

Sclerotial germination and ascospore formation of *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez

Germinación de esclerocios y formación de ascoporas de *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez

Moreno-Manzano, Celeste E¹., De León-García de Alba, Carlos^{1*}, Nava-Díaz, Cristian¹ y Sánchez-Pale, Ricardo². ¹Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. ²Universidad Autónoma del Estado de México, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México.

*Autor de correspondencia: cdeleon@colpos.mx

Recibido: Marzo 22, 2016.

Aceptado: Junio 24, 2016.

Moreno-Manzano CE, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C and Sánchez-Pale R. 2016. Sclerotial germination and ascospore formation of *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 223-241.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1603-2](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1603-2)

Primera publicación DOI: Junio 28, 2016.

First DOI publication: June 28, 2016.

Resúmen. La enfermedad “diente de caballo” del maíz (*Claviceps gigantea*) afecta hasta 90 % del grano. Se estudiaron condiciones para germinación de esclerocios, formación de estructuras sexuales y se describe parte del ciclo del hongo en laboratorio y campo. Se estableció un diseño con sustrato y tiempo de incubación a 4 °C. Se evaluaron porcentaje de esclerocios germinados, tiempo de germinación y formación de cabezuelas estromáticas. En laboratorio, los esclerocios germinaron solamente en carbón residual después de 3 meses a 4 °C y 2 meses a 22-24 °C de incubación re-

Abstract. The disease known as “horse’s tooth” in maize (*Claviceps gigantea*) can affect grain yield up to 90 %. In this research, the time of sclerotial germination and the development of the sexual structures were studied in field and laboratory. A design was implemented with substrate and time of incubation at 4 °C as factors. Percent of germinated sclerotia, time of germination, and formation of stromatic heads were evaluated. In laboratory, sclerotia germinated only when on residual charcoal, incubated for 3 months at 4 °C followed by 2 months at 22.24 °C, resulting in 55 % germination. Sclerotia germinated produced an average of five heads per sclerotium 15 d after primordial were produced. In field conditions, the primordial appeared after the sclerotia were incubated for 3 months at 4 °C and 64 d at an average temperature of 14.07 °C. In both types of sclerotia, primordia released thin, elongated ascospores after 23 d, showing that the appearance of primordia and maturity did not occur at the same time. Ascospores release from the stromatic heads was documented.

sultando en 55 % de germinación. Esclerocios germinados producen en promedio cinco cabezuelas por esclerocio 15 d después de la aparición de los primordios. En campo, los primordios aparecieron cuando los esclerocios se incubaron 3 meses a 4 °C y 64 d a temperatura promedio de 14.07 °C. En campo y laboratorio, la liberación de ascosporas se observó 23 d después de aparecer de los primordios. La aparición de cabezuelas estromáticas, su desarrollo y maduración en el mismo esclerocio no fué sincronizado. Se documentó la liberación de ascosporas largas y delgadas emergiendo de cabezuelas estromáticas. El patógeno se identificó morfológica y molecularmente como *Claviceps gigantea*.

Palabras clave: Diente de caballo en maíz, clavicipitales, identificación-morfológica, biología de patógenos.

El maíz continúa siendo el alimento básico de los mexicanos. Del total de 23.3 Mt que se producen en el país, aproximadamente 20 % de éste se produce en el altiplano, incluyendo los estados de México, Puebla y Michoacán (SAGARPA-SIAP, 2014), localidades en donde se presentan baja temperatura y alta humedad, condiciones idóneas para que se presente la enfermedad causada por el hongo *Claviceps gigantea* Fuentes *et al.* (anamorfo *Sphacelia* sp.) conocida por los agricultores como “diente de caballo”, debido a la forma que toman los granos infectados. Recientemente, la enfermedad ha aumentado su incidencia y distribución limitando la calidad del grano producido, afectando hasta 90 % de la cosecha, especialmente en híbridos comerciales. Además del daño al grano, el hongo produce toxinas alucinógenas del grupo del ácido lisérgico.

El primer reporte de la enfermedad diente de caballo en maíz (*Zea mays L.*), causada por *C. gigantea* lo realizaron Fuentes y De la Isla (1961) y

The pathogen was identified morphologically and molecularly as *Claviceps gigantea*.

Key words: Horses's tooth disease, maize, claviceps, morphological identification, pathogens biology

Maize continues to be a staple food for Mexicans. From a total domestic production of 23.3 metric tons, about 20 % is sown in the highlands, including the State of Mexico, Puebla and Michoacán (SAGARPA-SIAP, 2014), where low temperature and high humidity prevail and favor the development of a disease caused by the *Claviceps gigantea* fungus (anamorph *Sphacelia* sp.) (Fuentes *et al.*). This disease is known by farmers as “horse's tooth” because of the shape of the infected grains. Recently, the increased incidence and distribution of the disease has lowered the grain quality and affected up to 90 % of harvests, especially of commercial hybrids. In addition to grain damage, *Claviceps gigantea* produces hallucinogenic toxins of the lysergic acid group.

The first to report horse's tooth in maize (*Zea mays L.*) caused by *C. gigantea* were Fuentes and De la Isla (1961) and Fuentes *et al.* (1964), who described the disease-causing agent. The authors reported the disease both in the highlands, including Toluca and Amecameca, State of Mexico, and the Tarascan mountains in Michoacán (Fuentes *et al.*, 1964). These two states produce around 17 % of the maize grain in the whole country (SAGARPA-SIAP, 2014). Characteristic symptoms of the disease are observed at the end of the crop cycle. At the tip of the ear, the husk opens to reveal brown fungal structures called sclerotia (Figure 1A) that have replaced the grains. (Fuentes and De la Isla, 1961; Osada *et al.*, 1986).

In the Toluca valley, Moreno and Fucikovski

Fuentes *et al.* (1964), quienes describieron el agente causal. Esos autores reportaron la enfermedad en los valles altos de Toluca y Amecameca en el estado de México y en la sierra Tarasca de Michoacán (Fuentes *et al.*, 1964); en estos dos estados se produce aproximadamente 17 % del maíz para grano de todo el país (SAGARPA-SIAP, 2014). Los síntomas característicos de la enfermedad se observan al final del ciclo del cultivo, en el ápice de las mazorcas las brácteas se abren y dejan al descubierto estructuras fungosas de color castaño que corresponden a los esclerocios (Figura 1A), que remplazan a los granos (Fuentes y De la Isla, 1961; Osada *et al.*, 1986).

En el Valle de Toluca, Moreno y Fucikovski (1972) documentaron incidencia de 42.3 a 61.5 % en tres híbridos comerciales de maíz. En cuantificaciones de pérdidas en grano causadas por la enfermedad en las zonas productoras de maíz en Metepec y Calimaya, México, los agricultores

(1972) documented an incidence of 42.3 to 61.5 % in three maize commercial hybrids. Regarding quantifications of grain losses caused by horse's tooth in Metepec and Calimaya, Mexico, maize growing zones, farmers Alfredo Vásquez and Juan Manuel Pereyra reported grain losses of 70 and 90 % in the 2012 crop cycle using Aspros 910 (Aspros) and Quetzal (De Kalb) commercial hybrids, respectively (Figure 2).

