



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN, ANÁLISIS, CUANTIFICACIÓN Y ENFOQUE TOXICOLÓGICO DE COMPUESTOS SECUNDARIOS DE *Claviceps gigantea*

ALMA ROSA SOLANO BÁEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Alma Rosa Solano Báez, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Carlos De León Garcia de alba, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Identificación, análisis, cuantificación y enfoque toxicológico de compuesto secundarios de Claviceps gigantea. y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 27 de noviembre de 2017


Firma del
Alumno (a)


Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Identificación, análisis, cuantificación y enfoque toxicológico de compuestos secundarios de *C. gigantea***, realizada por la alumna **Alma Rosa Solano Báez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Carlos De León Garcia de Alba

ASESOR



Dr. S. Gerardo Leyva Mir

ASESORA



Dra. Adriana Delgado Alvarado

ASESOR



Dr. Juan Manuel Cuca García

ASESOR



Dr. Javier Hernandez Morales

IDENTIFICACIÓN, ANÁLISIS, CUANTIFICACIÓN Y ENFOQUE TOXICOLÓGICO DE COMPUESTOS SECUNDARIOS DE *Claviceps gigantea*

ALMA ROSA SOLANO BÁEZ, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

El hongo *C. gigantea*, parásita la inflorescencia femenina de maíz, produciendo esclerocios en lugar de semillas, se desarrolla en nichos con alta precipitación y bajas temperaturas. Los esclerocios producen alcaloides del tipo clavina. Existen antecedentes limitados del daño de estos compuestos en mamíferos, a pesar de haber zonas productoras del cultivo con incidencia del 90 %. Se planteó, determinar la distribución de *C. gigantea* en Valles Altos de México, diferenciar morfológica y molecularmente los aislados, determinar la concentración de alcaloides en esclerocios provenientes de esos diferentes sitios y determinar la actividad biológica de los compuestos presentes en esclerocios en gazapos. Por lo que, se realizaron recorridos de campo para la búsqueda de material sospechoso de *C. gigantea*. Con las muestras colectadas se elaboraron cultivos monospóricos de aislados asociados a *Sphacelia* sp. para analizar las características culturales de las colonias. De manera complementaria se amplificaron y secuenciaron fragmentos de las regiones Internal Transcribed Spacer (ITS) 1, 5.8S rRNA, NL4 y parte de la subunidad grande del ribosoma (LSU) y así caracterizar molecularmente las colonias. Con relación a la patogenicidad de los aislados se efectuaron pruebas de patogenicidad y se determinó el mejor método de inoculación. Se analizaron cualitativa y cuantitativamente los alcaloides presentes en los esclerocios por cromatografía en capa fina y cromatografía de líquidos de alta resolución respectivamente. La actividad biológica de los metabolitos se determinó en conejos machos, con dietas experimentales, donde se agregó polvo de esclerocios en sustitución de harina de alfalfa. Se evaluó peso vivo, consumo alimenticio y conversión alimenticia de cada conejo. Se tomaron muestras de sangre y finalmente, se les practicó la eutanasia. El hongo *C. gigantea* se encontró en zonas donde no estaba reportado como Hidalgo y Puebla. La cantidad de alcaloides encontrados en esclerocios es diferente en tiempo y espacio. El consumo de *C. gigantea* tiene efecto negativo, en relación con el peso corporal y consumo de alimento. Las necropsias revelaron anomalías proporcionales al consumo de alimento contaminado con esclerocios.

Palabras clave: Distribución- *Sphacelia* sp., morfología- *Sphacelia* sp. ergot-maíz, nutrientes-ergot, clavininas-efecto, ergot-gazapos.

