es el Amor Incondicional gracias a ustedes, que siempre me han demostrado su cariño y apoyo sin importar mis defectos o virtudes, sin importar la distancia que exista entre nosotros, siempre los sentí cerca de mí, sin importar los momentos difíciles o alegres, nunca me han fallado. Ustedes son mi fortaleza, mi gran ejemplo de hacer siempre lo correcto y dar lo mejor de mí, de trabajo, de seguir adelante a pesar de los obstáculos y adversidades, de amor, de respeto. No puedo expresar en unas cuantas líneas el gran cariño y amor que les tengo ni tampoco mis agradecimientos. Son mi todo. Los amo.

A mi hermano ONED por escucharme siempre, por sus consejos y cariño, por hacerme reír cuando más lo necesito. Por todos los momentos que hemos pasado. A ti y a IRIS que ya es parte de esta pequeña gran familia, gracias por darme los dos más grandes y hermosos regalos para comprender el milagro de la vida, mis sobrinas SOFIA y SAMANTHA que me recuerdan lo lindo de la niñez, la inocencia, la simpleza, la alegría.

A mis Abuelos Lala y Ricardo, y a mis Tías, Ade, Oris, Vicky y Susy por ser ejemplo de mujeres trabajadoras, con valores. Por ser las mejores tías con las que tengo muy lindos y hermosos recuerdos, gracias por compartir su tiempo y lo mucho o poco que tienen conmigo.

A mi tía Isabel Moreno.

CONTENIDO

RESUMENiii
LISTA DE CUADROS Y FIGURASxii
LISTA DE FIGURAS.....	..xiii
1. INTRODUCCIÓN, REVISIÓN DE LITERATURA, ANTECEDENTES1
1.1. El hospedero: Maíz1
1.1.1. Producción de maíz en México.....	..2
1.2. La enfermedad: “diente de caballo”3
1.2.1. Clasificación del hongo4
1.2.2. Síntomas4
1.2.3. Signos del agente causal5
1.2.4. Importancia económica y control.....	..7
1.2.5. Propiedades del hongo <i>Claviceps sp.</i>8
1.2.6. Ciclo de Vida9
1.2.7. Requerimientos ambientales12
1.2.8. Estudios moleculares13
1.3. Producción de ascosporas en especies de <i>Claviceps</i>14
2. OBJETIVOS16
3. HIPÓTESIS16
4. MATERIALES Y MÉTODOS17
4.1. Pruebas de germinación de esclerocios.....	..17
4.1.1. Germinación en laboratorio17
4.1.2. Geminación en campo19
4.2. Observaciones de la descarga y producción de ascosporas.....	..21

4.2.1. Microscopio Óptico y Estereoscopio.....	21
4.2.2. Cortes histológicos de cabezuelas estromáticas.....	22
a) Con navaja de afeitar.....	22
b) Con micrótopo de rotación	22
4.3. Identificación morfológico-molecular de la especie <i>C. gigantea</i>	24
4.3.1. Estudios morfométricos	24
4.3.2. Estudios moleculares	24
4.4. Germinación de ascosporas en diferentes medios de cultivo	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1. Pruebas de germinación de esclerocios.....	27
5.1.1. Germinación en laboratorio	27
5.2. Germinación en campo.....	31
5.3. Identificación morfológico-molecular de la especie <i>C. gigantea</i>	39
5.4. Germinación de ascosporas en PDA.....	39
CONCLUSIONES	42
LITERATURA CITADA	43
ANEXOS	48

LISTA DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁG.
Cuadro 1.	Producción de maíz (riego y temporal) en México para el año 2010.	2
Cuadro 2.	Programa para amplificar la región conservada de <i>C. gigantea</i>	25

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁG.
Figura 1.	Mazorcas de maíz infectadas con <i>C. gigantea</i> . en una parcela del municipio Almoloya de Juárez, edo. de México, en donde se observa: A) la parte apical de la mazorca con los esclerocios que rompen las brácteas y B) el daño a los granos aledaños a los esclerocios.	5
Figura 2.	Diferentes formas y tamaños de esclerocios de <i>Claviceps gigantea</i> colectados en diferentes parcelas o localidades del estado de México.	6
Figura 3.	Esclerocio de <i>C. gigantea</i> donde se observa a) la germinación con formación de estípites y b) cabezas estromáticas. (Foto C. de León).	6
Figura 4.	Mapa de México donde se clasifican los estados por superficie sembrada de maíz grano.	7
Figura 5.	Ciclo de vida <i>C. purpurea</i> , modificado de Agrios (2005) para ejemplificar el de <i>C. gigantea</i> .	10
Figura 6.	Mapas de distribución de <i>C. gigantea</i> en el estado de México. Los patrones de color o forma representan las diferentes condiciones de temperatura y precipitación.	12
Figura 7.	a) Cladograma consenso estricto, resultado de la máxima parsimonia, donde se observa la relación entre las especies de <i>Claviceps</i> incluyendo a <i>C. gigantea</i> . AN = andopogonae. b) Mapa esquemático de la región ITS-rDNA de <i>C. gigantea</i> .	13

- Figura 8. Esclerocios de *C. gigantea* en cámaras húmedas con diferentes sustratos: a) tierra, b) carbón comercial, c) carbón residual, d) avena y e) sin sustrato (testigo). La germinación ocurrió en el tratamiento de carbón residual. **18**
- Figura 9. a). Armazones de madera donde se colocaron los esclerocios de *C. gigantea* para la germinación en campo y b) Portaobjetos con azul lactofenol en tapa del frasco PET. **19**
- Figura 10. Frascos invertidos donde se colocaron los esclerocios germinados para observar descarga de ascosporas. **21**
- Figura 11. a), b), c) y d) Esclerocios germinados de *C. gigantea* en carbón residual donde se observa que no todas las estructuras crecen al mismo tiempo, 1. estípites y 2. cabezuelas estromáticas bien desarrolladas. El largo de las estructuras fue de entre 0.2 y 3 cm a los 15 días después de la germinación. e) y f) cabezuelas estromáticas papiladas debido a que los ostiolos de los peritecios sobresalen de las cabezuelas, lo que indica que están maduros. **28**
- Figura 12. Germinación de esclerocios en campo, a) primordios de los estromas o de las cabezuelas estromáticas 64 días después del establecimiento en campo, b) estípites y cabezuelas estromáticas completamente formadas 23 días después (dd) de observar los primordios. **32**
- Figura 13. Descarga de ascosporas. a) cabezuelas estromáticas maduras en donde se observa la descarga de ascosporas, b) ascosporas capturadas en portaobjetos impregnados con azul de lactofenol. **34**

- Figura 14. Corte longitudinal con navaja de afeitar de una cabezuela estromática de *C. gigantea* a) peritecios en la periferia b) corte teñido con azul de algodón lactofenol donde se observan peritecios con ascas y ascosporas, c) parafises entre ascas con ascosporas, d) asca con ascosporas y e) ascosporas. **36**
- Figura 15. Cortes longitudinales de una cabezuela estromática con micrótopo utilizando parafina y teñidos con safranina y verde rápido. a) y b) Peritecios en una misma cabezuela estromática con diferentes grados de desarrollo. **37**
- Figura 16. Estromas de *C. gigantea* después de dos meses de germinación, en los que se inhibió el desarrollo y no alcanzaron su madurez. **38**
- Figura 17. Bandas de DNA total extraído de estromas (cabezuelas estromáticas y estípites) de *C. gigantea*. Carril M) marcador molecular; carriles 1 y 2) cabezuelas con pedazo de estípite lavados con jabón y desinfestados con NaClO, carril 3) cabezuela estromática desinfestada con Cl al 1.5% por 1 min. Carril 4 y 5) estípite desinfestado con Cl al 1.5% por 1 min. **40**

1. INTRODUCCIÓN, REVISIÓN DE LITERATURA, ANTECEDENTES

1.1. EL HOSPEDERO: Maíz

El maíz es uno de los tres granos básicos que alimentan a la humanidad. De acuerdo con Kato *et al.* (2009), su origen y diversificación inicial, fue en las montañas y valles de México desde donde se difundió a Europa a fines del siglo XV.

Zea mays L. pertenece a la familia Poacea (Gramíneas), tribu Maydea, siendo la única especie cultivada de éste género. Otras especies del género *Zea*, comúnmente llamadas teosinte, son formas silvestres parientes de *Zea mays* (Paliwal *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2009).

Este cultivo es de gran importancia económica a nivel mundial, ya sea como alimento para el hombre, para el ganado o como fuente de un gran número de subproductos industriales (más de 2000). La diversidad de los ambientes bajo los cuales es cultivado, es mucho mayor que la de cualquier otro cultivo pues, según Kato *et al.* (2009), se siembra en una gran variedad de regiones agroecológicas que van de altitudes de 0 hasta cerca de los 4 000 msnm, desde el ecuador hasta latitudes de 70° N y S en los dos hemisferios, en regiones de precipitación pluvial desde menos de 400 a los 3 000 mm, en suelos y climas muy variables.

El maíz es el único cereal que puede ser usado como alimento en distintas etapas fenológicas, desde las mazorcas muy jóvenes – “baby corn” –, hasta las mazorcas verdes tiernas y los granos ya maduros. La planta de maíz aún verde, cuando se cosechan las mazorcas tiernas o las mazorcas verdes, proporciona un excelente forraje (Paliwal *et al.*, 2001).

1.1.1. Producción de maíz en México

A nivel mundial, México ocupa el quinto lugar en producción de maíz, después de Estados Unidos de Norteamérica, China, Brasil y Argentina (FAO 2012). El Cuadro 1 muestra información acerca de la producción de maíz grano en 2012 en México (SIAP SAGARPA, 2012):

Cuadro 1. Producción de maíz (riego y temporal) en México para el año 2012				
Cultivo	Tipo/Variedad	Sup. sembrada (Ha)	Sup. cosechada (Ha)	Producción (Ton)
Maíz grano	Amarillo	344 686.20	341 478.13	1 765 571.02
	Blanco	6 959 980.09	6 518 366.3	20 179 483.19
	De color	60 051	56 974.4	93 531.16
	Pozolero	7 500.9	7 080.9	30 669.05
Maíz grano semilla		4 537	4 537	35 025.02

Un problema que enfrenta el cultivo del maíz en México es el exceso de la demanda doméstica sobre la oferta interna, atribuida en parte al crecimiento de la población, el crecimiento del ingreso *per capita*, el crecimiento del nivel de urbanización por el lado de la demanda y a un estancamiento en la productividad del cultivo por el lado de la oferta (Sain y Lopez, 1997). Otro aspecto importante que reduce la producción del maíz son las plagas y enfermedades. Entre éstas últimas las más importantes son el carbón de la espiga (*Sphaceloteca reiliana*), la pudrición de mazorca (*Fusarium* sp.), tizón (*Helminthosporium maydis*), la roya del maíz (*Puccinia sorghi*), entre otras (Programa de Maíz del CIMMYT, 2004).

1.2. LA ENFERMEDAD: “DIENTE DE CABALLO”

El “ergot” o cornezuelo es el nombre de la enfermedad de cereales y pastos causados por especies del género *Claviceps* y otros géneros relacionados. El ergot proviene del francés “argot” que significa espolon, ya que el cuerpo fructífero producido por estos hongos, crece en lugar de la semilla de la planta y deforma el grano hasta simular un espolon o un cornezuelo (Agrios, 2005).

En el valle de México, especialmente en el valle de Toluca una de las principales enfermedades que ataca al maíz es conocida como “diente de caballo”, ocasionada por el ascomiceto *Claviceps gigantea* (Fig. 1). Esta enfermedad fue reportada por primera vez en 1961 por Fuentes y De la Isla, cuando la observaron en Amecameca y Toluca en el Estado de México, así como en la Serranía Tarasca del Estado de Michoacán (Fuentes y De la Isla, 1961; Fuentes *et al.*, 1964 y White *et al.*, 2003). Según Agurell y Ramstad (1965) también se han colectado mazorcas afectadas en la base del volcán Popocatepetl, así como en una localidad con una altitud de aproximadamente 2600-2900 m. cerca del Popocatepetl y el Iztaccihuatl (Ullstrup, 1973). Hasta la fecha, se considera una enfermedad endémica con un nicho ecológico restringido (Ullstrup, 1973; Osada, 1984; Shelby, 1999 y White *et al.*, 2003).

En el campo, la enfermedad se presenta como un abultamiento en la parte apical de las mazorcas casi maduras (Fig. 1), aunque Osada (1984) menciona que también se presenta en mazorcas tiernas al palparlas. Fuentes y De la Isla, (1961) además de encontrar la enfermedad en maíces pertenecientes a las razas Cónico, Chalqueño y Cacahuacintle, lo encontraron en teocintle (*Euclaena mexicana* Schrad) en la región de Amecameca.

1.2.1. Clasificación del hongo

El hongo en estudio pertenece a:

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Claviceps*.

1.2.2. Sintomas

Al final del ciclo vegetativo del cultivo se observa que en la parte apical de las mazorcas uno o varios granos han sido reemplazados por estructuras fungosas de color café claro llamadas esclerocios (Fig. 1). Estas estructuras de resistencia del hongo rompen las brácteas de la mazorca en la parte apical y es por esto que se asoman al exterior (Fuentes y De la Isla, 1961 y Osada, 1984).

Aunque generalmente los granos afectados son los del extremo superior de la mazorca, al abrir las brácteas se observa que también lo pueden ser los de la base (Fuentes y De la Isla, 1961) y del resto de la mazorca. También se observa que los granos cercanos a los esclerocios presentan un desarrollo y apariencia anormal. Moreno y Fucikovsky (1972) y Osada (1984), mencionan que dependiendo de la posición y el número de esclerocios de *C. gigantea* en la mazorca de maíz, pueden dañar en menor o mayor grado el desarrollo de los granos cercanos, los que pierden su apariencia normal volviéndose arrugados y algunos de coloración diferente (Fig. 1).