According to Fucikovsky and Moreno (1971), this disease can significantly reduce crop production for the fungus replaces the grain and affects the appearance and germination of grains next to sclerotia (Figure 1B). Furthermore, sclerotia-contaminated grain fetches a lower price because it contains toxic alkaloids, just as other *Claviceps* species do (Osada *et al.*, 1986). Little is known of the life cycle of *C. gigantea* and of the environment conditions that affect it. De la Isla and Fuentes (1963), Fuentes *et al.* (1964), Agurell *et al.*

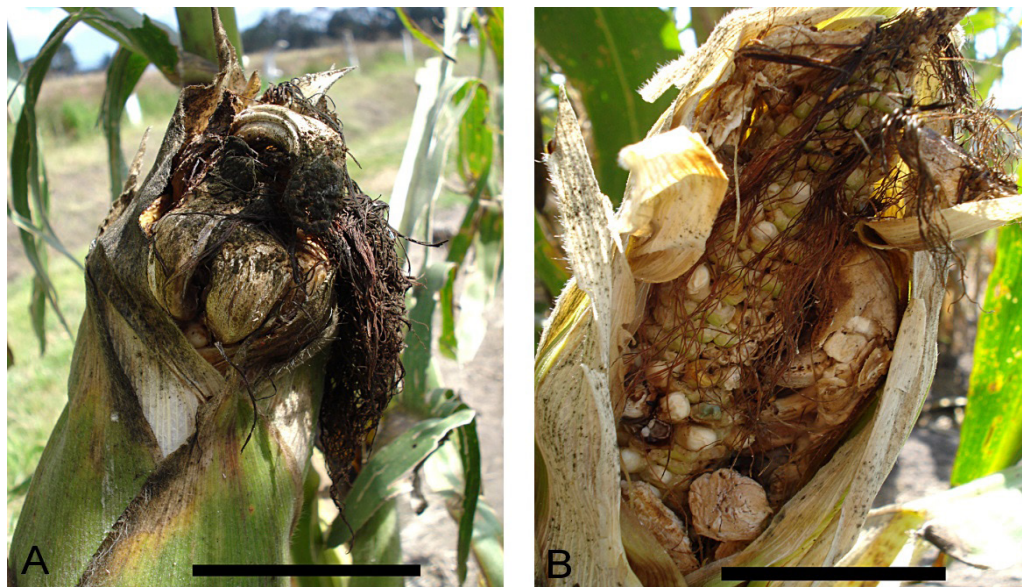


Figura 1. Mazorcas de maíz infectadas con *Claviceps gigantea*, en el municipio de Almoloya de Juárez, México. A) parte apical de la mazorca con esclerocios que emergen rompiendo las brácteas y, B) daño en granos aledaños a los esclerocios.

Figure 1. Maize ears infected by *Claviceps gigantea* in the municipality of Almoloya de Juárez, México. A) cob apex affected by sclerotia, which is observed when the husk is removed, and B) damaged grains next to sclerotia.

Sres. Alfredo Vásquez y Juan Manuel Pereyra, informaron que en sus parcelas, en el ciclo de cultivo de 2012, se registraron pérdidas de grano del 70 y 90 % en siembras con los híbridos comerciales Aspros 910 (Aspros) y Quetzal (De Kalb), respectivamente (Figura 2).

Según Fucikovsky y Moreno (1971), ésta enfermedad puede reducir significativamente la producción ya que el hongo reemplaza al grano afectando el aspecto y germinación de los granos cercanos al esclerocio (Figura 1B). Además, la contaminación del grano con esclerocios penaliza el precio del grano durante su comercialización pues contiene alcaloides tóxicos, como otras especies de *Claviceps* (Osada *et al.*, 1986). Poco se sabe del ciclo biológico de *C. gigantea* y de las condiciones ambientales que lo afectan. De la Isla y Fuentes (1963), Fuentes *et al.* (1964), Agurell *et al.* (1963) y Osada (1984)

(1963) and Osada (1984) reported germination of *C. gigantea* sclerotia after they were disinfected, incubated at high and low temperature and light-darkness periods that simulated field conditions, using sterile and wet sand as substrate. However, the pathogen life cycle has not yet been documented nor the time required for each development phase, and this has important implications for the pathogen integrated management. The objectives of this study were: 1) determine the time of sclerotia germination and formation of perithecia and asci, as well as *C. gigantea* ascospore release under laboratory and field conditions; 2) ascospore development in a culture medium; and 3) confirm the pathogen identity through morphological and molecular techniques.

MATERIALS AND METHODS



Figura 2. Incidencia de diente de caballo en mazorcas de maíz producidas en lotes de agricultores sembradas con híbridos comerciales susceptibles durante el ciclo de cultivo 2012. Se ha recomendado a los agricultores recoger y quemar las mazorcas afectadas para evitar la diseminación del inóculo en sus terrenos.

Figure 2. Incidence of horse's tooth in maize cobs harvested in farmers' plots sown to susceptible commercial hybrids in the 2012 crop cycle. Farmers were advised to collect and burn the infected cobs to prevent inoculum dissemination in their fields.

reportaron la germinación de los esclerocios de *C. gigantea* después de haberlos sometido a desinfección, incubación a altas y bajas temperaturas y períodos de luz-oscuridad simulando condiciones de campo, y utilizando como sustrato arena estéril, húmeda. Sin embargo, aun no se ha documentado el ciclo biológico del patógeno y el tiempo que requiere cada fase de desarrollo, lo que tiene importantes repercusiones en el manejo integrado del patógeno. Los objetivos del presente estudio fueron: 1) determinar el tiempo de germinación de los esclerocios y la formación de peritecios, ascas y liberación de ascosporas de *C. gigantea* en condiciones de laboratorio y en campo, 2) crecimiento de ascosporas en medio de cultivo y, 3) confirmar la identidad del patógeno mediante morfología y técnicas moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de esclerocios

Para inducir la germinación de esclerocios en laboratorio se usaron 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), en el estado de México, durante noviembre - diciembre del 2012. Los esclerocios colectados se almacenaron a 4 °C durante tres meses. Los esclerocios se clasificaron por tamaño, se lavaron con detergente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) 1.5 % por 2 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada y se secaron sobre papel absorbente durante 24 h (CMI, 1974).

Germinación de esclerocios en laboratorio

Se desinfectaron botellas de polietileno tereftalato glicol (PET, producido por Amacor Plastic Containers de México, S. A. de C. V) de 500 mL

Sclerotia collection

Sclerotia collected in the municipalities of Almoloya de Juárez (19° 33' 01" N - 99° 56' 13" O), Calimaya (19° 10' 25" N - 99° 37' 02" O) and Villa Victoria (19° 26' 00" N - 100° 00' 00" O), State of Mexico, during November and December 2012, were used to induce germination of sclerotia in the lab. Sclerotia collected were stored at 4 °C for three months. They were classified by size, washed with detergent, disinfected with a 1.5 % sodium hypochlorite (NaClO) solution for 2 minutes, rinsed three times with distilled water, and dried on paper towels for 24 hours (CMI, 1974).

Sclerotia germination in the lab

Polyethylene terephthalate glycol 500 mL bottles (PET, manufactured by Amacor Plastic Containers de México, S. A. de C. V) were disinfected with 96 % ethyl alcohol. 20, 35 and 70 g of the following substrates were added to the bottles: 1) soil from Almoloya, Calimaya or Villa Victoria, 2) commercial charcoal, 3) residual charcoal, 4) oat flakes, and 5) a witness without substrate. To all bottles, 75 ml of sterile distilled water was added. Three sclerotia were placed in each bottle. The bottles were stored in a cold room at 4 °C for 1, 2, 3, 4 and 6 months. Then they were incubated at room temperature (22-24 °C) for 2 months and all the variables were daily monitored.