IDENTIFICATION, ANALYSIS, QUANTIFICATION AND TOXICOLOGICAL APPROACH OF SECONDARY METABOLITES OF *Claviceps gigantea*

ALMA ROSA SOLANO BÁEZ, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

The fungus *C. gigantea*, parasitic female inflorescence of corn, producing sclerotia instead of seeds, develops in niches with high precipitation and low temperatures. Sclerotia produce clavine alkaloids. There is limited history of the damage of these compounds in mammals, despite the fact that there are areas producing the crop with an incidence of 90%. It was proposed to determine the distribution of *C. gigantea* in the High Valleys of Mexico, to differentiate morphologically and molecularly the isolates, to determine the concentration of alkaloids in sclerotia from these different sites and to determine the biological activity of the compounds present in sclerotia in rabbits. Therefore, field trips were conducted to search for suspect material of *C. gigantea*. With the collected samples, monosporic cultures of isolates associated with *Sphacelia* sp. to analyze the cultural characteristics of the colonies. In a complementary manner, fragments of the Internal Transcribed Spacer (ITS) 1, 5.8S rRNA, NL4 and part of the large subunit of the ribosome (LSU) regions were amplified and sequenced to characterize the colonies molecularly. In relation to the pathogenicity of the isolates, pathogenicity tests were carried out and the best method of inoculation was determined. The alkaloids present in the sclerotia were analyzed qualitatively and quantitatively by thin layer chromatography and high resolution liquid chromatography respectively. The biological activity of the metabolites was determined in male rabbits, with experimental diets, where sclerotium powder was substituted for alfalfa meal. Live weight, food consumption and feed conversion of each rabbit were evaluated. Blood samples were taken and finally, they were euthanized. The fungus *C. gigantea* was found in areas where it was not reported as Hidalgo and Puebla. The amount of alkaloids found in sclerotia is different in time and space. Consumption of *C. gigantea* has a negative effect, in relation to body weight and food consumption. The necropsies revealed anomalies proportional to the consumption of food contaminated with sclerotia.

Key words: Distribution- *Sphacelia* sp., morphology- *Sphacelia* sp., ergot-maize, ergot-nutrients, clavines- effect, ergot- juvenile rabbits.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fuerza para seguir adelante e iluminar mi camino y permitir que todo esto pasara.

Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) por la beca otorgada 214704.

Al Colegio de Postgraduados, por ser una institución que da la oportunidad de tener formación de alto nivel.

Instituto de Fitosanidad- Fitopatología, al personal académico, administrativo y de apoyo por sus enseñanzas, facilidades y atenciones brindadas durante este proceso.

A los doctores que fungieron como consejo particular Dr. Carlos De León G, Dr. S. Gerardo Leyva Mir, Dr. Juan Manuel Cuca García Dra. Adriana Delgado Alvarado y Javier Hernández Morales. En este proceso de aprendizaje y trabajo continuo, fue un honor trabajar bajo su dirección, pues cuentan con una vida de experiencias que no dudaron en compartir, cada uno apporto de manera precisa sus conocimientos, asesoría, y disponibilidad para poder terminar con esta investigación. Agradezco la confianza que depositaron en mi para el desarrollo de esta investigación.

“Si he visto más lejos es porque estoy sentado sobre los hombros de gigantes” Bernardo de Chartres, Isaac Newton febrero de 1676 a Robert Hooke.

Al Dr. Miroslav Kolařík, Eva Stodůlková, Miroslav Flieger, y todo su equipo de trabajo del Laboratorio de Microbiología de La Academia de Ciencias de Republica Checa, por haber abierto la puerta de su laboratorio, por sus atenciones y facilidades durante la estancia de investigación. Y por su valioso tiempo para mostrarnos las bellezas de Republica Checa.

Al Dr. Ernesto Ávila González por su colaboración en el análisis de aminoácidos y facilidades en la peletización.

Dr. Guillermo Márquez Licona por tu apoyo técnico, intercambio de ideas y debates fitosanitarios, por tu incansable apoyo moral.

Infinitas gracias por tu tiempo, tu ayuda ha sido fundamental en esta etapa de nuestra vida, sigamos superando metas y conquistando sueños.