Figura 1. Mazorcas de maíz infectadas con *C. gigantea*. en una parcela del municipio Almoloya de Juárez, edo. de México, en donde se observa: A) la parte apical de la mazorca con los esclerocios que rompen las brácteas y B) el daño a los granos aledaños a los esclerocios.

1.2.3. Signos del agente causal.

En 1964, Fuentes y colaboradores aislaron el hongo en cultivo puro y demostraron la patogenicidad, inoculándolo en maíz y reaislandolo. En este mismo año, lo describieron por primera vez y propusieron el nombre binomial *Claviceps gigantea*, una nueva especie (Fuentes *et al.*, 1964). Los signos o partes del hongo que se observan en la enfermedad son los esclerocios que se tornan color gris a café oscuro con la edad, el interior es de color rosa a lavanda, es variable en tamaño y forma (de hasta 8 x 5 x 1.5 cm) y con frecuencia tienen forma de coma o diente de caballo, dichos esclerocios sustituyen a los ovarios en *Zea mays* (Fig. 2).

Los esclerocios germinan formando estípites que sostienen cabezuelas estromáticas (Fig. 3), que tienen una apariencia punteada debido a que los peritecios sobresalen ligeramente. Los peritecios son de forma de botella, embebidos y dispuestos en la

periferia de la cabezuela estromática, contienen ascas cilíndricas, hialinas y ascosporas filiformes, hialinas no septadas.



Figura 2. Diferentes formas y tamaños de esclerocios de *Claviceps gigantea* colectados en diferentes parcelas o localidades del estado de México.

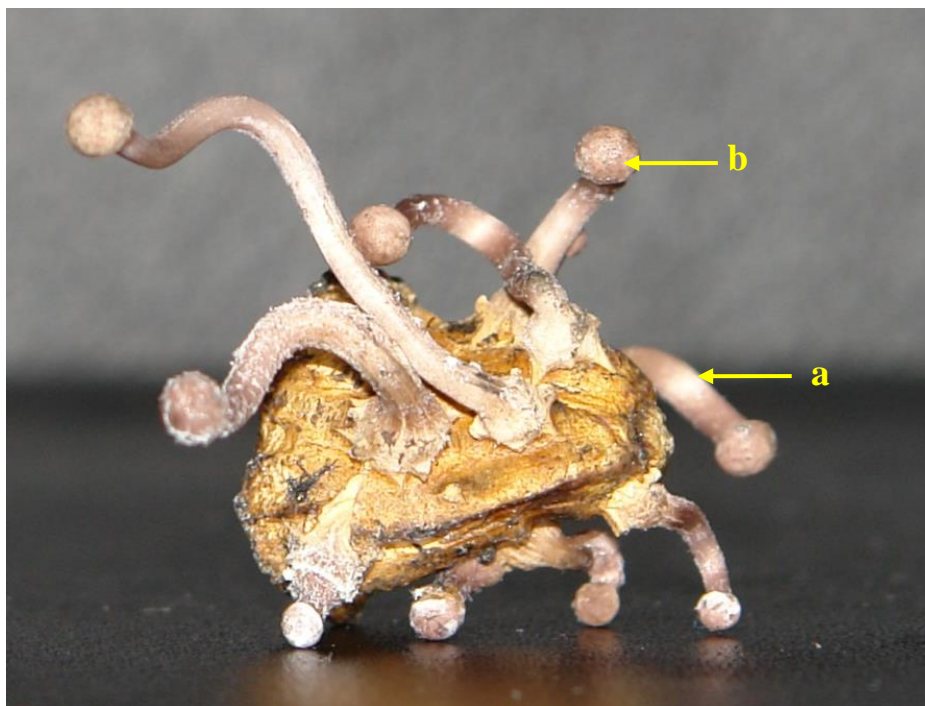


Figura 3. Esclerocio de *C. gigantea* donde se observa a) la germinación con formación de estípites y b) cabezas estromáticas. (Foto C. de León).

1.2.4. Importancia económica y control

La enfermedad del diente de caballo se encuentra presente en el Valle de Toluca, México, uno de los estados que tiene la mayor superficie sembrada de maíz grano (Fig. 4) (INEGI, 2011). Esta enfermedad puede reducir significativamente la producción de grano, puesto que cada grano sano es afectado al ser reemplazado por un esclerocio afectando el rendimiento de la mazorca con la enfermedad.

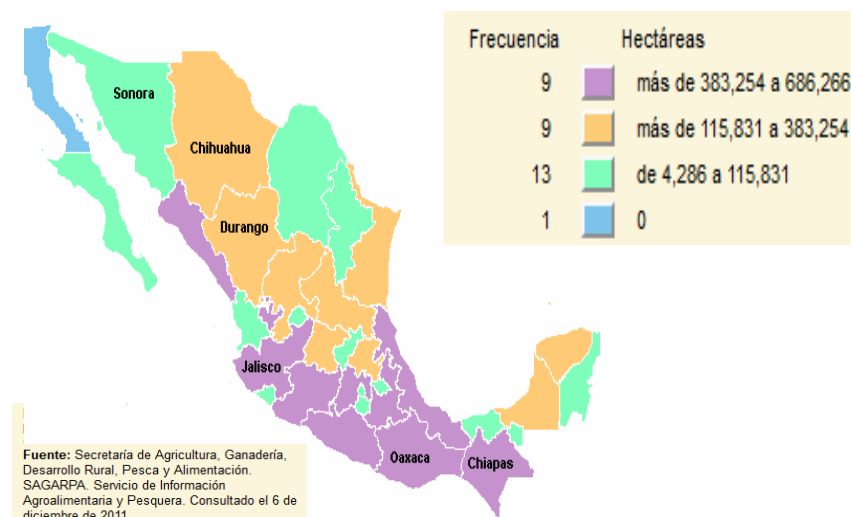


Figura 4. Mapa de México donde se clasifican los estados por superficie sembrada de maíz grano.

Según Fucikovsky y Moreno (1971) un esclerocio presente en la base de la mazorca de maíz es suficiente para reducir la germinación de los granos de la mazorca afectada hasta en aproximadamente 50% (Figura 1). Fuentes *et al.*, (1964) encontraron que en algunos campos cerca del 40% de las plantas eran afectadas por éste patógeno, sin embargo, reportes recientes e información personal proporcionada por los agricultores de las zonas afectadas, señalan haber tenido pérdidas de hasta 90% de la producción total.

Aunque Ullstrup (1973) menciona que los esclerocios de *C. gigantea* no contienen alcaloides tóxicos como aquellos asociados a *C. purpurea*, pruebas sanitarias han demostrado que el daño principal es que el grano no es apto para consumo humano o animal, al menos que los esclerocios y granos de la mazorca infectada sean removidos, ya que pueden contener sustancias tóxicas (Agrios, 2005).

El inóculo primario se puede disminuir colectando y destruyendo los esclerocios que son fácilmente detectados durante la cosecha. Esto se puede hacer cuando el maíz se colecta a mano (Fucikovsky y Moreno, 1971). Sin embargo, muchos esclerocios de *C. gigantea* permanecen en el campo (White *et al.*, 2003).

1.2.5. Propiedades del hongo *Claviceps sp.*

Los esclerocios del género *Claviceps* spp. contienen un número de potentes alcaloides y otros compuestos biológicos activos que afectan principalmente el cerebro y el sistema circulatorio de animales de sangre caliente que lo consumen. El alcaloide mejor conocido es el LSD o dietilamida de ácido lisérgico utilizado como alucinógeno que se popularizó en la década de los 1960. Según Osada (1984), los habitantes del México prehispánico conocieron a *C. gigantea* con el nombre de “cinnanacatl” que significa “hongo del maíz”, el cual tenía propiedades alucinógenas a diferencia del “cuitlacoche” (*Ustilago maydis*).

Los alcaloides de los esclerocios de este género también se utilizan en medicina por su propiedad vaso constrictora para parar hemorragias en los partos y accidentes (Agrios, 2005). Agurell *et al.* (1963), mencionan que los hongos del género *Claviceps* se pueden dividir en dos grupos, un grupo grande que sintetiza tanto alcaloides de tipo péptido-clavinas y un grupo pequeño que produce exclusivamente alcaloides de tipo clavinas. Los esclerocios del “diente de caballo del maíz” según Agurell *et al.* (1963) y Agurell y

Ramstad (1965), contienen alcaloides tipo clavina que con la festuclavina son procesadas por laboratorios destinados a la producción industrial de alcaloides para uso terapéutico (Malinka, 1999).

Para observar los efectos que causa la ingesta de los esclerocios de *C. gigantea* en animales, Osada (1984) cita varios casos en referencia a la toxicidad de éste hongo, como son: a) la incorporación de esclerocios molidos al alimento para aves que realizaron Fucikovsky, Cuca y Avila, resultó en una disminución de peso y emplume anormal semejante al que se produce cuando hay deficiencia de zinc o calcio en la dieta, b) extractos acuosos de esclerocios de *C. gigantea* que Lorenzana y Fucikovsky dieron a perros y conejos, demostraron que tienen propiedades de vaso constrictor, lo que produjo síntomas como dificultad respiratoria y movimientos sin coordinación de los músculos de las piernas, c) la ingesta de esclerocios finamente molidos junto con la dieta, interrumpía el embarazo en las hembras de ratones blancos, aumentaba la mortandad de las crías e inhibía la hipertrofia mamaria en las hembras y, d) el caso de una persona que por curiosidad ingirió cinco esclerocios frescos preparados en quesadillas, que tuvieron un buen sabor pero que después de media hora de ingerirlos padeció vómito convulsivo, reportado por Fucikovsky y Moreno.

1.2.6. Ciclo de vida

Aunque no se tiene información exacta del ciclo de vida de ésta especie, se supone que es muy parecido al de *Claviceps purpurea*, especie representativa de la familia de los Clavicipitaceae. A continuación se presenta la descripción del ciclo de vida señalado por Agrios (2005) con algunas modificaciones realizadas con información conocida de *C. gigantea* (Fig. 6).

El estado anamorfo de *C. gigantea* suponen De la Isla y Fuentes (1963), es el hongo *Sphacelia* sp. Los ovarios de las flores del maíz son infectadas por los conidios de *Sphacelia* sp. y el micelio forma un esporodoquio que a su vez forma conidióforos y conidios (haploide).

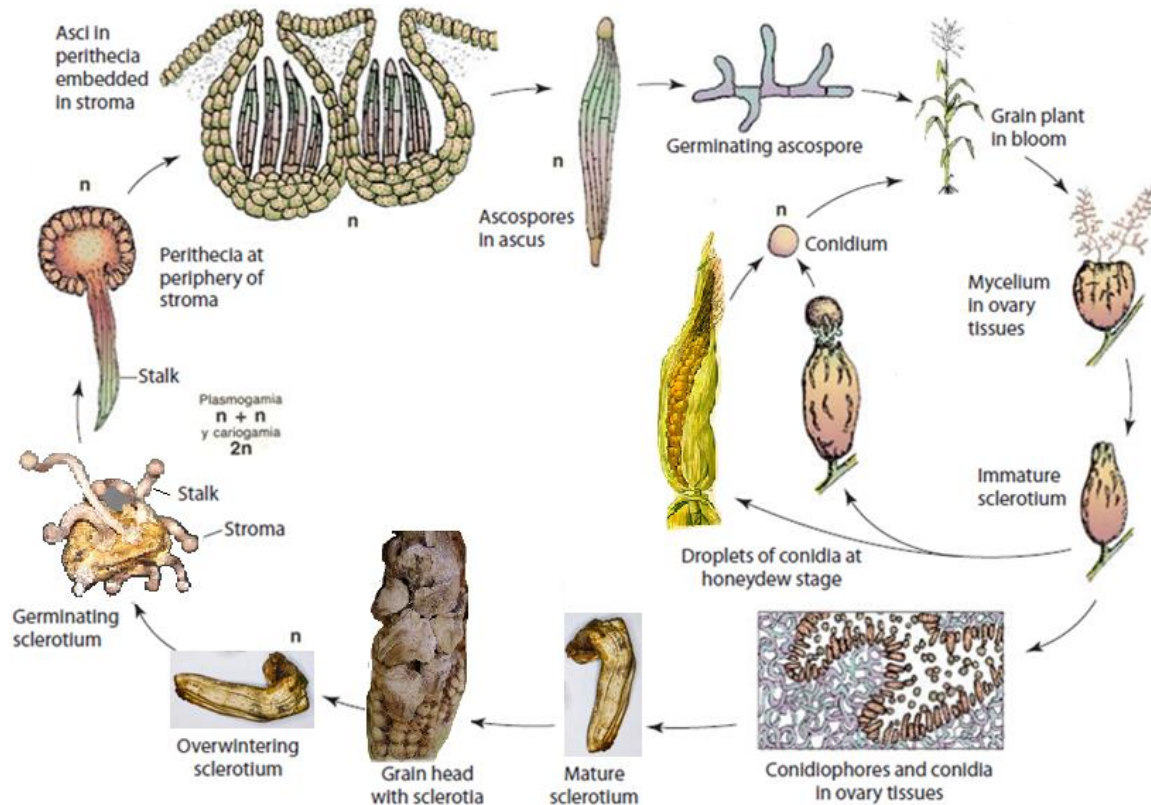


Figura 5. Ciclo de vida *C. purpurea* modificado de Agrios (2005) para ejemplificar el de *C. gigantea*.

Los conidios germinan y penetran al estigma. Estos conidios se forman en una secreción azucarada que, según Osada (1984), Fucikovsky menciona la posibilidad de que atrae a los insectos y estos los diseminan. Sin embargo, White *et al.* (2003), mencionan que el estado conidial del hongo está completamente envuelto en las hojas, por lo que la mielecilla con los conidios no está disponible para que los insectos la diseminan. Los

conidios son transportados por aire o agua de lluvia a otras flores en cuyos ovarios germinan dispersando la enfermedad y completándose el ciclo asexual.