The assessed variables were time to stipes emergency (germination), time for stipes to develop and time for heads to form. Ascospore discharge was monitored following three methods: 1. Direct observation every 2 h using a stereoscopic microscope (Olympus SL2 ILST); 2. Observation of ascospores captured on a slide (Corning 75x25 mm) and covered with lactophenol cotton blue stain placed in PET bottle caps every 8 h; and

con alcohol etílico 96 %. A éstos frascos se agregaron 20, 35, 40 y 70 g de cada uno de los siguientes sustratos: 1) suelo de Almoloya, Calimaya o Villa Victoria, 2) carbón comercial, 3) carbón residual, 4) avena, y 5) testigo sin sustrato. A todos los frascos se adicionaron 75 ml de agua destilada estéril. En cada frasco se colocaron tres esclerocios. Los frascos se colocaron en un cuarto frío a 4 °C durante 1, 2, 3, 4 y 6 meses. Después, se incubaron a temperatura ambiente (22-24 °C) por 2 meses y todas las variables se monitorearon diariamente.

Las variables evaluadas fueron el tiempo a la emisión de los estípites (germinación), tiempo para desarrollo de los estípites y tiempo para la formación de cabezuelas. La descarga de ascosporas se monitoreó mediante tres métodos: 1. Observación directa cada 2 h utilizando un microscopio este-reoscópico (Olympus SL2 ILST), 2. Observación cada 8 h de ascosporas capturadas en un portaobjetos (Corning 75x25 mm) cubiertos de azul de lactofenol colocados en la tapa de frascos PET y, 3. Observación cada 24 h de esporas capturadas en 6 ml de agua destilada estéril contenida en la tapa de una caja Petri (6 cm de diametro) colocada en el fondo de los frascos PET invertidos fijando los esclerocios en la base usando paraplást.

El diseño experimental fue de un ensayo factorial 5x3 con sustratos y tiempos de incubación a 4 °C como los factores. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. La unidad experimental fue un frasco cilíndrico con el sustrato y tres esclerocios. El experimento completo se repitió dos veces.

Germinación de esclerocios en campo

En junio de 2013, los esclerocios almacenados a 4°C durante tres meses, se colocaron sobre suelo de cultivo del rancho El Rosedal (Km 13.5 carretera Toluca-Atla-comulco, municipio de Atla-comulco, estado de México. (19° 24' 19.28" N y 99° 43' 12.84" O), cuando el cultivo de maíz (Aspros HC8)

3. Observation of spores captured in 6 ml of sterile distilled water in a Petri dish cap every 24 h (6 cm diameter); spores were placed at the bottom of inverted PET bottles and sclerotia were fixed to the base using paraplást.

The experimental design was a factorial trial 5x3 with substrates and incubation periods at 4 °C as factors. Three replications were used for each treatment. The experiment unit was a cylindrical bottle with substrate and three sclerotia. The whole experiment was repeated twice.

Sclerotia germination in the field

In June 2013, sclerotia that had been stored at 4 °C for three months were placed on cultivated soil at El Rosedal Ranch (Km 13.5 carretera Toluca-Atla-comulco, Atla-comulco Municipality, State of Mexico. (19° 24' 19.28" N and 99° 43' 12.84" W), three weeks after maize (Aspros HC8) was sown. Four 40x40x40 cm frames with wire mesh (1 cm²) were randomly distributed within the field. Each frame contained 30 sclerotia (Pedroza-Sandoval, 2010). Variables of the sclerotia placed in the field were monitored on a weekly basis. Germinated sclerotia were transferred to a 2 L PET bottle containing 3 cm of soil at the bottom; variables were observed every day. Climate data were obtained from the Arroyo station, one of the INIFAP's National Stations Network, located in the municipality of Almoloya de Juárez, Mexico (19° 24' 34.92" N, 99° 44' 12.12" O). The variables observed daily were time to stipes emergence, full development of stipes, heads and perithecia, and ascospores discharge, using the methods previously mentioned.

Histological cuts of stromatic heads

To observe the sexual structures (perithecia, asci and ascospores) formed on the heads obtained, histological sections were made manually using a

tenía tres semanas de siembra. Cuatro armazones de 40x40x40 cm con paredes de malla de alambre (1 cm²) se distribuyeron al azar en la parcela. Cada armazón contenía 30 esclerocios (Pedroza-Sandoval, 2010). Las variables en los esclerocios colocados en el campo se monitorearon semanalmente. Una vez germinados, los esclerocios se transfirieron a un frasco de PET de 2 L que contenía 3 cm de suelo en la base del frasco donde las variables se observaron diariamente. Los datos climatológicos se obtuvieron de la estación Arroyo, municipio Almoloya de Juárez, México (19° 24' 34.92" N, 99° 44' 12.12" O) perteneciente a la Red Nacional de Estaciones del INIFAP. Las variables evaluadas diariamente fueron tiempo de emisión de estípites, desarrollo completo de los estípites, formación de cabezuelas y peritecios y descarga de ascosporas con los métodos descritos anteriormente.

Cortes histológicos de cabezuelas estromáticas

Con la finalidad de observar las estructuras sexuales (peritecios, ascas y ascosporas) formadas en las cabezuelas obtenidas se realizaron cortes histológicos a mano con navaja de afeitar. Los cortes obtenidos se colocaron en un portaobjetos con azul de lactofenol para ser documentados utilizando un fotomicroscopio III Carl Zeiss adaptado con una cámara digital PAXcam3. Adicionalmente, las cabezuelas se fijaron en FAA (formaldehído : ácido acético glacial : alcohol, 1:1:1) por 24 h (Kulkarni, 1963). Las muestras se enjuagaron con agua corriente por 20 min para eliminar el fijador y se deshidrataron en una serie de concentraciones de etanol (10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 %) durante 3 h en cada concentración. Para la deshidratación e inclusión en parafina se siguió el protocolo descrito por López *et al.* (2005). Los cortes de tejido se realizaron con un micrótopo de rotación (American Optical Mod. 820) a 10 µm de

razor blade. The cuts were placed on a slide with lactophenol cotton blue stain to be documented using a photomicroscope III Carl Zeiss adapted with a PAXcam3 digital camera. Additionally, the heads were fixed to FAA (formaldehyde : glacial acetic acid : alcohol, 1:1:1) during 24 h (Kulkarni, 1963). The samples were rinsed with running water during 20 min to remove the fixative and dehydrated in ethanol concentrations (10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % and 100 %) for 3 h in each concentration. For dehydration and immersion in paraffin, the protocol described by López *et al.* (2005) was followed. Tissue cuts were made using a rotation microtome (American Optical Mod. 820) at 10 µm thickness. The sections were fixed to glass slides, the paraffin was removed and the sections were stained with fast-green safranin (López *et al.*, 2005). Sections were observed and measured using an optical microscope (VELAB model: VE-B6) equipped with a Moticam 2300 digital camera (3.0 M Pixel USB 2.0) and image processing software Motic MC Camera 1.1. The length and width of asci, ascospores and perithechia were evaluated in a sample of 30 individuals (Pedroza-Sandoval, 2010), and both length and width were compared to the ones reported in literature (Fuentes *et al.*, 1964).

Growth in a culture medium

To evaluate the *in vitro* growth of the fungus, and stromatic heads while discharging ascospores were washed with powder detergent, rinsed with sterile water, disinfected with 1.5% sodium hypochlorite during 2 min, and rinsed with sterile distilled water. The heads were cut with a razor blade and the sections were placed in 5 mL of sterile distilled water. To observe the effect of the thermal treatment on ascospores germination, once their presence was confirmed, the sample was divided

grosor. Las secciones fueron fijadas en los portaobjetos, se removió la parafina y se tiñeron con safranina-verde rápido (López *et al.*, 2005). Los cortes se documentaron y midieron usando un microscopio óptico (VELAB modelo: VE-B6) equipado con una cámara digital Moticom 2300 (3.0 M Pixel USB 2.0) y el software de procesamiento de imágenes Moticom MC Camara 1.1. Las medidas del largo y ancho de las ascas, ascosporas y peritecios se evaluaron en una muestra de 30 individuos (Pedroza-Sandoval, 2010) y las dimensiones fueron comparadas con las reportadas en la literatura (Fuentes *et al.*, 1964).