A toda la familia Solano-Báez y mi tía consentida Martha García Castañeda, su apoyo fue indispensable para llegar a este punto de mi formación académica, gracias a sus consejos, palabras de aliento, la motivación que me brindan ininterrumpidamente, su cariño y comprensión siempre me ha inspirado.

DEDICATORIA

A los pilares de mi vida

A mi mami

Rosa Báez Castañeda

A mi Abue

Aurelia Castañeda Hernández

A mi esposo

Guillermo Márquez Licona

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	viii
LISTA DE CUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVO GENERAL	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
LITERATURA CITADA	3
ANTECEDENTES DE <i>C. gigantea</i>	4
Importancia del maíz	4
Enfermedades del maíz causadas por hongos y oomicetes	4
El género <i>Claviceps</i> y sus efectos tóxicos.....	5
El ergotismo en la Edad Media	6
Relación estrecha entre el ergotismo y la brujería	8
Importancia del género <i>Claviceps</i> en la agricultura	8
<i>C. gigantea</i> patógeno de maíz	9
Hospedantes de <i>G. gigantea</i>	9
Antecedentes de la interacción <i>C. gigantea</i> - Maíz.....	9
Producción de alcaloides tipo ergot por <i>C. gigantea</i>	10
Análisis de alcaloides	13
Cromatografía en capa fina (CCF)	13
Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	14
Cromatografía de líquidos en fase reversa	14
Electroforesis capilar.....	14
Características evolutivas de <i>C. gigantea</i>	15
LITERATURA CITADA	16

CAPITULO I. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA, CARACTERÍSTICAS CULTURALES Y ALCALOIDES DE <i>Sphaacelia</i> sp: <i>C. gigantea</i>	19
1.1 RESUMEN.....	19
1.2 ABSTRACT	20
1.3 INTRODUCCIÓN	21
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS	23
1.4.1 Monitoreo.....	23
1.4.2 Toma de muestra	23
1.4.3 Elaboración de cultivos monospóricos de aislados asociados a <i>Sphaacelia</i> sp.	26
1.4.4. Caracterización molecular.....	26
1.4.5 Prueba de patogenicidad.....	27
1.4.5.1 Manejo y Mantenimiento de aislamientos	27
1.4.5.2 Preparación de inóculo.....	27
1.4.5.3 Evaluación de tratamientos	28
1.4.5.4 Reaislamiento y análisis morfológico	29
1.4.6 Extracción de alcaloides de muestras de esclerocios colectadas de diferentes zonas geográficas	29
1.4.6.1 Extracción de alcaloides para análisis cualitativo	29
1.4.6.2 Extracción de alcaloides análisis cuantitativo	30
1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
1.5.1 Monitoreo.....	32
1.5.2 Caracterización Morfológica.....	35
1.5.2.1 Micobiota de esclerocios de <i>C. gigantea</i>	35
1.5.2.2 Morfometría y características culturales de <i>Sphaacelia</i> sp.	36
1.5.3 Caracterización molecular.....	39
1.5.4 Postulados de Koch	39
1.5.5 Análisis cualitativo de ergot alcaloides	43
1.5.6 Análisis cuantitativo Análisis cuantitativo.....	44
1.6 CONCLUSIONES	47
1.7 LITERATURA CITADA.....	48