La fase teleomorfica se inicia después de la infección de los ovarios, en los que el hongo crece y se endurece para formar un esclerocio ligeramente curvo dando la apariencia de un diente de caballo. Los esclerocios caen al suelo y permiten sobrevivir al hongo durante varios meses hasta el nuevo ciclo de siembra de maíz. En presencia del cultivo y de condiciones ambientales favorables, los esclerocios germinan (micelio haploide). El micelio desarrollado a partir de los esclerocios originan pedicelos o estípites en cuyo ápice se forma un estroma esférico. En el estroma se forman peritecios, cada uno con un ascogonio y un anteridio. El anteridio fertiliza al ascogonio por contacto gametangial y ocurre la plasmogamia. Posteriormente, ocurre la cariogamia (unión o fusión de núcleos) originando núcleos diploides en el ascogonio. Finalmente, durante la ascogénesis (formación de ascas y ascosporas), los núcleos diploides se dividen por meiosis y con una división mitótica se forman 8 núcleos haploides, cada uno de los cuales formará una ascospora.

Los peritecios se desarrollan en la periferia del estroma y en su interior se forman ascas con ascosporas. Entre las ascas se forman parafisos que son hifas estériles. Las ascosporas maduran en las ascas y son liberadas a través del ostíolo del peritecio. Las ascosporas son transportadas por aire o agua de lluvia, llegan a los estigmas de los jilotes donde germinan e infectan a los ovarios iniciándose nuevamente el ciclo.

1.2.7. Requerimientos ambientales

Fuentes y De la Isla (1961), reportaron que la enfermedad del “diente de caballo” del maíz se desarrolla en localidades que se encuentran a una altitud de más de 2000 msnm, húmedos y con clima frío. Fucikovsky y Moreno (1971), mapearon la distribución de *C. gigantea* en maíces nativos en diferentes condiciones climáticas en el Estado de México (Fig. 6), encontrando que la presencia del hongo es favorecida por una temperatura promedio anual de 13-15°C y una precipitación anual de mas de 1000 mm. Debido a que los requerimientos para el desarrollo del hongo solo se cumplen en estos nichos ecológicos, la enfermedad hasta el momento se considera endémica de México (Ullstrup, 1973; White *et al.*, 2003).

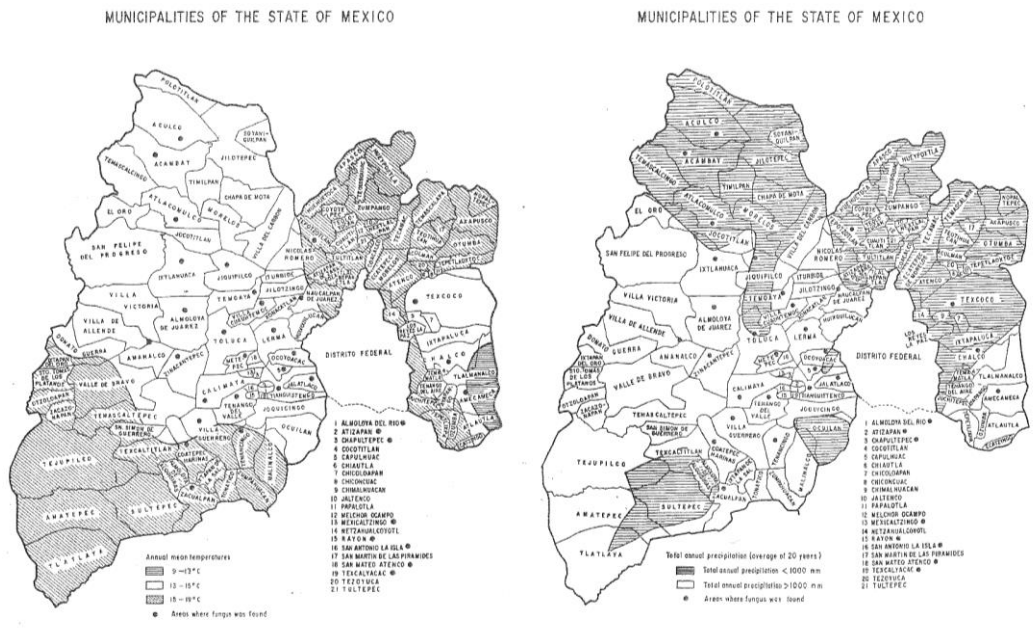


FIGURE 1. Zones of annual mean temperature on three levels in the State of Mexico.

FIGURE 2. Zones of total annual precipitation for the last 20 years on two levels in the State of Mexico.

Figura 6. Mapas de distribución de *C. gigantea* en el estado de México. Los patrones de color o forma representan las diferentes condiciones de temperatura y precipitación.

1.2.8 Estudios moleculares

Pazoutová y Parbery (1999) y White *et al.* (2003), han realizado estudios de *C. gigantea* utilizando RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms). Se ha observado que en estudios de relaciones evolutivas, *C. gigantea* se encuentra en un grupo junto con las tres especies que parasitan sorgo, *C. africana*, *C. sorghi* y *C. sorghicola*. En este mismo grupo se encuentran *C. gigantea* y *C. africana*, especies que producen alcaloides derivados del esqueleto de la dihidroergolina (Pazoutová, 2001).

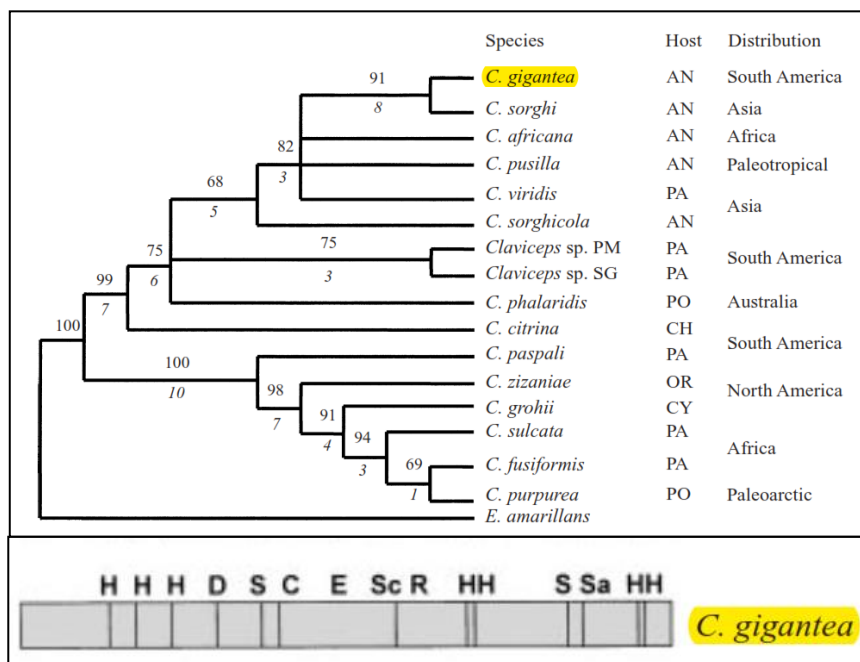


Figura 7. a) Cladograma consenso estricto, resultado de la máxima parsimonia, donde se observa la relación entre las especies de *Claviceps* incluyendo a *C. gigantea*. AN = andopogonae. b) Mapa esquemático de la región ITS-rDNA de *C. gigantea*.

1.3 Producción de ascosporas en especies de *Claviceps*.

Para la germinación de los esclerocios en condiciones de laboratorio, se han llevado a cabo diferentes pruebas. De la Isla y Fuentes (1963) y Fuentes *et al.* (1964), obtuvieron la germinación desinfectando superficialmente los esclerocios en solución de hipoclorito de sodio al 1% y colocándolos sobre arena estéril húmeda en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Los sometieron alternadamente, por varios meses, a temperaturas relativamente bajas de 4°- 12°C y a temperaturas ambientales de laboratorio. Según Fuentes *et al.* (1964), el mejor procedimiento para la germinación es un pretratamiento a 4°C por 8 días y con una temperatura de 18°C induciendo la germinación de esclerocios a los 45 días.

Agurell *et al.* (1963), germinaron los esclerocios después de varios meses alternando condiciones de temperatura y luz: 16 hs expuestos a 12°C seguido por 8 hs entre 22°- 26°C en luz difusa. Se ha demostrado por Osada (1984) y Osada *et al.* (1986) que los esclerocios de *C. gigantea* no requieren de un pretratamiento de baja temperatura para germinar, pero si induce la germinación en menor tiempo e incrementa el número de estípites producidos.

Con el fin de obtener información sobre la producción y el patrón de liberación de ascosporas, se han realizado diversas pruebas en diferentes especies de *Claviceps* como: *C. purpurea*, *C. fusiformis* y *C. paspali*. Según Loveless y Peach (1986), la duración de la descarga de ascosporas varía entre especies pero es de aproximadamente 2 semanas.

En el caso de *C. purpurea*, Cooke y Mitchell (1967) trabajaron en la observación de las ascosporas adhiriendo esclerocios germinados del hongo a la tapa de una caja de Petri con resina. En el fondo de cada caja colocaron 2 ml de agua destilada y cambiaron la base de la caja de Petri con agua en intervalos de 24 hrs. Los estromas descargaron las

ascosporas en el agua y estas se contaron utilizando un citómetro. Mantle y Shaw (1976), también fijaron esclerocios germinados de *C. purpurea* en la tapa de una caja de Petri poco profunda, para probar la eyección de ascosporas. Los estromas estuvieron invertidos y las ascosporas expulsadas cayeron sobre un portaobjetos. La expulsión de ascosporas la observaron como un depósito blanco lechoso sobre el portaobjetos debajo de cada cabezuela estromática. También, se han examinado al microscopio electrónico de barrido, cabezas estromáticas completas o secciones de *C. purpurea* (Colotelo y Cooke, 1977). Mientras que Cunfer y Seckinger (1977), examinaron microscópicamente peritecios de *C. purpurea* y *C. paspali* para observar la presencia de ascas con ascosporas maduras y su viabilidad en PDA.

Con el microscopio estereoscópico Prakash *et al.* (1983), observaron cabezuelas estromáticas de *C. fusiformis* mostrando las puntas de las ascas y ascosporas que salían o eran expulsadas por los ostiolos de los peritecios. Thakur *et al.* (1984), realizaron observaciones en el microscopio compuesto de las secciones o cortes longitudinales de las cabezuelas estromáticas de *C. fusiformis*, las cuales revelaron numerosos peritecios piriformes embebidos en el tejido somático de la región periférica. Los peritecios piriformes se observaron con ascas intercaladas con parafisos emergiendo a través de los ostiolos. Las ascas contenidas en los peritecios se observaron largas con un poro apical. Las ascosporas fueron atrapadas con cinta adhesiva, en portaobjetos con vaselina y exponiendo cajas de Petri con PDA. Todas las cajas con PDA expuestas a los esclerocios germinados, mostraron numerosas ascosporas. Cuatro días después de la incubación a 25°C apareció un micelio blanco y la esporulación ocurrió 7 días después de la incubación al observarse macroconidios.

Debido a la carencia de estudios sobre *C. gigantea* y la necesidad de conocer el ciclo de vida para diseñar estrategias de control, se planteó la siguiente investigación con los siguientes objetivos:

2. OBJETIVOS

1. Determinar el tiempo de germinación de los esclerocios y la formación de peritecios, ascas y ascosporas de *C. gigantea* bajo las condiciones de laboratorio y campo.
2. Observar la germinación de esclerocios en diferentes sustratos bajo condiciones de laboratorio.
3. Determinar la temperatura y humedad relativa en que se producen las ascosporas.
4. Estudiar el proceso de germinación de ascosporas.
5. Identificar el patógeno por medios morfológicos y moleculares causante del diente de caballo en maíz en el valle de Toluca.

3. HIPÓTESIS

1. Existen diferencias en el tiempo para que ocurra la germinación de esclerocios y la formación de peritecios, ascas y ascosporas bajo las condiciones de laboratorio y campo.
2. Se observará la germinación de los esclerocios y producción de ascosporas.
3. La producción y germinación de ascosporas está relacionada con baja temperatura y alta humedad relativa.
4. La germinación de ascosporas se observará *in vitro* en medio de cultivo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Pruebas de germinación de esclerocios

4.1.1. Germinación en laboratorio

Para inducir la germinación de esclerocios en laboratorio, se utilizaron esclerocios colectados en los municipios de Almoloya de Juárez (19° 33' 01'' N - 99° 56' 13'' O), Calimaya (19° 10' 25'' N - 99° 37' 02'' O) y Villa Victoria (19°26'00'' N - 100° 00' 00'' O) durante Noviembre - Diciembre del 2012. Los esclerocios colectados fueron almacenados en cuarto frío a 4°C durante 6 semanas. En pruebas preliminares, los esclerocios se colocaron en excremento de pato, vaca y borrego, se dejaron en cámara húmeda pero los esclerocios se degradaron.

Posteriormente, varios de estos se eligieron por forma y tamaño homogéneo para lavarlos con detergente en polvo, desinfectados con hipoclorito de sodio (NaClO) 5% por 2 min, enjuagados 3 veces con agua destilada y secados sobre papel secante durante 24 hs.

Frascos de polietileno tereftalato (PET) de 500 ml se desinfectaron con alcohol y se les añadieron 70, 35, 20 y 40 gr respectivamente (para que todos tuvieran una basa de sustrato de aproximadamente 3 cm) de cada uno de los siguientes sustratos: a) tierra, b) carbón comercial, c) carbón residual, d) avena y un testigo sin sustrato (Fig. 8).