Crecimiento en medio de cultivo

Para evaluar el crecimiento *in vitro* del hongo, las cabezuelas estromáticas en plena descarga de ascosporas se lavaron con detergente en polvo, se enjuagaron con agua destilada estéril, se desinfectaron con hipoclorito de sodio 1.5 % por 2 min y se enjuagaron con agua destilada estéril. Las cabezuelas se cortaron con navaja de afeitar esterilizada y las secciones se colocaron en 5 mL de agua destilada estéril. Con el propósito de observar el efecto de tratamiento térmico en la germinación de las ascosporas, una vez verificada su presencia, la muestra se dividió en dos partes iguales utilizando una pipeta Pasteur esterilizada, una parte se sometió a calor (50°C por 3 min), mientras que la otra no tuvo tratamiento térmico. Se tomaron 100 µL de la suspensión de ascosporas de cada tratamiento, y se dispersaron en los siguientes medios de cultivo: 1) papa dextrosa agar (PDA; Bioxon®), 2) agar harina de maíz (AHM; Bioxon®), 3) extracto de malta agar (EMA; Difco®), 4) agar-agar (Difco®), 5) agar-agar con dextrosa (Difco®) y 6) agar (Difco®) con una mezcla de granos de maíz frescos y estigmas. Las cajas se incubaron a 22 °C y se revisaron diariamente para determinar el efecto de los tratamien-

in two equal portions using a sterilized Pasteur pipette. Only one of the portions was thermally treated (50 °C during 3 min). 100 µL of ascospore suspension of each treatment were taken and poured on Petri dishes with the following culture media: 1) potato dextrose agar (PDA; Bioxon®), 2) corn meal agar (AHM; Bioxon®), 3) malt extract agar (EMA; Difco®), 4) agar-agar (Difco®), 5) agar-agar with dextrose (Difco®) and 6) agar (Difco®) with a mixture of fresh maize grains and silks. The dishes were incubated at 22 °C and observed daily to determine the effect of the treatments on *in vitro* fungus germination and development. The experiment was performed under lab conditions based on a factorial design 6x2 (culture medium and thermal treatment) with three replications.

Morphological-molecular identification

Extraction of total fungal DNA was done using heads and stipes and a QIAGEN DNeasy Plant Minikit (50) extraction kit, according to the manufacturer's protocol (DNeasy® Plant Handbook, 2012). Sequenced DNA samples were KJ543564 (celes1), KJ543565 (celes2), KJ543566 (onesi1) and KJ543567 (onesi2). To ensure the quality of the DNA extracted, the samples were placed in 1 % agarose gel and electrophoresed at 88 volts for 30 min. All the DNA extracted was delivered to Macrogen Inc., Korea, for ITS region amplification and simultaneous sequencing with ITS1 primers (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), according to the protocol described by White *et al.* (1990), Glass and Donaldson (1995), and Pazoutová (2001). The amplified fragments were sequenced, and the sequences obtained were stored at NCBI (National Center for Biotechnology Information) to be subsequently compared with sequences available in the data bank with the "Nucleotide

tos en la germinación y el desarrollo del hongo *in vitro*. El experimento se estableció en condiciones de laboratorio siguiendo un diseño factorial 6x2 (medios de cultivo y tratamiento térmico), con tres repeticiones.

Identificación morfológico-molecular

La extracción del ADN total del hongo se obtuvo de cabezuelas y estípites utilizando el kit de extracción QIAGEN DNeasy Plant Minikit (50) de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante (Dneasy® Plant Handbook, 2012). Las muestras de ADN secuenciadas fueron KJ543564 (celes1), KJ543565 (celes2), KJ543566 (onesi1) y KJ543567 (onesi2). Para verificar la calidad del ADN total, las muestras se colocaron en un gel de agarosa 1 % y se sometieron a electroforesis a 88 volts por 30 min. El ADN total extraído se envió a Macrogen Inc., Korea, para la amplificación de la región del ITS y su secuenciación simultánea utilizando los iniciadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGACCTGCGG 3') e ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') de acuerdo con el protocolo descrito por White *et al.* (1990), Glass y Donaldson (1995) y Pazoutová (2001). Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y las secuencias obtenidas se depositaron en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) para posteriormente compararlas con las disponibles en el banco de datos, utilizando la herramienta "Nucleotide BLAST". Para el análisis filogenético, las secuencias obtenidas en este estudio fueron comparadas con las reportadas por Pazoutová para *Claviceps gigantea* y *C. sorghi* utilizando el programa Mega 7 y el procedimiento UPGMA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BLAST" tool. For the phylogenetic analysis, the sequences obtained in this study were compared with the sequences reported by Pazoutová for *Claviceps gigantea* and *C. sorghi* using the Mega 7 program and according to the UPGMA procedure.

RESULTS AND DISCUSSION

Sclerotia germination in the lab

Sclerotia germination was observed only in the treatment containing residual charcoal during a three-month incubation period at 4 °C and a two-month period at 22-24 °C (Figure 3C); for this reason no statistical analysis were performed. The only sclerotia that germinated were the ones which had received the treatment containing residual charcoal during a three-month incubation period at 4 °C and a two-month period at 22-24 °C (Figure 2C); for this reason, no statistical analysis was performed. Under this treatment 55.5 % of sclerotia germinated. Osada (1984) obtained only 47 and 48 primordia of stipes from sclerotia placed at 18 °C that were pre-treated at 4 °C for 8 and 16 d, respectively. Regarding *C. purpurea*, Hadley (1968) reported 50 % germination mostly due to low soil moisture during sclerotia germination. A three-month cold treatment (4°C), residual charcoal moisture and temperature change to 22-24 °C during two months simulated natural field conditions where the sclerotia are found, to facilitate their germination.

For the laboratory experiment, the only substrate that facilitated sclerotia germination was residual charcoal. According to Villamagua *et al.* (2008), in greenhouse tomato experiments (*Solanum lycopersicum* L.), vegetal charcoal added to the soil increased production of tomatoes due to increased soil porosity and structure, as well as N, P, K, Zn,

Germinación de esclerocios en laboratorio

La germinación de esclerocios se observó únicamente en el tratamiento que contenía carbón residual, con un período de incubación de tres meses a 4 °C y dos meses a 22-24 °C (Figura 3C), por lo que no se realizó análisis estadístico. El 55.5 % de los esclerocios germinaron en este tratamiento. Osada (1984) indica que solamente obtuvo 47 y 48 yemas preformadoras de estípites a partir de esclerocios colocados a 18°C con pretratamiento de 4 °C por 8 y 16 d, respectivamente. En *C. purpurea*, Hadley (1968) reportó una germinación de

Ca, Mg, Mn and Cu availability. These elements may act as nutrients during seed germination and plant nutrition, so they probably had the same effect on sclerotia used in this study.