CAPITULO II. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE <i>Claviceps gigantea</i> EN CONEJOS	
NUEVA ZELANDA	51
2.1 RESUMEN.....	51
2.2 ABSTRACT	52
2.3 INTRODUCCIÓN	53
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	54
2.4.1 Sitio de recolección de muestras	54
2.4.2 Detección de alcaloides en esclerocios de <i>C. gigantea</i>	54
2.4.3 Elaboración de dietas experimentales para conejo.....	55
2.4.4 Producción de pellets	57
2.4.5 Análisis de alcaloides en dieta experimental con esclerocios de <i>C. gigantea</i>	57
2.4.6 Diseño experimental y procedimientos	57
2.4.7 Parámetros clínicos considerados por el consumo de <i>C. gigantea</i>	58
2.4.8 Salud animal y comportamiento.....	58
2.4.9 Análisis estadístico.....	58
2.5 RESULTADOS	59
2.5.1 Sitio de recolección de muestras	59
2.5.2 Detección por cromatografía en capa fina.....	59
2.5.3 Cuantificación de alcaloides por HPLC en dietas experimentales para conejo	59
2.5.4 Manejo de conejos.....	63
2.5.5. Parámetros clínicos	64
2.5.6 Salud animal y comportamiento.....	64
2.6 DISCUSIÓN.....	65
2.6.1 Sitio de recolección de muestras	65
2.6.2 Cuantificación de alcaloides por HPLC en dietas experimentales para conejo	65
2.6.3 Manejo de conejos.....	66
2.6.4 Parámetros clínicos considerados por el consumo de <i>C. gigantea</i>	67
2.6.5 Salud animal y comportamiento.....	67
2.7 CONCLUSIONES	68
2.8 LITERATURA CITADA.....	69
CONCLUSIONES GENERALES	72

LISTA DE CUADROS

CAPITULO I

Cuadro 1. 1. Rutas de monitoreo para la búsqueda de material sospechoso de <i>C. gigantea</i> en cuatro estados de la República Mexicana.	23
Cuadro 1. 2. Medios de cultivo utilizados para promover el crecimiento de aislados asociados a <i>Sphacelia</i> sp. (Warham, 1999; Pažoutová 2001; Pažoutová <i>et al.</i> 2004; Muthusubramanian <i>et al.</i> ,2006).	24
Cuadro 1. 3. Tratamientos de inoculación en plantas de maíz con suspensión conidial de colonias asociadas a <i>Sphacelia</i> sp.	28
Cuadro 1. 4. Distribución actual e incidencia de <i>C. gigantea</i> en cuatro estados de la República Mexicana en materiales nativos y comerciales.	32
Cuadro 1. 5. Porcentaje de plantas infectadas con <i>C. gigantea</i> generadas con inoculación artificial del estado asexual (<i>Sphacelia</i> sp.) en los ciclos de cultivo 2016 y 2017, en Toluca Estado de México.	40

CAPITULO II

Cuadro 2. 1. Composición de las dietas experimentales para conejo de engorda con diferentes cantidades de polvo de <i>C. gigantea</i>	56
Cuadro 2. 2. Concentración de alcaloides en la dieta experimental. Porcentaje total de alcaloides por tratamiento con porciones incrementadas de ergot.	60

LISTA DE FIGURAS

REVISIÓN DE LITERATURA

- Figura 1. Ilustraciones del fuego de San Antonio. **A.** Grabado del Staatliche Graphische Sammlung de Munich, “San Antonio y las víctimas del Ignis sacer” donde las victimas suplican a San Antonio, a la altura de la cabeza del Santo se aprecian manos y pies cortados. **B.** Grabado de Johannes Wechtlin con una persona enferma que implora a San Antonio. Fuente: Illana-Esteban, 2008.7
- Figura 2. Rutas biosintéticas de alcaloides ergot con énfasis en Clavicipitacea. El color negro indica precursores, azules primeros pasos, verde pasos intermedios, púrpura pasos tardíos en Trichomaceae y rojo Clavicipitacea (Florea *et al.*, 2017). 12