Tres esclerocios se colocaron en cada sustrato. Los frascos fueron incubados en cuarto frío a 4°C durante 6 meses, debido a que diferentes autores (Mitchell y Cooke, 1968; Osada, 1984; Osada *et al.*, 1986; Van der Linde y Wehner, 2007) coinciden en que para acelerar el proceso de germinación, se necesita exponer los esclerocios a un periodo de baja temperatura. Después de este período, los frascos fueron colocados a temperatura ambiente (22-24°C) y monitoreados diariamente para registrar la germinación.

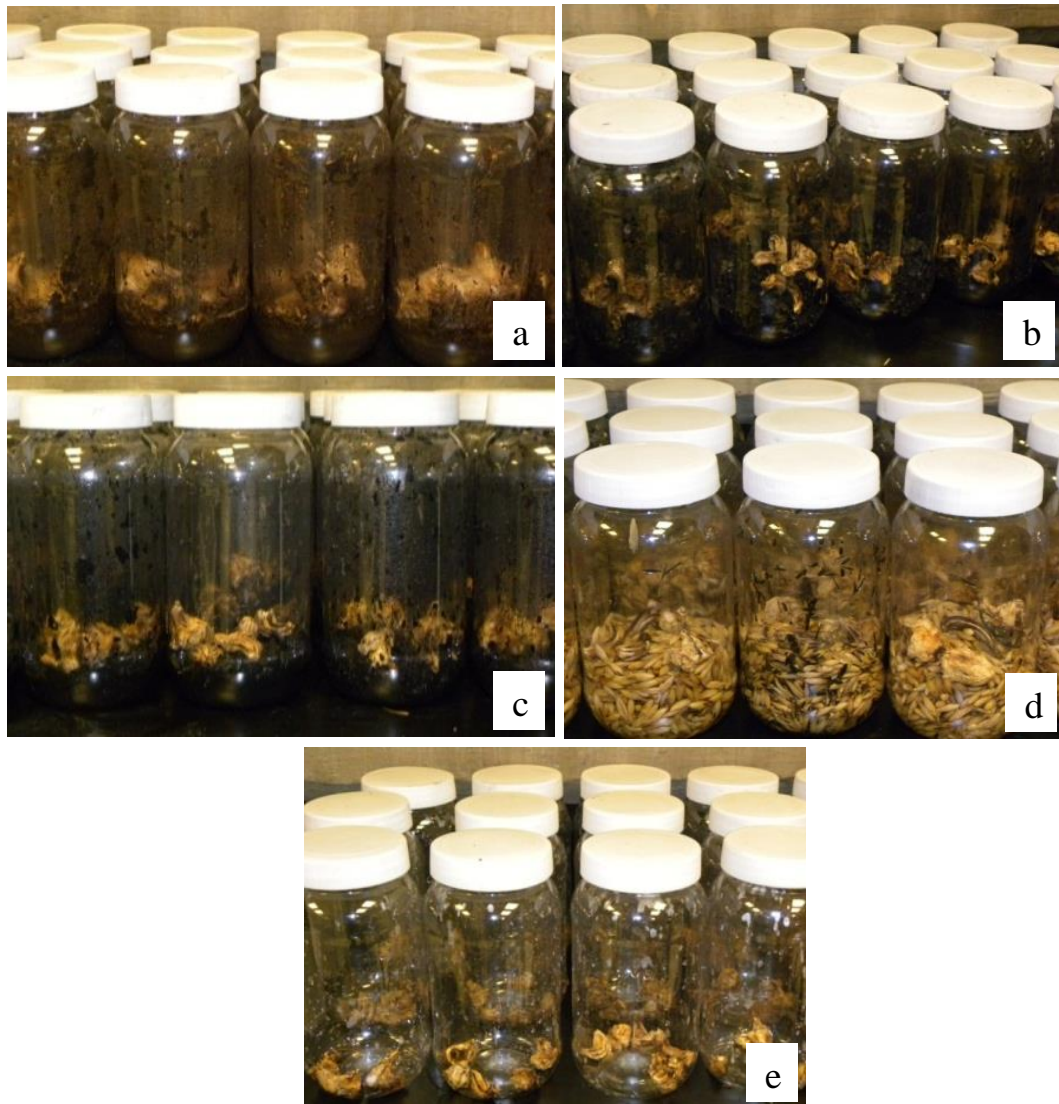


Figura 8. Esclerocios de *C. gigantea* en cámaras húmedas con diferentes sustratos: a) tierra, b) carbón comercial, c) carbón residual, d) avena y e) sin sustrato (testigo). La germinación ocurrió en el tratamiento de carbón residual.

En el experimento se utilizó un diseño factorial donde el sustrato y tiempo de incubación a 4°C fueron los factores. Cada tratamiento se estableció con tres repeticiones. La unidad experimental la constituyó un frasco cilíndrico que contenía el sustrato con tres esclerocios. El experimento completo se repitió una vez.

4.1.2 Germinación en campo.

Ubicación del área de estudio.

Para observar la germinación en campo, a mediados de Junio de 2013, los esclerocios almacenados a 4°C durante seis meses se colocaron en el rancho “El Rosedal”, ubicado en el kilómetro 13.5 carretera Toluca – Atlacomulco, municipio de Atlacomulco, Méx. (19° 24’ 19.28’’ N y 99° 43’ 12.84’’ O), cuando el cultivo de maíz (ASPROS H8) tenía 3 semanas de siembra. Los esclerocios se colocaron sobre la tierra de cultivo dentro de cuatro armazones de 40x40x40 cm con paredes de malla de alambre (1 cm²) con el propósito de evitar que roedores destruyeran los esclerocios (30 esclerocios por armazón) (Fig.9).

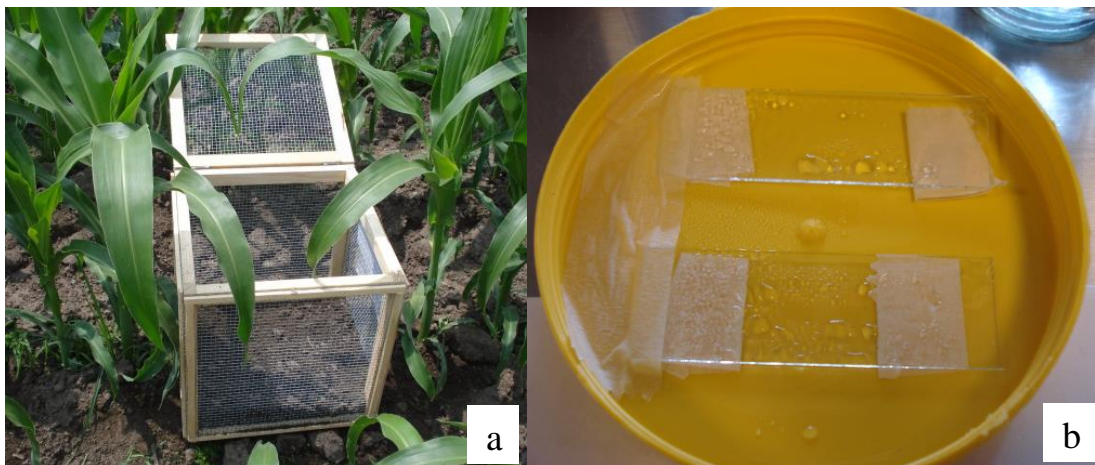


Figura 9. a). Armazones de madera donde se colocaron los esclerocios de *C. gigantea* para la germinación en campo y b) Portaobjetos con azul lactofenol en tapa del frasco PET.

Los esclerocios se revisaron cada semana para observar la germinación en condiciones naturales. Una vez germinados, los esclerocios se colectaron en un frasco de PET de 2 L con aproximadamente 3 cm de suelo en la base del frasco para ser llevados a las

instalaciones del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Montecillo, México y así poder observar diariamente el desarrollo de los estípites y cabezuelas.

Los datos climatológicos se obtuvieron de la estación Arroyo en el municipio Almoloya de Juárez en el Estado de México ($19^{\circ} 24' 34.92''$ N, $99^{\circ} 44' 12.12''$ O) que pertenece a la Red nacional de estaciones del INIFAP.

4.2. Observaciones de la descarga y producción de ascosporas.

4.2.1. Microscopio Óptico y Estereoscopio.

Para observar la descarga y producción de ascosporas, los esclerocios germinados en estípites y cabezuelas estromáticas se observaron cada 2 hs con ayuda de un microscopio estereoscopio (Olympus SZ modelo: SZ2-ILST). Con la finalidad de registrar la descarga de esporas durante la noche, en la tapa del frasco de PET donde se tenían los esclerocios germinados se colocaron 2 portaobjetos (Corning 75 mm x 25 mm) cubiertos con azul de lactofenol que fueron remplazados cada 8 hs.

Otro grupo de esclerocios con estípites fueron fijados con paraplast en el fondo de recipientes de plástico de 7.5 x 6.5 cm. El recipiente fue invertido de tal manera que las cabezuelas estromáticas quedaron orientadas hacia abajo (Fig. 10). Justo debajo de ellas, se colocó una caja de Petri de 6 mm de diámetro con 6 ml de agua destilada estéril (ADE) para que en caso de que las cabezuelas expulsaran ascosporas, éstas cayeran dentro de la caja Petri con agua. El agua de las cajas de Petri se revisó al microscopio compuesto y cambió cada 24 hs.

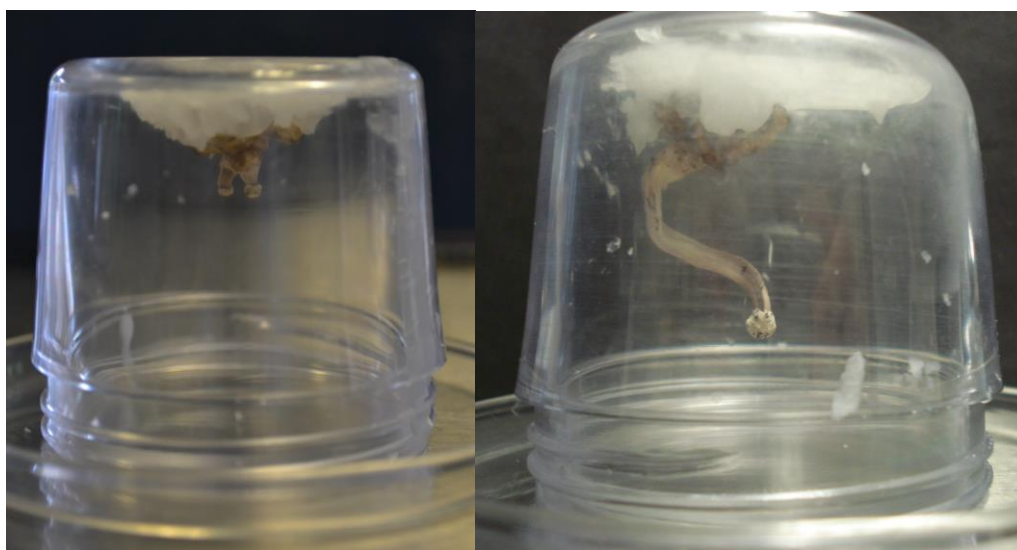


Figura 10. Frascos invertidos donde se colocaron los esclerocios germinados para observar descarga de ascosporas.

4.2.2. Cortes histológicos de cabezuelas estromáticas.

a) Con navaja de afeitar

Con la finalidad de observar el desarrollo del peritecio, ascas y ascosporas, se realizaron cortes histológicos a mano con navaja de afeitar a intervalos periódicos de tiempo de los esclerocios germinados. Los cortes obtenidos se colocaron entre porta y cubreobjetos con azul de algodón lactofenol y se observaron utilizando un fotomicroscopio III Carl Zeiss con una cámara digital PAXcam3.

b) Con micrótopo de rotación

Las cabezuelas de los esclerocios germinados se colectaron cada tres días, se cortaron en mitades longitudinales y se realizaron cortes con un micrótopo de rotación (American Optical Co.) de 10 μ de grosor. Se fijaron en FAA (formaldehído – ácido acético glacial – alcohol) por 24 hs (Kulkarni, 1963). Las muestras se enjuagaron con agua corriente por 20 min para eliminar el fijador y se deshidrataron en una serie de etanoles (10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100%) por 3 hs en cada concentración. La deshidratación continuó colocando las muestras en una solución de alcohol etílico 100% con xilol 1:1, para pasar a xilol, en los que se dejaron 3 hs y finalmente incluir el tejido en parafina por 48 hs. El tejido con parafina se colocó en un bloque que se adhirió a un bloque de madera que sirvió como soporte para realizar los cortes con el micrótopo y colocarlos en portaobjetos.

La parafina se eliminó de los cortes colocando los portaobjetos en una estufa a 57°C durante 25 min y se colocaron en un recipiente con xilol. Se realizaron dos cambios de xilol, un cambio de xilol-etanol 100% y finalmente un cambio en etanol 96% con la finalidad de rehidratar el tejido, cada cambio por 3 min. Para teñir los tejidos, se dejaron los cortes en safranina por 24 hs, se lavó el exceso de colorante con agua corriente y se

añadió al tejido unas gotas de solución de etanol 96% más ácido pícrico. Después, se colocaron gotas de etanol 96% y amoniaco, seguido de etanol absoluto (100%), verde rápido, aceite de clavo y por último unas gotas de una mezcla de aceite de clavo, xilol y etanol absoluto, dejando 10 seg. en cada solución. Los cortes se colocaron en xilol para finalmente montarlos en bálsamo de Canadá (López *et al.*, 2005). Después de secarlos durante dos o tres días, se observaron al microscopio compuesto.

4.3. Identificación morfológico-molecular de la especie *C. gigantea*

4.3.1 Estudios morfométricos.

Las ascosporas capturadas en los portaobjetos con azul de lactofenol fueron fotografiadas y medidas utilizando un microscopio óptico (VELAB modelo: VE-B6) equipado con una cámara digital Moticam 2300 (3.0 M Pixel USB 2.0) y el software de procesamiento de imágenes Motic MC Camara 1.1. Las medidas del largo y ancho de las ascas, ascosporas y peritecios se evaluaron en una muestra de 30 individuos y las dimensiones fueron comparadas con las reportadas en la literatura.