Sclerotia germination in the field

From the sample placed in El Rosedal Ranch to determine sclerotia germination in the field, 46 % germination was reported. These germination averages are low but they are similar to those reported by Pazoutová *et al.* (2011), who stated that germination for stromatic heads formation is



Figura 3. *Claviceps gigantea*: A) inicio de la germinación donde se observan primordios de las cabezuelas estromáticas 64 d después del establecimiento en campo, B) estípites y cabezuelas estromáticas, C) esclerocios con estípites completamente desarrollados, D) esclerocios con estípites y cabezuelas delgadas y marchitas después de la liberación de ascosporas (Escala 1 cm).

Figure 3. *Claviceps gigantea*: A) Germination begins where primordia of stromatic heads are visible 64 days after field establishment; B) stipe and stromatic heads; C) fully developed stipes of sclerotia; D) sclerotia with thin and wilt stipes and heads after ascospores release (1 cm scale).

50%, limitado principalmente por baja humedad en la tierra durante la germinación del esclerocio. El tratamiento en frío (4°C) durante 3 meses, la humedad del carbón residual y el cambio de temperatura a 22 – 24°C por 2 meses simulan las condiciones naturales del campo donde se encuentran los esclerocios, facilitando su germinación.

En el presente experimento en laboratorio, el único sustrato que facilitó la germinación de esclerocios fue el carbón residual. Según Villamagua *et al.* (2008), en trabajos en invernadero con jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), el carbón vegetal añadido al suelo mostró un incremento en la producción de frutos debido al incremento en la porosidad y la estructura del suelo y en la disponibilidad de N, P, K, Zn, Ca, Mg, Mn y Cu, que pueden actuar como nutrientes en la germinación de las semillas y nutrición de la planta, los que probablemente tuvieron el mismo efecto sobre los esclerocios en el presente estudio.

Germinación de esclerocios en campo

En la muestra colocada en el Rancho El Rosedal para determinar la germinación de esclerocios en campo, se determinó un porcentaje de germinación de 46.6 %. Estos promedios de germinación son bajos, pero coinciden con lo señalado por Pazoutová *et al.* (2011), quienes mencionaron que la germinación para la formación de cabezuelas estromáticas es difícil en la mayoría de las especies de *Claviceps*, ya que requieren diferentes tratamientos para eliminar la dormancia (Kunfer and Seckring, 1977). Entre los tratamientos se observó que las temperaturas bajas tienen efectos importantes en los procesos fisiológicos del esclerocio al aumentar: 1) la absorción del agua proveniente del medio ambiente, 2) aumentar la tasa de respiración y, 3) incrementar el metabolismo de los lípidos almacenados. La presencia de lípidos en el esclerocio

difficult in most of the *Claviceps* species given that different treatments to stop dormancy are required (Kunfer and Seckring, 1977). The study showed that, among treatments, low temperatures have important effects on the physiological processes of sclerotia because they increase 1) absorption of water from the environment; 2) respiration rate, and 3) metabolism of stored lipids. The presence of lipids in sclerotia suggests that just after, or during, the cold activation treatment, enzymes are activated that hydrolyze lipids probably to convert them into manitol (Mitchell and Cooke, 1968).

In the field, emergence of primordia in sclerotia was observed after 3 months of incubation at 4 °C and 64 d after sclerotia were placed in the field at 14 °C average temperature, 76 % relative humidity and 705 mm accumulated precipitation during June-September 2013 (Figure 3A). Fully developed structures were observed 23 d after primordia emergence (Figure 3B). For the municipality of Almoloya de Juárez, Mucikovskiy and Moreno (1971) reported 13-15 °C annual temperature and 1000 mm annual precipitation when they observed horse's tooth in the State of Mexico, while in this study the annual average relative humidity was 65.26 % and total accumulated precipitation was 832.8 mm. According to Cooke and Mitchell (1967), in nature it takes around one week from germination of *C. purpurea* sclerotia to stromal maturity.

In the field, when maize is harvested, between autumn and winter, sclerotia fall down. From autumn to spring, sclerotia are exposed to low temperature and frequent frosts for a 6-9 month period. At the end of this period, temperature and moisture increase, and the host is available; this means the life cycles of the pathogen and host are synchronized, allowing disease development.

Stipe emergence and development, and head

sugiere que inmediatamente después, o durante el tratamiento de activación por frío, se activan enzimas que hidrolizan los lípidos posiblemente para su conversión en manitol (Mitchell y Cooke, 1968).

En el campo, la aparición de primordios en los esclerocios se observó después de 3 meses de incubación a 4 °C y 64 d después de que se colocaron en el campo a temperatura promedio de 14° C, humedad relativa de 76 % y una precipitación acumulada de 705 mm durante junio-septiembre, 2013 (Figura 3A). Las estructuras completamente desarrolladas se observaron 23 d después de aparecer los primordios (Figura 3B). Fucikovsky y Moreno (1971) reportaron una temperatura anual en el municipio de Almoloya de Juárez de 13-15 °C y una precipitación anual de 1000 mm cuando observaron el diente de caballo en el estado de México, mientras que en el presente estudio la humedad relativa promedio anual fue 65.26 % y la precipitación acumulada total fue 832.8 mm. Según Cooke y Mitchell (1967), 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.

En campo, 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 temperaturas bajas y heladas frecuentes por un período de 6 a 9 meses. Al terminar éste período, la temperatura y humedad aumentan y el hospedante se encuentra disponible, sincronizando el ciclo biológico del patógeno y el hospedante para el desarrollo de la enfermedad.

Tiempo de emisión y desarrollo de estípites y formación de cabezuelas

Los primeros indicios de germinación de los esclerocios, tanto en laboratorio como en campo, fue

formation

The first signs of sclerotia germination, both in the lab and the field, were emergence of stromatic heads five months after the experiment began (three months at 4 °C and two at 22-24 °C) (Figure 3A). Primordia emerges from sclerotia in the form of light colored globose protuberances. The germination period was at least 6 months faster than the period reported by De la Isla and Fuentes (1963) and Fuentes *et al.* (1964), who observed *C. gigantea* sclerotia germination after 12 months under an alternate temperature treatment (4-2 °C and 22-28 °C from 1 to 2 periods of 8 months) and constant periods (12 °C during 4 months in darkness).

Cooke and Mitchell (1967) mentioned that in nature the inoculum potential of sclerotia populations depends on the number of heads produced, which is related to the size of the sclerotium. In this study sclerotia produced from three to nine heads, with an average of five heads per sclerotium. Protuberances were constrained to the base to form the body of the stipe. Stromatic heads were formed on the tip of the stipe and matured after 15 days under lab conditions, and 23 days in the field, after primordia emergence (Figures 3B and C). As the stromatic head matured, its color changed from light to dark brown; it also showed points or papilla that were actually the ostioles of the perithecia immersed in the head, from which they protruded slightly. These observations were similar to germination of *C. purpurea*, *C. sorghicola* and *C. africana* described by Hadley (1968), Loveless and Peach (1986) and Tsukiboshi *et al.* (2001).

We observed that the germination of sclerotia and the formation of primordia, stipes and heads are not synchronized, which suggests that ascospores are released over a long period of time (Figure 3D)

la observación de los primordios de las cabezuelas estromáticas que ocurrió cinco meses después de iniciado el experimento (tres meses a 4 °C y dos a 22-24 °C) (Figura 3A). Los primordios se observaron como protuberancias globosas de color claro emergiendo de los esclerocios. Este tiempo de germinación fue al menos 6 meses más rápido comparado con el reportado por De la Isla y Fuentes (1963) y Fuentes *et al.* (1964), quienes observaron la germinación de esclerocios de *C. gigantea* después de 12 meses con un tratamiento de temperatura alternada (4- 2 °C y de 22-28 °C, por períodos de una a dos semanas por 8 meses) y constante (12 °C por 4 meses en oscuridad).