CAPITULO I

- Figura 1. 1. Inoculación de plantas de maíz a los 92 días de siembra, con suspensión conidial de crecimientos fúngicos asociados a *Sphacelia* sp.28
- Figura 1. 2. Recolección de esclerocios de *C. gigantea* (tomadas en campos sembrados con maíz, en México). Puntos de colecta marcado en rojo.34
- Figura 1. 3. Hongos aislados de esclerocios de *C. gigantea* provenientes de diferentes zonas geográficas, colectados de 2012- 2015 en maíces comerciales y nativos.35
- Figura 1. 4. Morfometría de *Sphacelia* sp. A. Crecimiento en palizada de conidioforos simples.37
- Figura 1. 5. Características culturales de *Sphacelia* sp. (*C. gigantea*, teleomorfo). A. crecimiento micelial en medio de cultivo papa-dextrosa 20 días después de la siembra (dds). B crecimiento micelial en medio de T2- agar (Pazoutová *et al.*, 2004), 20 dds. C. micro-colonias de *Sphacelia* sp. con producción de mielecilla en medio de cultivo T2- agar 2 dds. D. Colonia fungosa de *Sphacelia* sp. formación de esporodoquios en medio de cultivo T2- agar 20 dds. acercamiento a 10 X.38
- Figura 1. 6. Mazorcas cosechadas, 60 días después de la inoculación en un híbrido comercial, Toluca, Estado de México ciclo de cultivo 2017. A. Mazorcas del testigo inoculado con agua destilada estéril. B. Mazorcas con signos de *C. gigantea* del tratamiento de aspersión.41

Figura 1. 7. Mazorcas cosechadas con signos de <i>C. gigantea</i> , 60 días después de la inoculación en un híbrido comercial, Toluca, Estado de México ciclo de cultivo 2017. A. Mazorcas inoculadas con inyección a 1×10^6 conidios/ml. B. Mazorcas inoculadas con inyección a 1×10^7 conidios/ml.....	42
Figura 1. 8. Cromatoplasmas de sílica gel. A expuesta a luz UV. B. asperjada con el reactivo de Van Urk.	43
Figura 1. 9. Cromatograma de HPLC de extracto crudo de esclerocios (UV 228 nm). Alcaloides obtenidos con diclorometano y amonio colectados en Calimaya, Estado de México.	45
Figura 1. 10. Contenido total de alcaloides en esclerocios de <i>C. gigantea</i> provenientes de Tenango, Estado de México y Acaxochitlan, Hidalgo, México.....	46
Figura 1. 11. Contenido total de alcaloides en esclerocios de <i>C. gigantea</i> provenientes de Ayequalulco, Puebla, México (muestra 5, 15 y 10) y Acaxochitlan, Hidalgo, México (muestra 20, 2 y 12).....	46
Figura 1. 12. Contenido total de alcaloides en 100 g de muestra de producto comercial elaborado a base de tortilla de maíz azul y amarillo.	47

CAPITULO II

Figura 2. 1. Esclerocios y Cromatograma de <i>Claviceps gigantea</i> colectados en Calimaya Estado de México. A. Signos típicos del anamorfo de <i>C. gigantea</i> . B- C. Cromatograma de HPLC de extracto crudo de esclerocios (UV 228 nm) C. Alcaloides obtenidos con diclorometano y amonio.	60
Figura 2. 2. Concentración de alcaloides ingeridos por conejos en un período de 4 semanas. a. DH-Elymoclavine b. Chanoclavine c. Pyroclavine d. Unknown alkaloid e. DH-Ergosine. Barra de error indica error estándar de la media.	62
Figura 2. 3. Variables evaluadas por cuatro semanas en conejos de 1 a 4 semanas a alimentados con dietas experimentales que contienen dosis incrementadas de esclerocios de <i>C. gigantea</i> , colectado en el estado de México. A: ganancia de peso B: consumo alimenticio, C: conversión alimenticia. Diferencias significativas con DMS ($p > 0.05$).....	63

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los miembros del género *Claviceps* son parásitos especializados de ciperáceas y gramíneas que afectan específicamente inflorescencias que son remplazadas por un esclerocio (Pažoutová, 2002). El hongo *C. gigantea*, parásito de la inflorescencia femenina de maíz, se desarrolla en climas con alta precipitación y bajas temperaturas (9-15 ° C) la primera vez que la enfermedad se describió se indicó que es un patógeno con un nicho ecológico restringido (Ullstrup, 1973). Su presencia se reportó en Amecameca y valle de Toluca en el Estado de México y Pátzcuaro, Michoacán (Fuentes *et al.* 1964). La incidencia de la enfermedad se incrementó, ya que se observó el diente de caballo en municipios aledaños a Toluca, Estado de México (Fučíkovsky y Moreno, 1971).