4.3.2 Estudios moleculares.

A partir de las cabezuelas y estípites se realizó extracción del ADN del hongo. Estas estructuras se lavaron con detergente, se desinfectaron y se dejaron en refrigerador por una semana. Otras estructuras se cortaron de esclerocios recién germinados y se desinfectaron con hipoclorito de sodio 1.5%. La extracción se realizó con el mini kit de QIAGEN DNeasy Plant Minikit (50) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante (Dneasy® Plant Handbook, 2012). Para verificar la extracción de ADN total, las muestras se colocaron en un gel de agarosa 1% y se sometieron a electroforesis a 88 volts por 30 min para observar el ADN. El ADN total extraído se mandó a Macrogen Inc., Korea, donde por PCR se realizó la amplificación de la región genómica que contiene ITS1, 5.8S rDNA y ITS2 utilizando los primers ITS1 (5´TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3´) e ITS 4 (5´TCCTCCGCTTATTGATATGC 3´) (White *et al.*, 1990; Glass y Donaldson, 1995). El programa de amplificación consistió de 32 ciclos bajo el siguiente régimen de temperatura (Pazoutová, 2001):

Cuadro 2. Programa para amplificar la región conservada de <i>C. gigantea</i>			
Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos (número)
Desnaturalización	95	180	1
Alineación	55	30	1
Extensión	72	60	1
Desnaturalización	95	30	30
Alineación	55	30	30
Extensión	72	60	30
Desnaturalización final	95	30	1
Alineación final	55	30	1
Extensión final	72	600	1
Conservación	4	Infinito	1

Los fragmentos amplificados fueron secuenciados en Korea (Macrogen Inc.) y las secuencias obtenidas fueron depositadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) para posteriormente compararlas con las disponibles en el banco de datos utilizando la herramienta nucleotide BLAST.

4.4 Germinación de ascosporas en diferentes medios de cultivo

Para verificar el crecimiento *in vitro* del hongo, cabezuelas estromáticas que se observaron en plena descarga de ascosporas se lavaron con detergente en polvo, se enjuagaron y se desinfectaron con hipoclorito de sodio 1.5% por 2 min. Posteriormente, en condiciones asépticas las cabezuelas estromáticas fueron cortadas con navaja de afeitar en secciones finas y los cortes colocados sobre un portaobjetos con agua destilada estéril. Con el microscopio se verificó la presencia de ascosporas y con ayuda de una pipeta Pasteur la muestra fue dividida en dos partes iguales. Una parte fue sometida a calor (50°C por 3 min), mientras que la otra no tuvo tratamiento térmico. Dos gotas de la suspensión de esporas de cada tratamiento fueron colocadas en los siguientes medios de cultivo PDA (Papa dextrosa agar, Bioxon), AHM (Agar harina de Maíz, Bioxon), EMA (extracto de malta agar, Difco), Agar-agar (Difco), Agar-agar con dextrosa (Difco) y Agar (Difco) con una mezcla de granos de maíz frescos y estigmas. El experimento se estableció utilizando un diseño factorial (medio de cultivo y tratamiento con calor a 50°C), con tres repeticiones. Las cajas se incubaron a 22°C y se revisaron diariamente. El experimento se repitió 2 veces.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Pruebas de germinación de esclerocios

5.1.1 Germinación en laboratorio

Los análisis estadísticos demostraron que existen diferencias altamente significativas en uno de los tratamientos. El carbón residual tuvo una media de 1.66 esclerocios germinados a diferencia de los otros tratamientos.

La germinación de esclerocios se observó únicamente en el tratamiento que contenía carbón residual en la base del frasco PET y en el que se colocaron los esclerocios que permanecieron sobre este sustrato durante seis meses a 4°C y dos meses a 22 – 24°C (Fig. 11) a partir de esclerocios colectados a fines del ciclo anterior. Al parecer la variación en tamaño y profundidad de colocación, parcial o completa de los esclerocios, no mostraron una diferencia en la germinación, tal como reportan Thakur *et al.* (1984) con *C. fusiformis*.

El 55.5% de los esclerocios germinaron en este tratamiento. En *C. purpurea* Hadley (1968), reporta una germinación del 50%. En campo, el porcentaje de esclerocios germinados fue de 46.6%. Estos promedios de germinación son bajos, pero coincide con lo reportado por Pazoutová *et al.* (2011), quienes mencionan que la inducción para la formación de cabezuelas estromáticas es difícil en la mayoría de las especies de *Claviceps* ya que requieren de diferentes tratamientos para eliminar la dormancia.

En *C. fusiformis*, Thakur *et al.* (1984) reportaron un porcentaje de 12-52% a los 12 meses de incubación. Van der Linde y Wehner (2007), reportaron una germinación del 66% esclerocios de *C. cyperii*. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que estos datos pertenecen a especies diferentes de *Claviceps* y cada autor realizó la germinación en diferentes ambientes. Los porcentajes de germinación más altos se han obtenido en

esclerocios de *C. sorghicola* con un valor de 70% (Tsukiboshi *et al.*, 1999) y 80% de germinación de esclerocios de *C. africana* (Frederickson *et al.* 1991).



Figura 11. a), b), c) y d) Esclerocios germinados de *C. gigantea* en carbón residual donde se observa que no todas las estructuras crecen al mismo tiempo, 1. estípites y 2. cabezuelas estromáticas bien desarrolladas. El largo de las estructuras fue de entre 0.2 y 3 cm a los 15 días después de la germinación. e) y f) cabezuelas estromáticas papiladas debido a que los ostiolo de los peritecios sobresalen de las cabezuelas, lo que indica que están maduros.

Mitchell y Cook (1968), mencionan que los tratamientos a bajas temperaturas son el estímulo para activar la germinación o para romper la dormancia de los esclerocios en *C. purpurea*, sometiéndolos inicialmente a un período de absorción de agua. La activación de la germinación por bajas temperaturas tiene tres consecuencias importantes en los procesos fisiológicos del esclerocio, incrementando la absorción del agua proveniente del medio ambiente, incrementando la tasa de respiración y aumentando el metabolismo de los lípidos almacenados. La presencia de lípidos en el esclerocio sugiere que inmediatamente después, o durante el tratamiento de activación por frío, se activan enzimas hidrolíticas para la hidrólisis de lípidos. Estudios preliminares sugieren que la aparición de este sistema de enzimas es responsable para la conversión de lípidos a manitol (Mitchell y Cook, 1968). Con respecto a estos cambios fisiológicos en la reservas de los esclerocios, Osada (1984), reporta que “la trealosa fue la principal fuente energética durante el proceso de germinación de los esclerocios de *C. gigantea* y el manitol fue translocado del esclerocio al estroma a través del estípite, posiblemente para ser utilizado en la producción de sus estructuras reproductivas”.

En las condiciones del presente trabajo el tratamiento en frío y la humedad provista simulan las condiciones naturales en las que se encuentran los esclerocios en campo facilitando su germinación. Por ejemplo, al final de la cosecha del maíz, los esclerocios caen al suelo entre el otoño y el invierno. Desde el otoño hasta primavera, los esclerocios están expuestos a bajas temperaturas y heladas frecuentes. Terminando éste período, las temperaturas y humedad aumentan y el hospedante se encuentra disponible. Es también notable que el único sustrato que resultó en esclerocios germinados fue el carbón residual. Según Villamagua *et al.* (2008), el carbón vegetal contiene varios elementos que pueden actuar como nutrientes en la germinación de los esclerocios como

Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Magnesio, Azúfre, Boro, Zinc, Cobre, Hierro, Manganeso, materia orgánica y un pH conductivo de 9.5. Oguntunde *et al.* (2004), mencionan que en campos con cultivo de maíz se ha observado que los residuos de carbón mejoran la fertilidad en suelo, así como la incorporación y retención de nutrientes. Además de que puede afectar de manera positiva la germinación de las semillas, el crecimiento del cultivo y la producción.

En el presente trabajo los esclerocios produjeron de tres a nueve primordios, siendo el promedio de cinco por esclerocio (Fig. 11). Los esclerocios germinados tuvieron una longitud promedio de 2.2 cm, con variación de 0.2 a 10.7 cm. Según Cooke y Mitchell (1967), la infectividad de una población de esclerocios depende del número de estromas que es capaz de producir y esto se relaciona con el tamaño del esclerocio, en los que entre mayor sea más estromas será capaz de producir debido a la mayor cantidad de reservas. Tsukiboshi *et al.* (1999) reportan que los esclerocios de *C. sorghicola* produjeron de uno a cuatro estromas, mientras que el mayor número de estromas producidos por esclerocio es de 16 en *C. fusiformis* (Thakur *et al.*, 1984).

Los primordios de las cabezuelas estromáticas se observaron cómo protuberancias globosas de color claro emergiendo de los esclerocios. Al ir creciendo, las protuberancias se constriñeron en la base para formar el cuerpo del estípite. En la punta del estípite se formaron las cabezuelas estromáticas que maduraron después de 15 (laboratorio) – 23 (campo) días después de la aparición de los primordios (Fig. 12). El proceso de madurez fue notable con un cambio en la coloración observado (de café a oscura) y a la presencia de puntos o papilas que correspondían a los ostiolos de los peritecios inmersos en la cabezuela de la que sobresalen ligeramente (Fig. 11). Estas

observaciones son similares al proceso de germinación de esclerocios de *C. purpurea* descritas por Hadley (1968). Loveless y Peach (1986) y Tsukiboshi *et al.* (2001) quienes también reportaron observaciones parecidas en cabezuelas estromáticas maduras de *C. purpurea*, *C. sorghicola* y *C. africana*.

En el presente estudio los esclerocios germinados mostraron que no todas las cabezuelas estromáticas ni los estípites se producen ni maduran al mismo tiempo tal como reporta Cook y Mitchell (1967) y Lutrell (1977) en *C. purpurea* y *C. paspali*, respectivamente.

Para lograr la germinación de esclerocios de otras especies de *Claviceps*, varían los sustratos, condiciones de temperatura y tiempo. El período más corto para la germinación de esclerocios en laboratorio es de 15 días después de que se sacan del tratamiento en frío, lo que está reportado para *C. purpurea* y *C. setariicola* (Cooke y Mitchell, 1967; Loveless y Peach, 1986; Pazoutová *et al.*, 2011). Por el contrario, los esclerocios que requieren de mayor tiempo para germinar en condiciones de laboratorio son los de *C. fusiformis*, los que, aunque a las 4 semanas se observaron los primeros indicios de germinación, algunos de los esclerocios germinaron después de 56 semanas y los de *C. gigantea* que requieren de aproximadamente 12 meses (Agurell *et al.*, 1963; De la Isla y Fuentes, 1963; Fuentes *et al.*, 1964; Thakur *et al.*, 1984).

5.1.2 Germinación en campo.

Los primordios de la germinación de los esclerocios se observaron 64 días después de que estos se colocaron en el campo (Fig. 12). Las estructuras completamente desarrolladas se encontraron a los 23 días después de que se observaron los primordios

(Fig. 12). Autores como Cunfer y Seckinger (1977), también han probado la germinación de los esclerocios en campo para exponerlos a condiciones naturales y observar el efecto en estas estructuras.

El promedio de los datos climatológicos a partir de que se colocaron los esclerocios en el campo hasta que se observaron completamente desarrollados fueron: temperatura promedio de 14.07°C, humedad relativa de 76.19% y una precipitación acumulada de 704.6 mm durante el ensayo (Junio – Septiembre 2013). Se registró una humedad relativa promedio anual de 65.26% y una precipitación acumulada total de 832.8 mm. La temperatura coincide con los rangos de temperatura registrados por Fucikovsky y Moreno (1971), quienes reportan una temperatura anual en el municipio de Almoloya de Juárez de 13-15°C, pero se presentaron valores diferentes en la precipitación anual, ya que en el presente estudio se registraron 832.8 mm y los autores registraron 1000 mm. Cooke y Mitchell (1967), mencionan que en la naturaleza, transcurre aproximadamente una semana desde los inicios de la germinación de los esclerocios de *C. purpurea* a la maduración de los estromas.

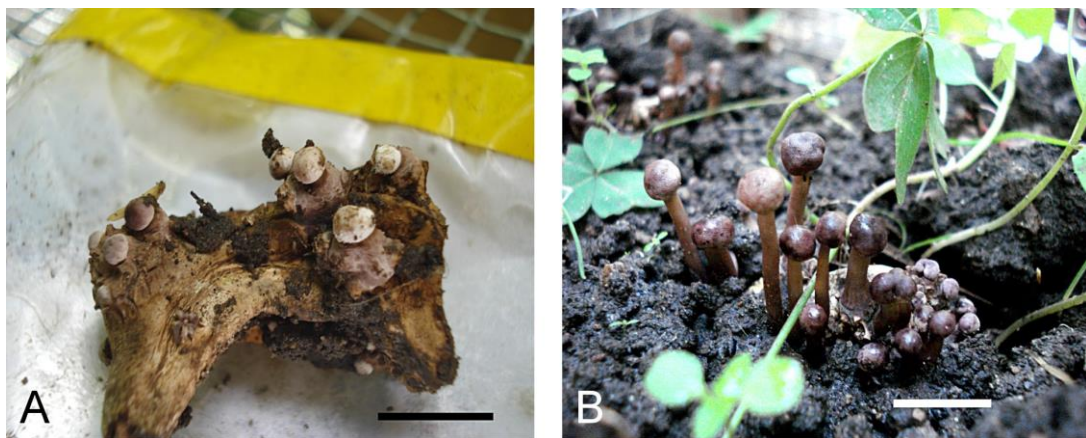


Figura 12. Germinación de esclerocios en campo, A) primordios de los estromas o de las cabezuelas estromáticas 64 días después del establecimiento en campo, B) estípites y cabezuelas estromáticas completamente formadas 23 dd de observar los primordios.