Cooke y Mitchell (1967), mencionan que en la naturaleza el potencial de inóculo de una población de esclerocios depende del número de cabezuelas que puede producir lo cual se relaciona con el tamaño del esclerocio. En el presente estudio los esclerocios produjeron de tres a nueve cabezuelas, con un promedio de cinco por esclerocio. Las protuberancias se constriñeron en la base para formar el cuerpo del estípite. En la punta del estípite se formaron cabezuelas estromáticas que maduraron después de 15 d en condiciones de laboratorio y 23 d en campo, después de la aparición de los primordios (Figuras 3B y C). Durante el proceso de maduración de la cabezuela estromática ésta mostró un cambio en la coloración de café claro a oscura y la presencia de puntos o papilas que correspondían a los ostiolos de los peritecios inmersos en la cabezuela de la que sobresalen ligeramente. Estas observaciones son similares al proceso de germinación de esclerocios de *C. purpurea*, *C. sorghicola* y *C. africana* descritas por Hadley (1968), Loveless y Peach (1986) y Tsukiboshi *et al.* (2001).

Se observó que los esclerocios no tienen sincronización en su germinación, formación de primordios, estípites ni cabezuelas, lo que sugiere que existe un amplio rango de tiempo en la libera-

Ascospore production and release

For the first time, it was possible to record ascospore release using (Sony Cyber-shot (modelo DSC-W120) (Figure 4). Under a stereoscopic microscope, we observed ascospores emerging from the ostioles of the perithecia; they were very thin, long structures that floated in space due to their lack of weight or, possibly, to geotropism.

According to Loveless and Peach (1986), *C. purpurea* ascospores can be easily observed floating in the air over the stromatic head. Lutrell (1977) and Prakash *et al.* (1983) reported that they observed *C. paspali* and *C. fusiformis* ascospores discharge under the microscope by focusing on the ostioles of the perithecia (Figure 4), while Pazoutová and Parbery (1999) also observed asci tips emerging from ostioles. Ascomycetes are able to discharge ascospores either by ejecting them into the air several centimeters away or exuding them slowly as a mucilaginous mass accumulated around the ostiole (Loveless y Peach, 1986).

No ascospores were observed on inverted sclerotia immersed in distilled water for night monitoring. When germinated and differentiated stromas in the stipe and strome were inversely placed into bottles, the structures turned dark and porous, and stopped their normal development and maturity. However, no ascospores were captured on slides with lactophenol cotton blue stain or distilled water even when the distance between heads and slides was only about 10 cm.

According to outputs of this study, *C. gigantea* germination, formation of stipes, perithecia and ascae, and ascospores release, took about 175 days.

Ascospores growth in culture medium

No growth was observed in the 6 media used in this study (PDA, AHM, EMA, AA, AAD and

ción de ascosporas (Figura 3D).

Producción y descarga de ascosporas

Se logró grabar por primera vez en video (Sony Cyber-shot (modelo DSC-W120) (Figura 4F) la liberación de ascosporas. En microscopio este-reoscópico se observó la liberación de ascosporas emergiendo de los ostiolos de peritecios como estructuras muy delgadas y alargadas que flotaban en el espacio, debido a su falta de peso o un posible fenómeno de geotropismo.

Según Loveless y Peach (1986), las ascosporas de *C. purpurea* se observan a simple vista en el aire sobre la cabezuela estromática. Lutrell (1977) y Prakash *et al.* (1983) reportaron la descarga de ascosporas de *C. paspali* y *C. fusiformis* directamente con un microscopio, enfocando en los ostiolos de los peritecios (Figura 4C), mientras que Pazoutová y Parbery (1999) también observaron las puntas de las ascas emergiendo del ostiolo. 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 acumulada alrededor del ostiolo (Loveless y Peach, 1986).

No se observaron ascosporas de los esclerocios invertidos con agua destilada estéril en la base que se utilizaron para el monitoreo nocturno. Cuando los estromas germinados y diferenciados en estípites y estroma se colocaban invertidos en los frascos, estas estructuras tomaban un color oscuro y una apariencia rugosa sin continuar su desarrollo normal y madurez. Sin embargo, no se logró captura de ascosporas en portaobjetos con azul de lactofenol o agua destilada aun cuando la distancia entre las cabezuelas y los portaobjetos fue de aproximadamente 10 cm.

De acuerdo con los resultados de éste estudio, en *C. gigantea* el proceso de germinación, forma-

Agar-Maize) and the thermal treatment at 50 °C. Deacon (2006) states that for ascospores *in vitro* germination and growth some stimulants are needed, such as carbohydrates and heat shocks to interrupt ascospores dormancy and induce germination. However, in this study we were not able to obtain pure crops from ascospores.

Morphological and molecular identification

Longitudinal sections of fine sections of heads showed a number of pyriform perithecia embedded in the peripheral region of the tissue. Perithecia showed asci, paraphyses and ascospores. Perithecia ostioles reached the head surface (Figures 4A, B). Pazoutová and Parbery (1999) stated that the size and form of perithecia depend on their maturity level. Young perithecia are small, oblong-to-oval shaped, while old perithecia are often elipsoidalto-pyriform; these features are also shown in this study (Figure 4B).

Measurements of perithecia (Figure 4C) were 404.9-569.3 x 151.3-284.4 µm, with 187-265.3 µm long asci containing 8 ascospores of 169.6-263.7 x 1.0-2.1 µm. The size of these structures was larger than the one reported by Fuentes *et al.* (1964). According to Loveless (1964) and Pazoutová and Parbery (1999), the length of stringy ascospores of the *Claviceps* genus is a taxonomically reliable attribute, provided that measures are taken soon after they are ejected from asci (Figures 4E, F). The size of perithecia is also taxonomically reliable because it is a constant characteristic of mature stromas (Loveless, 1967).

The sequence analysis of the partial region of the 18s gen, full ITS1, full 5.8s, full ITS2 and partial 28s, showed that the four sequences stored in NCBI No. KJ543564 (celes1), KJ543565 (celes2), KJ543566 (onesi1) and KJ543567 (onesi2) are 99 % identical to AJ133394.2 (*Claviceps gigantea*