La información de la distribución actual de la enfermedad no está documentada, aun cuando se ha observado a *C. gigantea*, afectando maíces nativos y comerciales. Además de los daños causados por la infección del hongo y la disminución del rendimiento de grano, causa pérdidas en calidad, ya que, en mazorcas con esclerocios, los granos alrededor de estos se deforman y se afecta su germinación (Moreno y Fučíkovsky, 1971). Los esclerocios en estado fresco producen una mielecilla que se extiende por debajo de las brácteas y llega a granos no infectados desarrollando una coloración café y apariencia rugosa (Moreno y Fučíkovsky, 1971).

También, la calidad de la producción es afectada ya que el hongo produce una variedad de alcaloides incluyendo festuclavina, D-dihidrolisergol- (I), chanoclavina, y piroclavina (Agurell y Ramstad, 1965; Naude *et al.*, 2005). Las especies del género *Claviceps* producen alcaloides que inducen problemas de toxicidad en animales (Naude *et al.*, 2005).

La pérdida de calidad del grano ha causada de este fitopatógeno, afecta a los productores de maíz en regiones donde se presenta el hongo, lo cual limita la comercialización del grano a mercados internacionales, debido a que está mencionado en cuarentenas internacionales (Moreno-Manzano *et al.*, 2016); como es el caso de la comercialización que se está desarrollando entre México y China, en donde se ha descrito un protocolo de requisitos fitosanitarios para la exportación de maíz entre ambos países. En éste, el Artículo 2 menciona que el grano de maíz que se exporte deberá cumplir con las leyes y regulaciones fitosanitarias en materia de importación vigente en China, debiéndose encontrar libre de insectos vivos y plagas cuarentenadas definidas por el país destino. En el Artículo 3, se describe que la SAGARPA dará seguimiento y monitoreo a cultivos de maíz durante su etapa de desarrollo por medio de vigilancia y diagnósticos aprobados internacionalmente, para corroborar la ausencia de *Pantoea stewartii*, *Xanthomonas albilineas*, Maize Dwarf Mosaic Virus, Sugarcane

Mosaic Virus, Maize Chlorotic Mottle Virus, *Claviceps gigantea* y *Peronosclerospora sorghi*, con el fin de asegurar que el grano de maíz que se exporte a China se encuentra libre de estas plagas (SAGARPA, 2015).

Asimismo, para la movilización de maíz a Ecuador, de acuerdo con la Resolución No. 23 se menciona a *C. gigantea* entre los patógenos considerados como cuarentenados.

Los antecedentes mencionados resaltan la importancia de realizar el monitoreo de la enfermedad, un diagnóstico oportuno, así como determinar los efectos que pudieran tener en la ingesta del hongo o partes de él por animales de sangre caliente.

OBJETIVO GENERAL

Monitorear la distribución actual del hongo en México, determinar la variación genética y concentración de alcaloides presentes en esclerocios de diferentes zonas geográficas de *C. gigantea*, así como su actividad biológica en gazapos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer rutas de monitoreo para detección de material afectado por *C. gigantea*.
- Colectar material en que se sospeche presencia de *C. gigantea*.
- Caracterizar la variación genética de cultivos monospóricos de *C. gigantea*, con diferente origen geográfico.
- Detectar y cuantificar los alcaloides presentes en las muestras colectadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.
- Evaluar *in vivo* dietas experimentales con *C. gigantea* en gazapos.
- Analizar la cantidad y efecto de alcaloides consumidos en las dietas experimentales elaboradas.