Cooke y Mitchell (1967), mencionan que en la naturaleza, el tiempo que transcurre desde los inicios de la germinación de los esclerocios de *C. purpurea* a la maduración de los estromas es de aproximadamente una semana, sin embargo, los resultados en el presente trabajo mostraron que para *C. gigantea* el período de germinación en campo es de 23 días.

En el presente trabajo se observó que la germinación de los esclerocios varía en condiciones de laboratorio y de campo, posiblemente se explica ya que la temperatura y humedad relativa así como la luz del ambiente natural son factores muy importantes que contribuyen en la germinación. Hadley (1968) trabajando con *C. purpurea*, propone que la elongación de los estípites ocurre en la ausencia de luz (no fototrópico) al estar enterrados en el suelo. Sin embargo, no se inhibe en presencia de luz, por lo que la humedad puede estar relacionada y es determinante en la longitud de los estromas. En la naturaleza, una cabezuela que surge de un esclerocio enterrado puede continuar alargándose después de que alcanza la superficie del suelo hasta que su ápice alcanza una cierta longitud dependiendo del gradiente de humedad. La humedad también se puede relacionar con la expulsión o descarga de ascosporas, pues según especulación de Luttrell (1977), los ascomicetos que expulsan las ascosporas poseen mecanismos de turgencia y la activación de estos probablemente se rigen por la humedad. Esto puede ser de gran importancia en términos biológicos pues es una ventaja que las ascosporas sean expulsadas cuando se presenta alta humedad relativa y la superficie de los estigmas está expuesta y receptiva.

5.2. Observación de la descarga y producción de ascosporas.

a) Estereoscopio.

El fenómeno de la descarga o expulsión de ascosporas se observó en cabezuelas estromáticas maduras con ayuda de un estereoscopio Olympus y grabó en video con una cámara Sony Cyber-shot (modelo: DSC-W120).

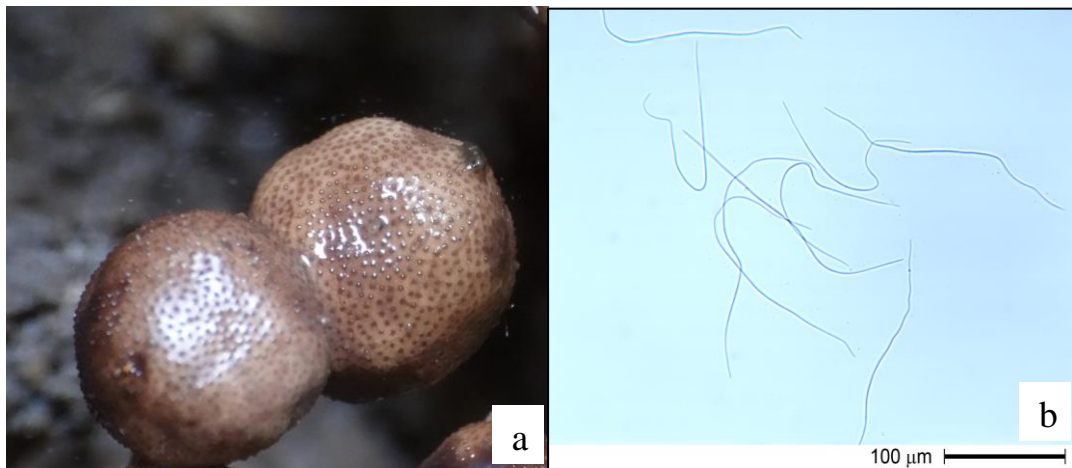


Figura 13. Descarga de ascosporas. a) cabezuelas estromáticas completamente maduras en donde se observa la descarga de ascosporas, b) ascosporas capturadas en portaobjetos impregnados con azul de lactofenol.

La liberación de ascosporas se confirmó observando portaobjetos con azul de lactofenol al microscopio óptico, los que presentaban ascosporas adheridas después de que fueron expulsadas de las cabezuelas estromáticas (Fig. 13).

En el video se puede observar que los poros apicales de las ascas surgen a través del ostiolo de los peritecios que sobresalen de las cabezuelas estromáticas y en una rápida explosión las 8 ascosporas eran expulsadas al aire con fuerza a través del poro apical.

Al respecto, existen reportes de Loveless y Peach (1986), quienes mencionan que inclusive a simple vista se pueden observar las ascosporas de *C. purpurea*, que aparecen en el aire sobre la cabezuela estromática. Luttrell (1977) y Prakash *et al.* (1983),

observaron la descarga de ascosporas de *C. paspali* y *C. fusiformis* directamente con un microscopio, enfocando en los ápices u ostiolos de los peritecios. Pazoutová y Parbery (1999), también observaron las puntas de las ascas emergiendo del ostiolo.

Según Loveless y Peach (1986), los ascomicetos pueden descargar las ascosporas ya sea expulsándolas al aire a una distancia de varios centímetros o son lentamente exudadas en una masa mucilaginosa que se acumula alrededor del ostiolo. Con esta información, se puede asegurar que en el caso de *C. gigantea*, a pesar de que entre las cabezuelas estromáticas y la tapa del frasco donde se colocaron los portaobjetos con azul de lactofenol había una distancia de aproximadamente 10 cm, las ascosporas lograron adherirse a los portaobjetos.

Luttrell (1977), menciona que al parecer la dispersión de las ascosporas es debido a la expulsión de las mismas y no al transporte por insectos. En condiciones de humedad adecuadas las ascosporas se descargan por presión quedando suspendidas en el aire. En estudios con ascosporas Prakash *et al.* (1983), mencionan que en *C. fusiformis*, las ascosporas tienen la capacidad de producir conidios, lo que ayuda a incrementar la carga de inóculo primario en el campo y también a prolongar la duración de vida. Las ascosporas pueden caer en el suelo u otros restos vegetales en el campo y en condiciones de humedad estas pueden producir conidios que tal vez infectan a las flores.

Loveless y Peach (1986), mencionan que la vida funcional de un estroma maduro en *C. purpurea* se puede equiparar con el periodo de descarga de ascosporas pero que la duración de la descarga de las ascosporas es variable entre las especies.

b) Cortes histológicos de cabezuelas estromáticas.

Con navaja de afeitar

Se cortaron secciones longitudinales de las cabezuelas estromáticas las cuales revelaron numerosos peritecios piriformes embebidos en la región periférica del tejido somático. Los peritecios se observaron con las ascas entremezcladas con parafisos. Se observó que los cuellos y ápices de los peritecios llegan a la superficie de la cabezuela estromática (Fig. 14).

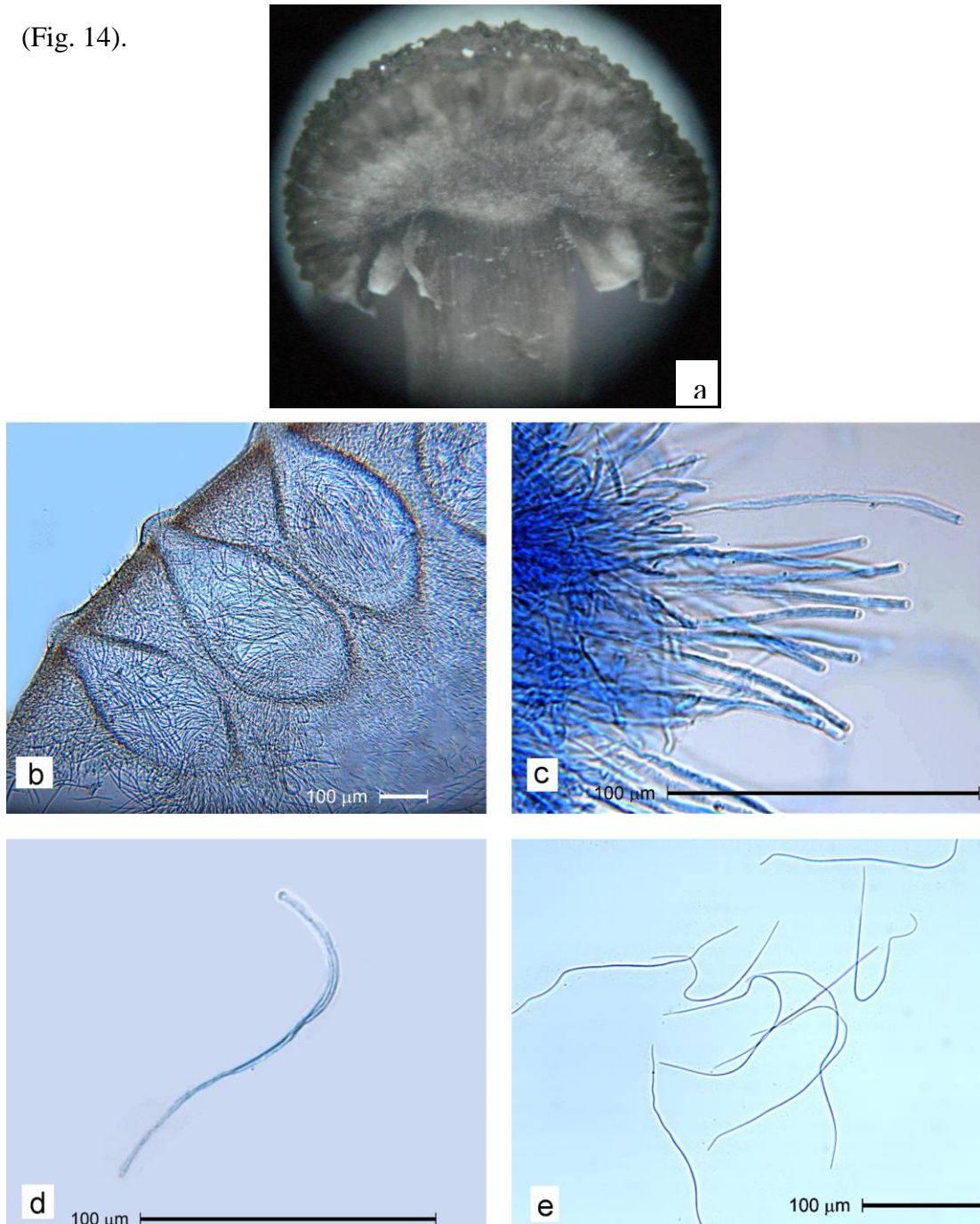


Figura 14. Corte longitudinal con navaja de afeitar de una cabezuela estromática de *C. gigantea* a) peritecios en la periferia b) corte teñido con azul de algodón lactofenol donde se observan peritecios con ascas y ascosporas, c) parafises entre ascas con ascosporas, d) asca con ascosporas y e) ascosporas.

Con micrótopo de rotación

Las preparaciones que se obtuvieron de cortes longitudinales mostraron el interior de las cabezuelas estromáticas con peritecios arreglados en la periferia y tejido estromático en el centro. En estas preparaciones, se observó que la mayoría de los cuellos de los peritecios no han alcanzado la periferia y los ostiolos no se han formado ni están en contacto con el exterior.

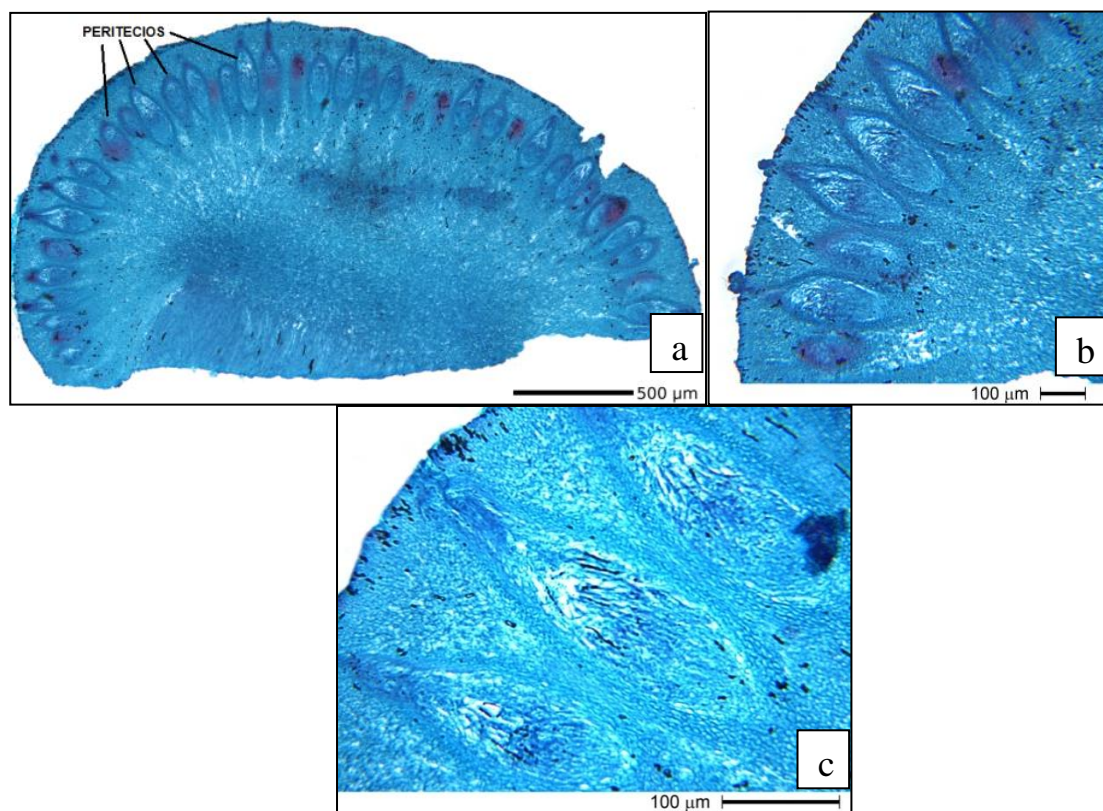


Figura 15. Cortes longitudinales de una cabezuela estromática con micrótopo utilizando parafina y teñidos con safranina y verde rápido. a) y b) Peritecios en una misma cabezuela estromática con diferentes grados de desarrollo.