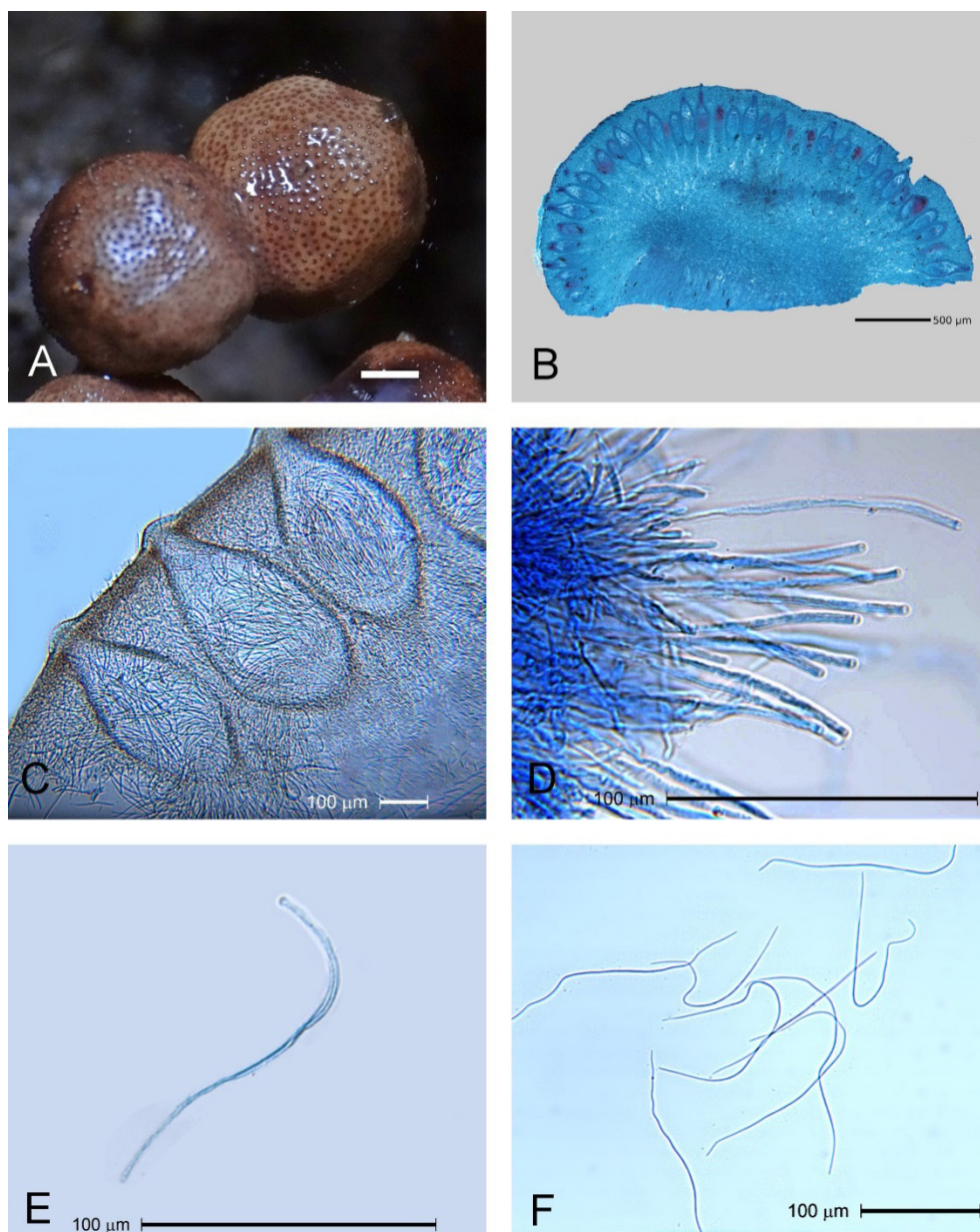


Figura 4. Estructuras sexuales resultado de la germinación de esclerocios en condiciones de laboratorio. Cortes longitudinales de cabezuelas estromáticas muestran: A) Peritecios con diferente grado de desarrollo, B) Peritecios con ascas y ascosporas teñidos con azul de lactofenol, C) Ascas intercaladas con parafisos, D) Ascas con ascosporas y E) Ascosporas expulsadas de los peritecios.

Figure 4. Sexual structures from sclerotia germination under lab conditions. Stromatic head longitudinal cuts show: A) Perithecia with different development level; B) Perithecia with asci and ascospores stained with lactophenol cotton blue; C) Asci interspersed with paraphyses; D) Asci with ascospores; and E) Ascospores ejected from perithecia.

ción de estípites, cabezuelas estromáticas, peritecios, ascas y hasta la expulsión de las ascosporas se logró en un total de aproximadamente 175 d.

Crecimiento de ascosporas en medio de cultivo

No se observó ningún crecimiento en los 6 medios probados en este estudio (PDA, AHM, EMA, AA, AAD y Agar-Maíz) y el tratamiento térmico a 50 °C. Deacon (2006) mencionó que para la germinación de ascosporas y su crecimiento *in vitro* son necesarios algunos estímulos como, la presencia de carbohidratos y los choques de calor para interrumpir la dormancia de las ascosporas e inducir su germinación, pero en el presente estudio no se logró obtener cultivos puros a partir de ascosporas.

Identificación morfológico - molecular

Las secciones longitudinales de los cortes hechos a mano y los cortes finos de las cabezuelas revelaron numerosos peritecios piriformes embebidos en la región periférica del tejido. En los peritecios se observaron ascas, parafisos y ascosporas. El ostiolo de los peritecios alcanzaba la superficie de la cabezuela (Figuras 4A, B). Pazoutová y Parbery (1999) mencionaron que el tamaño y forma de los peritecios dependen de su grado de madurez. Los peritecios jóvenes son pequeños, oblongos a ovales, mientras que los maduros generalmente son elipsoides a piriformes, lo que igualmente se muestra en los resultados del presente estudio (Figura 4B).

Los peritecios (Figura 4C) midieron de 404.9-569.3 x 151.3-284.4 µm, con ascas de 187-265.3 µm de largo, que contenían 8 ascosporas de 169.6-263.7 x 1.0-2.1 µm. Las dimensiones de éstas estructuras observadas fueron mayores a las reportadas por Fuentes *et al.* (1964). Según Loveless (1964) y Pazoutová y Parbery (1999),

Pazoutová). The five samples were compared with *Claviceps sorghi* from another phylogenetic group (Figure 5) (Pazoutová, 2001). Both characteristics, morphological and molecular, confirmed the *Claviceps gigantea* species. Fuentes, De la Isla, Ullstrup and Rodríguez.

CONCLUSIONS

- In the lab, sclerotia germination and formation of stipes was achieved after incubation using residual carbon for 90 days at 4 °C and 60 d at 22 °C, formation of heads in 15-23 d, and ascospores release in 15 d.
- The germination of sclerotia, formation of reproductive structures and ascospores release are not synchronized
- There was no effect using temperature treatments or culture medium in ascospores germination. For the first time, it was possible to electronically record ascospore release (video).
- Morphological and molecular characteristics contributed to identify the fungus as *C. gigantea*.
- From the DNA sequences obtained from the sexual structures, from DNA analysis (AJ133394.2), the identity of *C. gigantea* at molecular level was confirmed; this first report was delivered to the Gene Bank.
- These results will facilitate the establishment of integrated management programs and the study of the life cycle of the pathogen.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

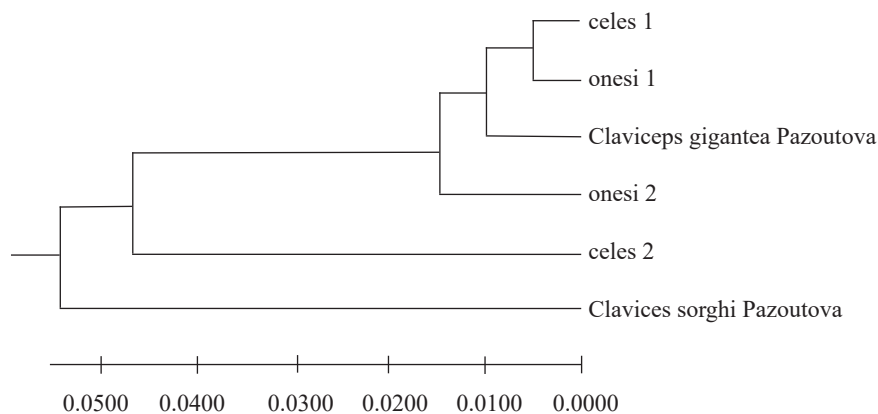


la longitud de las ascosporas filiformes del género *Claviceps* es un carácter taxonómico confiable, condicionado a que las medidas se realicen después de ser expulsadas del asca (Figuras 4E, F). El tamaño de los peritecios también se considera otro criterio taxonómico confiable, ya que es un carácter constante de un estroma maduro (Loveless, 1967).