Al respecto, Pazoutova y Parbery (1999) mencionan que el tamaño y forma de los peritecios dependen del grado de su madurez. Los peritecios jóvenes son pequeños oblongos a ovals, mientras que los maduros generalmente son elipsoides a piriformes,

por lo que se puede suponer que las estructuras observadas no estaban maduras (Fig. 15). Esto es una prueba más de que los primordios de un esclerocio no germinan ni maduran al mismo tiempo, sino que algunos estromas se desarrollaron más rápido que otros, inclusive algunos alcanzan su madurez cuando otros apenas comienzan a germinar, lo que concuerda con lo que reportan Cook y Mitchell (1967) y Lutrell (1977) en *C. purpurea* y *C. paspali*, respectivamente.

c) Descarga de ascosporas

No fue posible obtener ascosporas suspendidas en el agua destilada estéril ni de los esclerocios que comenzaban a germinar, ni de los que ya se encontraban en una etapa más avanzada de desarrollo. Por lo tanto, no fue posible hacer evaluaciones cuantitativas de la descarga de ascosporas. Se observó que, una vez que los estromas germinados y diferenciados en estípites y estroma tomaban un color oscuro y una apariencia rugosa, no seguían su desarrollo normal (Figura 16).



Figura 16. Estromas de *C. gigantea* después de dos meses de germinación, en los que se inhibió el desarrollo y no alcanzaron su madurez.

5.3. Identificación morfológico-molecular de la especie *C. gigantea*

a. Estudios morfométricos

Las observaciones de la morfología y la germinación de los esclerocios no difirieron en tamaño y forma a la descripción original (Fuentes *et al.*, 1964) particularmente en la forma y tamaño de los esclerocios en que se reportan medidas promedio de 8 x 5 cm. Sin embargo, en los ejemplares utilizados, los peritecios midieron de 404.9 – 569.3 μm x 151.3 – 284.4 μm , con ascas de 187 – 255.3 μm , que contenían 8 ascosporas de 169.6 – 263.7 μm x 1.0 – 2.1 μm . Las dimensiones de la mayoría de las estructuras observadas fueron mayores a las reportadas por Fuentes *et al.* (1964). con peritecios de 338-444 x 152-164 μ , ascas de 187-201 x 4.5-4.7 μ y ascosporas de 176 – 186 μm x 1.5 μm

Se eligió medir estos caracteres pues según varios autores la longitud de las ascosporas filiformes del género *Claviceps* es un carácter taxonómico confiable, siempre y cuando se midan después de que sean expulsadas del asca (Loveless, 1964; Pazoutová y Parbery, 1999). El tamaño de los peritecios en las especies de *Claviceps* sp. es considerado otro criterio taxonómico confiable porque es uno de los caracteres más constantes de un estroma maduro (Loveless, 1967), mientras se espera que existan diferencias en el tamaño de los demás componentes, ya que al ser estructuras fungosas tienden a encogerse por la deshidratación al ser manipuladas.

El tamaño y forma de los peritecios dependen del grado de su madurez. Los peritecios jóvenes son pequeños oblongos a ovals, mientras que los completamente maduros generalmente son elipsoides a piriformes, por lo que deben medirse al estar maduros. Las medidas de las ascas no se tomaron pues, según Loveless (1964), considera el largo de las ascas un criterio poco fiable debido a que en un solo peritecio pueden existir ascas en diferentes estados de madurez y por lo tanto diferente longitud, además que los estados de madurez son difíciles de determinar.

b. Estudios moleculares.

El análisis de la secuencia de la región parcial del gen 18s, ITS1 completo, 5.8s completo, ITS completo y parcial del 28s mostró que las cuatro secuencias (no de acceso: KJ543564, KJ543565, KJ543566 y KJ543567) tienen un porcentaje de identidad mayor al 92% con el aislamiento publicado en el banco de genes (AJ133394.2). Los resultados demostraron que dos de las cuatro muestras tuvieron un porcentaje de identidad del 99% con la especie *C. gigantea* mientras que las restantes tuvieron un 98% y un 92% de porcentaje de identidad.

En la presente investigación fue necesario extraer los ácidos nucleicos de cabezuelas o estípites ya que ninguno de los aislamientos en medio de cultivo fue exitoso. Mediante el protocolo descrito con el minikit para la extracción del ADN de las cabezuelas estromáticas y estípites, de las cinco muestras procesadas se pudo obtener un buen producto de ADN total en cuatro de las muestras (Fig. 17).

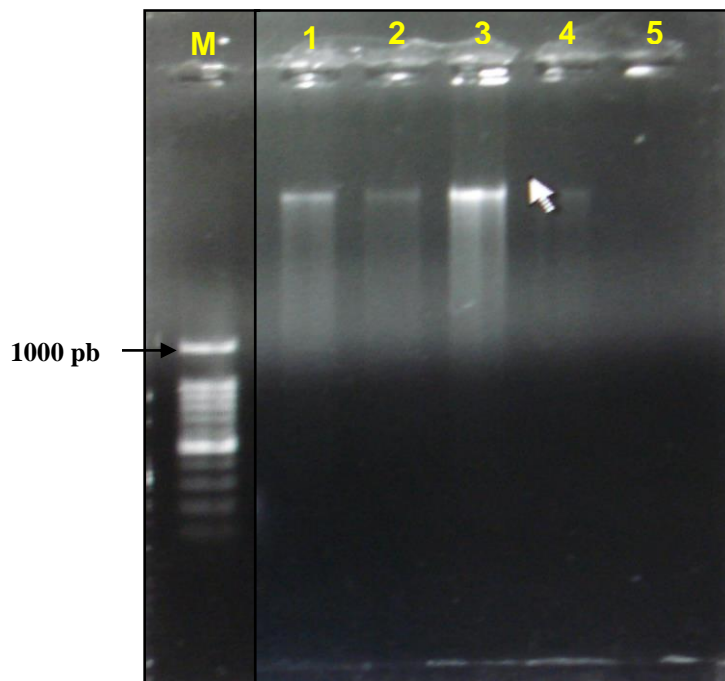


Figura 17. Bandas de DNA total extraído de estromas (cabezuelas estromáticas y estípites) de *C. gigantea*. Carril M) marcador molecular, carril 1 y 2) cabezuelas con pedazo de estípite lavados con jabon y desinfectados con NaClO, carril 3) cabezuela estromática desinfectada con Cl al 1.5% por 1 min. Carril 4 y 5) estípite desinfectado con Cl al 1.5% por 1 min.

No existen evidencias de que otro autor haya obtenido ADN a partir de cabezuelas o estípites, pues el ADN de las especies de *Claviceps* se extrae a partir de micelio liofilizado o a partir de micelio que creció en medio sintético como PDA (Pazoutová, 2001, Pazoutová *et al.*, 2011).

5.4. Germinación de ascosporas en PDA

En ninguno de los medios probados en este estudio (PDA, AHM, EMA, AA, AAD y Agar-Maíz) donde se colocaron las ascosporas del hongo fue posible observar su germinación y desarrollo. El tratamiento térmico a 50°C tampoco fue eficiente en romper la dormancia e inducir la germinación de estas. El estímulo de los nutrientes del hospedante tampoco fue eficaz en su germinación. Deacon (2006) menciona que es necesario algún estímulo, i. e. presencia de carbohidratos, choques de calor, etcétera, etc, para romper la dormancia de las ascosporas e inducir su germinación, sin embargo, en este trabajo, ninguno de los sustratos utilizados indujo la germinación de las ascosporas.

CONCLUSIONES

1. Se determinó que el mejor sustrato para la germinación de esclerocios, formación y desarrollo de las estructuras sexuales fue el carbón residual.
2. Los esclerocios colectados en el ciclo de cultivo de noviembre-diciembre 2012 y conservados a 4°C durante seis meses y a 22-24°C durante 2 meses colocados sobre carbón residual en laboratorio o suelo en campo germinaron formando cabezuelas estromáticas y estípites.
3. Los primordios y cabezuelas estromáticas producidas en un mismo esclerocio no germinan, desarrollan ni maduran al mismo tiempo.
4. Los estudios morfométricos de los peritecios, ascas y ascosporas, así como los análisis del ADN extraído a partir de las cabezuelas estromáticas y estípites confirmó que la especie aquí estudiada es *C. gigantea*.
5. Se reportan las secuencias, obtenidas de los análisis de ADN en el Banco de Genes.
6. No se observó la germinación de las ascosporas en ninguno de los medios de cultivo utilizados en este estudio.

LITERATURA CITADA

- Agrios, N. G. 2005. Plant Pathology. 5a ed. Elsevier. USA. 922 p.
- Aguirell, S. L., E. Ramstad and A. J. Ullstrup. 1963. The alkaloids of maize ergot. *Planta Med.* 11: 392-398
- Aguirell, S. and E. Ramstad. 1965. A new ergot alkaloid from Mexican maize ergot. *Acta Pharma. Suecica* 2: 231-237
- Colotelo, N. and Cook, W. 1977. Perithecia and spore liberation of *Claviceps purpurea*: scanning electron microscopy. *Can. J. Bot.* 55: 1257-1259.
- Cooke, R. C. and Mitchell, D. T. 1967. Germination pattern and capacity for repeated stroma formation in *Claviceps purpurea*. *Trans. Br. mycol.* 50: 275-283.
- Cunfer, B. M. and Seckinger, A. 1977. Survival of *Claviceps purpurea* and *C. paspali* sclerotia. *Mycologia.* 69 (6): 1142-1148.
- Deacon, J. W. 2006. Fungal biology. 4ª edición. Blackwell publishing. England.
- De la Isla, Ma. L. y Fuentes, S. F. 1963. Germinación de esclerocios de *Sphacelia* sp., causante del “Diente de caballo” en el maíz. *Agricultura Técnica.* 3: 119.
- Dneasy plant handbook Qiagen. 2012. Protocolo del proveedor
- Disponible en: <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=en> pag 22-25
- Consultado 31 de enero del 2014
- FAOSTATS (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2012
- Disponible en http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/rankings/countries_by_commodity/E
- Consultado el 31 de enero del 2014.

- Frederickson, D. E., Mantle, P. and De Milliano, W. A. J. 1991. *Claviceps africana* sp. nov.; the distinctive ergot pathogen of sorghum in Africa. Mycol. Res. 95: 1101-1107
- Fucikovsky, L. y M. Moreno. 1971. Distribution of *Claviceps gigantea* and its percent attack on two lines of corn in the State of México, México. Plant Disease Rep. 55: 231-233.
- Fuentes, S. F. y De la Isla, Ma. de L. 1961. Una enfermedad desconocida del maíz el “Diente de caballo”. Agricultura técnica. 12: 11-12.
- Fuentes, S. F., De la Isla, M. de L., Ullstrup, A. J. and A. E. Rodriguez. 1964. *Claviceps gigantea*, a new pathogen of maize in México. Phytopathology 54: 379-381.
- Glass, N. L. and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 61:1323-1330.
- Griffin, D. H. 1994. Fungal physiology. 2a ed. Wiley-Liss publication. USA.
- Hadley, G. 1968. Development of stromata in *Claviceps purpurea*. Trans. Br. mycol. 51: 763-769.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). México en cifras. Superficie sembrada de maíz grano nacional, 2011
Disponibile en <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mapatematico/Default.aspx>
Consultado el 31 de enero de 2014.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2013. Red Nacional de Estaciones del Inifap.
Disponibile en: <http://clima.inifap.gob.mx/redinifap/est.aspx?est=48020>
- Kato, T. A., C. Mapes, L. M. Mera, J. A. Serratos, R. A. Bye. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad nacional autónoma

- de México, Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad.
116 pp. México, D. f.
- Kulkarni, U. K. 1963. Initiation of the dikaryon in *Claviceps microcephala* (Wallr.) Tul.
Curr. Sci. 19-22
- López, C. M. L, Márquez, G. J. y Murguía Sánchez G. 2005. Técnicas para el estudio
del desarrollo en angiospermas libro de laboratorio. 2ª ed. Las prensas de
ciencias. México. 177.
- Loveless, A. R. 1964. Use of the honeydew state in the identification of ergot species.
Trans. Brit. mycol. Soc. 47: 205-213.
- Loveless, A. R. 1967. A new species of *Claviceps* on *Cyperaceae*. Trans. Br. mycol.
Soc. 50: 19-22.
- Loveless, A. R. and Peach, J. M. 1986. Evidence from ascospores for host restriction in
Claviceps purpurea. Trans. Br. mycol. Soc. 86: 603-610
- Luttrell, E. S. 1977. The disease cycle and fungus-host relationships in dallisgrass ergot.
Phytopathology. 67:1461-1468.
- Malinka, Z. 1999. Ergot: The genus *Claviceps*: Saprophytic cultivation of *Claviceps*.
Hardwood academic publishers. London. 499.
- Mantle, P. G. and Shaw, S. 1976. Role of ascospore production by *Claviceps purpurea*
in aetiology of ergot disease in male sterile wheat. Trans. Br. mycol. Soc. 67: 17-
22.
- Mitchell, D. T. and Cooke, R. C. 1968. Water uptake, respiration pattern and lipid
utilization in Sclerotia of *Claviceps purpurea* during germination. Trans. Br.
mycol. Soc. 51:731-736

- Osada, S. K., Fucikovsky, Z. L., Ortega, D. M. L. y E. Mark Engleman. 1986. Estudio sobre la germinación del diente de caballo del maíz e interacción hospedante – parásito (*Zea mays* L. *Claviceps gigantea* Fuentes *et al.*). *Agrociencia*. 66: 57-69
- Pazoutová, S. 2001. The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*. *Mycol. Res.* 105: 275-283.
- Pazoutová, S. and Parbery, D. P. 1999. Ergot: the genus *Claviceps*: The taxonomy and phylogeny of *Claviceps*. Hardwood Academic Publishers. London. 499.
- Pazoutová, S., Odvody, G. N., Frederickson, D. E., Chudicková, M., Olsovska, J. and Kolarik, M. New *Claviceps* species from warm-season grasses. 2011. *Fungal Diversity*. 49:145-165.
- Prakash, H. S., Shetty, H. S. and Safeeulla, K. M. 1983. Germination and nuclear behavior of sexual and asexual propagules of *Claviceps fusiformis*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 81: 65-69.
- Programa de Maíz del CIMMYT. 2004. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. 4ª ed. México, D.F. CIMMYT.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) SAGARPA 2012; Disponible en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
Consultado el 31 de enero de 2014
- Sain, G. y López, P. M. A. 1997. Producción de maíz y políticas agrícolas en Centro América y México. CIMMYT PRM. Costa Rica. 64.
- Shelby, R. A. 1999. Toxicology of ergot alkaloids in agriculture. 469-477.
- Thakur, R. P., Rao, V. P. and Williams, R. J. 1984. The morphology and disease cycle of ergot caused by *Claviceps fusiformis* in pearl millet. *Phytopathology*. 74: 201-205.

- Tsukiboshi, T., Shimanuki, T. and Koga, H. 2001. *Claviceps sorghicola* and *C. africana*, the ergot pathogens of sorghum, and their cultural control in Japan. JARQ. 35: 221-226.
- Ullstrup, A. J. 1973. Maize Ergot: A disease with a restricted ecological niche. Trop. Pest Management 19: 389-391.
- Van der Linde, E. J. and Wehner, F. C. 2007. Symptomatology and morphology of *Claviceps cyperi* on yellow nut sedge in South Africa. Mycologia. 99: 586-591.
- Villamagua, M. A., Loaiza C., E. R., y Naula, A. P. E. 2008. Efecto del carbón vegetal en las propiedades físicas-químicas del suelo en cultivo de tomate de mesa *Solanum lycopersicum* L. bajo invernadero. Estudios universitarios Revista científica. 8: 85-100.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: a guide to methods and applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White, eds): 315-322. Academic Press, San Diego.
- White, J. F., Bacon, C. W., Hywel-Jones, N. L. and Spatafora, J. W. 2003. Clavicipitalean fungus evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts. Mycology. 19 326-327.

ANEXO 1

MEDIDAS DE PERITECIOS Y ASCOPORAS *C. gigantea*

# PERITECIO	LARGO (L1)	ANCHO (L2)
1	404.9	151.3
2	413	154.3
3	428.5	155
4	431.8	157.8
5	442.6	159.4
6	445.6	164.5
7	452.9	167
8	454.5	168.1
9	456.2	169.3
10	456.5	169.9
11	456.8	173.1
12	458.8	176.3
13	459.4	176.9
14	463.8	178.5
15	464.5	179.2
16	471.6	179.6
17	472.2	184.3
18	472.8	184.5
19	475.3	186.1
20	489.7	187.2
21	490.6	190.9
22	495.2	202.9
23	499.1	211.3
24	500.5	231.5
25	500.9	257.6
26	509.1	261.4
27	537.5	270.4
28	547.5	271.9
29	560.3	272.7
30	569.3	284.4

No. Ascospora	Largo (L1) um	Ancho um (L2)
1	196	1.6
2	209.6	1.2
3	195.3	1.9
4	185.3	1
5	263.7	1.2
6	214.9	1.3
7	206.4	1.2
8	233.9	1.7
9	208.5	2.1
10	218.7	1.2
11	207.8	1.4
12	193.1	1.5
13	209	1.2
14	236.4	1
15	194.9	1.6
16	212	1.5
17	217.6	1.6
18	211.4	1.5
19	197.7	1.3
20	247.8	2
21	219.5	1.9
22	188.1	1.2
23	196.1	1.2
24	169.6	1.7
25	233.3	1.6
TOTAL	5266.6	36.6
PROMEDIO	210.664	1.464

ANEXO 2

DATOS AGROCLIMATOLÓGICOS DE LA ESTACIÓN METEOROLÓGICA

“El arroyo”

Fecha	Prec.	T. Max.	T. Min.	T. Med.	VV max.	DVV max.	VV	DV	Rad. G.	HR	ET	EP
enero	1.80	19.83	0.25	9.56	20.3	158.6(S)	4.85	110.91(E)	359.07	65.50	80.10	137.93
febrero	0.00	22.88	0.12	11.52	19.9	275(O)	5.86	268.37(O)	458.50	47.93	110.60	161.11
marzo	3.80	21.68	1.85	11.77	28.1	357.8(N)	6.22	26.91(NE)	439.64	45.14	120.90	162.35
abril	4.20	24.82	4.78	15.00	25.1	15.8(N)	6.57	174.04(S)	481.88	39.44	144.70	169.69
mayo	35.00	24.18	7.13	14.95	27.3	340.2(N)	5.80	194.2(S)	422.66	55.53	122.60	156.09
junio	78.40	22.80	8.84	15.01	22.3	345.7(N)	5.97	110.69(E)	389.23	69.12	105.40	128.87
julio	206.60	21.02	8.89	13.69	22.7	191.5(S)	4.70	160.45(S)	379.00	77.87	91.30	121.47
agosto	88.40	21.16	8.71	13.80	23.5	162.7(S)	4.97	238.68(SO)	385.64	76.09	93.20	124.91
septiembre	331.20	20.57	9.79	13.78	21.4	155.2(SE)	4.46	154.15(SE)	324.15	81.67	68.90	101.07
octubre	6.60	21.18	8.39	13.35	15.5	22.8(NE)	4.05	239.39(SO)	361.73	77.34	81.10	117.31
noviembre	25.00	20.18	4.41	11.16	17.5	348.5(N)	4.51	198.94(S)	358.55	75.48	74.30	119.87
diciembre	51.80	19.85	1.61	9.88	22	158(S)	4.54	195.82(S)	346.02	72.03	75.00	127.68
TOTALES	832.8+	21.68*	5.4*	12.79*	--	--	5.21*	194.83(S)*	392.17*	65.26+	1168.1+	1628.35

Prec.:	Precipitación total (mm)
T. Max.:	Temperatura máxima (°C)
T. Min.:	Temperatura mínima (°C)
T. Med.:	Temperatura media (°C)
VV max.:	Velocidad del viento máxima (km/hr)
DVV max.:	Dirección de la velocidad máxima del viento (grados azimut)
VV:	Velocidad promedio del viento (km/hr)
DV:	Dirección promedio del viento (grados azimut)
Rad. G.:	Radiación Global (w/m2)
HR:	Humedad relativa (%)
ET:	Evapotranspiración de referencia (mm)
EP:	Evaporación potencial (mm)

ANEXO 3
SECUENCIAS

- Muestra 1

AATCGGGGAGGGATCACTCGCACGGAGTACCTCGCAACCCCATGTGAACC
TCTACCGAACGTTGCCTCGGCGGGACGCGTCCCGGCCCCGCCCCTTCTAC
GGGGTGCCGGAGCCGAGGCCCGCCCGCCGGGGGACCCCAACCATAAACTC
TGCATATATCATGGCATGTCTGAGTGGATTTAGTATCAAATGAATCAAAA
CTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCCGCCAGTACTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGT
CATTTCAACCCTCAAGCCCCGGGTTTGGTGTGGCGACCGGCACACGGT
TGGGAGGGGCCACGTGCCCCCCCCACTCCGCGCCGTCGCCCAAATGGATC
GGCGGCCACGCCGCGGCATCCCCTGCGCAGTAACATACCACCTCGCAGGC
GGCGGCCCGGCCGGTCTCTGCCGTAAAACCCCCAACTTTCTCAAGAGTT
GACCTCGAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAGCC
CGGAAGAAAGATCATTACCGAGT

- Muestra 2

AAACCGGGAGGAAAACGTGAAACTGAGTACTCACGCATACCTGTGAACCT
CAAAAAAACTTTGCCACGGCGGGACGCGTCCCGGCCCCGCCCCTTTAAG
GGGTGGCGGAGCCGAGGCCCCCCCGCCGGGGGACCCCAACCATAAACTCT
GCATATATCACGGCATGTCTGAGAGGATTTAGTATCAAATGAATCAAAC
TTTCCACAACGGATCTCTTGCTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCTCAATCTTTG

AACGCACATTGCGCCCGCCGTA CTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGCC
ATTTCAACCCTCACGCCCCGGGTTTGGTGTGGCGACCGGGACACGGTT
GGGAGGGGGCCACGTGCGCCCCCACTCCGCGCCGTCGCCCCAATGGATAG
GCGGCCACGCCGCGGTCTCCCCTGCGCCGTAACACACCACCTCGCACGCG
GCGGCCCGGCCAGTGTCTGCCGTA AACCCCCCACTTTCTCGTGACTCG
ACGTCTAATCAAGTAGGAGTACCCGCTCAACCCTTCATATCTCTACGCGC
AGGAAAATCACCTCCTAAGTTGCCCCCGCTTACCTCCACAGTCCTCACG
TAGTCACGATGACCCACACCTTCTCTCTCGCCACCGCTCTACCACATGCA
GGACCCACACCACGCCGACGACTGCAGCATCACCCGCCGCAGCGCCGCCA
CTTAGCCCACCCACTAACAACACTCCTCCCGGAGTCTAATATCTCGATAC
CTATCACTTCATAACCACACTCCTCCCTTACCCTTCCCCCCCCCTCACCC
TCATCATTCCTCCACACTATGATTATCTAAGCATCACCAACACTATGAGG
CACATATCACGATATACACAATCAGCAATAGAATCTTCTCACGCCTAAGG
TATC

- **Muestra 3**

GAAAAACGTAGCTAACCTCGCAACCCCATGTGTACCTCTACCGAACGTTG
CCTCGGCGGGACGCGTCCCGGCCCGCCCTTCTACGGGGTGCCGGAGCC
GAGGCCCGCCCGCCGGGGACCCCAACCATAAACTCTGCATATATCATGG
CATGTCTGAGTGGATTTAGTATCAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGA
TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC
CCGCCAGTACTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCA
AGCCCCCGGGTTTGGTGTGGCGACCGGCACACGGTTGGGAGGGGGCCACG
TGCCCCCCCCACTCCGCGCCGTCGCCCAAATGGATCGGCGGCCACGCCGC

GGCATCCCCTGCGCAGTAACATAACCACCTCGCAGGCGGCGGCCCGGCCCG
GTCTCTGCCGTAAAACCCCCACTTTCTCAAGAGTTGACCTCGAATCAGGT
AGGAATACCCGCTGAATTAACAATATAACCGGGAAGAAAATCTT

- **Muestra 4**

AATTCGGGAGGATACCTCCAACCTGAGTACATCCAGCCACATGTGAACCTC
TACAAAACGTTGCCTCGGCGGGACGCGTCCCGGCCCGCCCCTTCTACGG
GGTGCCGGAGCCGAGGCCCGCCCGCCGGGGGACCCCAACCATAAACTCTG
CATATATCATGGCATGTCTGAGTGGATTTAGTATCAAATGAATCAAACT
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCGCCAGTACTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA
TTCAACCCTCAAGCCCCGGGTTTGGTGGTGGCGACCGGCACACGGGTG
GGAGGGGCCACGTGCCCCCCCCACTCCGCGCCGTCGCCCAAATGGATCGG
CGGCCACGCCGCGGCATCCCCTGCGCAGTAACATAACCACCTCGCAGGCGG
CGGCCCGGCCGGTCTCTGCCGTAAAACCCCCAACTTTCTAAGAGTTGAC
CTCGAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAACCGGA
GGAAATCTTTACCGACTTTC

Muestra 1

- Inserción de la secuencia en el banco de datos

The screenshot shows the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) web interface. At the top, there's a navigation bar with 'Home', 'Recent Results', 'Saved Strategies', and 'Help'. Below that, it says 'NCBI/ BLAST/ blastn suite' and 'Standard Nucleotide BLAST'. There are tabs for 'blastn', 'blastp', 'blastx', 'tblastn', and 'tblastx'. The main area is titled 'Enter Query Sequence' and contains a text input field with a nucleotide sequence. To the right of the input field are 'Clear' and 'Query subrange' options. Below the input field is a 'BLAST' button and a checkbox for 'Show results in a new window'. At the bottom, there's a '+ Algorithm parameters' link.

- Secuencias con la que se alineó significativamente

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Claviceps gigantea ITS1, 5.8S rRNA ITS2 and partial 28S rRNA	1037	1037	90%	0.0	99%	AJ133394.2
<input checked="" type="checkbox"/>	Claviceps langdonii isolate CCC820 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transc	726	726	90%	0.0	90%	EF057428.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Claviceps clavispورا genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA	702	702	90%	0.0	89%	FR732000.1

ANEXO 4

PREPARACIONES DE AGAR GRANOS Y ESTIGMAS DE MAÍZ CON DXTROSA.

Agua destilada1 Lt.
Granos de maíz y estigmas60 gr.
Dextrosa40 gr.
Agar12 gr.

Se colocan los granos y estigmas en un vaso de precipitados con agua destilada y se dejan en baño maría por 30 minutos hasta que hierva. Se utiliza el extracto y licúa con los 60 gr. de granos y estigmas. Se clarifica la mezcla pasándola por manta de cielo y evitar que se vayan partículas grandes de los granos y estigmas. Posteriormente se coloca la dextrosa y el agar en el clarificado. Esterilizar a 121 °C y 15 lb de presión durante 20 min, una vez esterilizado enfriar a unos 40 – 45°C y vaciar en cajas de Petri.