El análisis de la secuencia de la región parcial del gen 18s, ITS1 completo, 5.8s completo, ITS2 completo y parcial del 28s, mostró que las cuatro secuencias depositadas en NCBI No. KJ543564 (celes1), KJ543565 (celes2), KJ543566 (onesi1) y KJ543567 (onesi2) tienen un porcentaje de identidad de 99 % con AJ133394.2 (*Claviceps gigantea* Pazoutová). Estas cinco muestras se compararon contra *Claviceps sorghi* que perteneció a otro grupo filogenético (Figura 5) (Pazoutová, 2001). Tanto las características morfológicas (Fuentes *et al.*, 1964) como moleculares confirmaron la especie como *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez.

## CONCLUSIONES

- En laboratorio, se logró la germinación de esclerocios y formación de estípites después de incubación en carbón residual por 90 d a 4 °C y 60 d a 22 °C, formación de cabezuelas en 15-23 d y liberación de ascosporas en 15 d.
- No se encontró sincronización en la germinación de esclerocios, formación de estructuras reproductivas y liberación de ascosporas.
- No hubo efecto del tratamiento con temperaturas ni medios de cultivo en la germinación de las ascosporas.
- Por primera vez, la expulsión de ascosporas en esta especie se documentó electrónicamente (en video).
- Las características morfológicas y moleculares permitieron identificar al hongo como *C. gigantea*.



**Figura 5.** Relación filogenética de secuencias de cuatro muestras de ADN de *C. gigantea* comparadas con las secuencias de *C. gigantea* y *C. sorghi* reportadas previamente por Pazoutová (2001) en el NCBI.

**Figure 5.** Phylogenetic relation of the sequences of four *C. gigantea* DNA samples compared with sequences of *C. gigantea* and *C. sorghi* previously reported by Pazoutová (2001) at NCBI.

- De las secuencias de ADN que se obtuvieron a partir de las estructuras sexuales, en los análisis de ADN (AJ133394.2) se confirmó la identidad de *C. gigantea* a nivel molecular; este primer reporte quedó consignado en el Banco de Genes.
- Estos resultados facilitarán el establecimiento de programas de manejo integrado de la enfermedad y el estudio de la biología del patógeno.

## LITERATURA CITADA

- Aguere, S. L., Ramstad, E., and Ullstrup, A. J. 1963. The alkaloids of maize ergot. *Planta Medica* 11: 392-398. DOI: 10.1055/s-0028-1100254
- CMI (Commonwealth Mycological Institute). 1974. *Plant Pathologist's Pocketbook*. Kew, Surrey, England. 267 p.
- Cooke, R. C., and Mitchell, D. T. 1967. Germination pattern and capacity for repeated stroma formation in *Claviceps purpurea*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 50:275-283. DOI: 10.1016/S0007-1536(67)80038-X
- Cunfer, B. M., and Seckinger, A. 1977. Survival of *Claviceps purpurea* and *C. paspali* sclerotia. *Mycologia* 69: 1142-1148. DOI: 10.2307/3758937
- Deacon, J. W. 2006. *Fungal Biology*. 4<sup>a</sup> ed. Blackwell Publ. England. 384 p.
- De la Isla, Ma. L. y Fuentes F., S. 1963. Germinación de esclerocios de *Sphacelia* sp., causante del "Diente de caballo" en el maíz. *Agric. Téc.* 3:119.
- Dneasy plant handbook Qiagen. 2012. Protocolo del proveedor. p. 22-2 <http://www.qiagen.com/knowledgeandsupport/resourcecenter/resourcedownload.aspx?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=e> (Consulta: enero 2014)
- Fucikovskiy, L. y Moreno, M. 1971. Distribution of *Claviceps gigantea* and its percent attack on two lines of corn in the State of México, México. *Plant Dis. Repr.* 55:231-233. <http://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=mdp.39015001262727;view=lup;seq=11>
- Fuentes F, S. y De la Isla, Ma. de L. 1961. Una enfermedad desconocida del maíz el "Diente de caballo". *Agric. Téc.* 12:11-12.
- Fuentes, S. F., De la Isla, M. de L., Ullstrup, A. J., and Rodríguez, A. E. 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167388/pdf/611323.pdf>
- Hadley, G. 1968. Development of stromata in *Claviceps purpurea*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 51: 763-769.
- Kulkarni, U. K. 1963. Initiation of the dikaryon in *Claviceps microcephala* (Wallr.) Tul. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. pp:19-22. <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02053250>
- López, C. M. L., Márquez, J. y Murguía, G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Libro de laboratorio. 2<sup>a</sup> ed. Fac. de Ciencias, UNAM. México. 178 p.
- Loveless, A. R. 1964. Use of the honeydew state in the identification of ergot species. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 47:205-213. DOI: 10.1016/S0007-1536(64)80054-1
- Loveless, A. R. 1967. A new species of *Claviceps* on *Cyperaceae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 50:19-22. DOI:10.1016/S0007-1536(67)80059-7
- Loveless, A. R., and Peach, J. M. 1986. Evidence from ascospores for host restriction in *Claviceps purpurea*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 86:603-610. DOI:10.1016/S0007-1536(86)80063-8
- Luttrell, E. S. 1977. The disease cycle and fungus-host relationships in dallisgrass ergot. *Phytopathology* 67:1461-1468. DOI: 10.1094/Phyto-67-1461.
- Mitchell, D. T. and Cooke, R. C.. 1968. Water uptake, respiration pattern and lipid utilization in sclerotia of *Claviceps purpurea* during germination. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 51:731-736. DOI:10.1016/S0007-1536(68)80093-2
- Moreno M. y Fucikovskiy, L. 1972. Efecto de la posición y el número de esclerocios de *Claviceps gigantea* sobre la germinación de granos de maíz. *Fitopatología* 5:7-9.
- Osada-K., S. 1984. Estudio sobre la germinación del cornezuelo del maíz e interacción-hospedante parásito (*Zea mays* L.-*Claviceps gigantea* Fuentes *et al.*). Tesis doctoral. Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Méx. 86p.
- Osada, S. K., Fucikovskiy, Z. L., Ortega D., M. L. y Engleman, E. M. 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. DOI:10.1017/S0953756201003562
- Pazoutová, S., and Parbery, D. P. 1999. Ergot: the genus *Claviceps*: The taxonomy and phylogeny of *Claviceps*. *Hardwood Acad. Publ., London.* 499 p.
- Pazoutová, S., Odvody, G. N., Frederickson, D. E., Chudíková, M., Olšovská, J., and Kolarik, M. 2011. New *Claviceps* species from warm-season grasses. *Fungal Diversity* 49:145-165. DOI:10.1007/s13225-011-0102-4
- Pedroza-Sandoval, A. 2010. Epidemiología fitosanitaria. Univ. Autónoma Chapingo. pp. 1-28.
- Prakash, H. S., Shetty, H. S., and Safeulla. K. M. 1983. Germination and nuclear behavior of sexual and asexual propagules of *Claviceps fusiformis*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 81:65-69. <http://eurekamag.com/research/005/522/005522683.php>
- SAGARPA-SIAP (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2014. Producción Nacional de Maíz en Grano. Consultado en: [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx).
- Tsukiboshi, T., Shimanuki, T., and Koga, H. 2001. *Claviceps sorghicola* and *C. africana*, the ergot pathogens of sorghum, and their cultural control

- in Japan. Japan Agric. Res. Quart. 35:221-226. <https://www.jircas.affrc.go.jp/english/publication/jarq/35-4/35-04-02.pdf>
- 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. Rev. Cient. (Ecuador) 8:85-100. <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/362>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p:315-322. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (Eds). PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego. DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1