LITERATURA CITADA

- Agurell, S. L. and E. Ramstad. 1965. A new ergot alkaloid from mexican maize ergot. *Acta pharmaceutica Suecica* 2: 231-238. Doi: 10.1055/s-0028-1100254.
- Fučíkovsky, L. y M. Moreno. 1971. Distribution of *Claviceps gigantea* and its percent attack on two lines of corn in the state of Mexico, Mexico. *Plant Disease Reporter*: 55(3):231-233.
- Fuentes, S.F., de la Isla L., Ullstrup, A.J., and A.E. Rodriguez. 1964. *Claviceps gigantea*, a new pathogen of maize in Mexico. *Phytopathology* 54:379-381.
- Naudè, T.W., Botha C. J, and J. H. Vorster. 2005. *Claviceps cyperi*, a new cause of severe ergotism in dairy cattle consuming maize silage and teff hay contaminated with ergotised *Cyperus esculentus* (nut sedge) on the Highveld of South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 72:23–37. Doi: 10.4102/ojvr.v72i1.221.
- Moreno-Manzano, C.E., De León-García de Alba, C., Nava-Díaz, C., y J.R. Sánchez-Pale. 2016. Germinación de esclerocios y formación de ascosporas de *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez. *Revista Mexica de Fitopatología*. 34(3):AC1-AC19. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1603-2.
- Pažoutová, S. 2002. The evolutionary strategy of *Claviceps*. In: White J. F., Bacon C. W., Hywel-Jones N. L., Spatafora J. W., (eds.) *Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol, and Cultural Impacts*. NY, USA: Marcel Drekker 329-354.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2015. Firma México y China protocolos sanitarios para incrementar y abrir exportaciones de productos agroalimentarios mexicanos. Disponible en línea <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B631.aspx>. Consultado el 10/10/2016.
- Ullstrup, A.J. 1973. Maize ergot: a disease with a restricted ecological niche. *PANS*. 19(3): 389-390

ANTECEDENTES DE *C. gigantea*

Importancia del maíz

El maíz (*Zea mays* L.), miembro de la familia Poaceae, tiene como ancestro al teocintle reconocido desde hace 3 000 – 4 000 años AC, original de México y que se extendió por Mesoamérica hacia 1 800 AC. Posteriormente, se presentó en todo el continente americano, donde se descubrió la forma de consumir todas las partes vegetativas de la planta, incluido el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*, conocido por los mexicas como “cuitlacoche” (Montessoro y De León, 2008).

En la actualidad, las cualidades alimenticias para la producción de proteína animal, consumo humano y su uso industrial, hacen que el maíz sea la mercancía agrícola que más se produce en el mundo. Se prevé que para el ciclo 2016/2017 se logre el nivel de producción más alto de la historia de 1 025.6 Mt de maíz. Los incrementos en producción serán en EE. UU., Brasil, Argentina y Ucrania, los principales productores de este cultivo (FIRA, 2016).

En México, durante el ciclo agrícola 2014, la superficie sembrada de maíz fue de 7 426 412.19 ha., siendo Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Jalisco los Estados de la República con mayor superficie sembrada. Sin embargo, los estados con mayor rendimiento son Sinaloa, Baja California y Jalisco con 9.67 t/ha, 7.54 t/ha y 6.42 t/ha, respectivamente. No obstante, esas cifras se encuentran sobre la media de producción nacional de aproximadamente 3.30 t/ha (SIAP, 2107).

Enfermedades del maíz causadas por hongos y oomicetes

Los hongos son organismos eucariontes, cuyo reino es muy diverso. También existen los hongos inferiores (Chromistas) y los pseudohongos (Oomicetes). Los hongos fitopatógenos causan la mayoría de las enfermedades en plantas, esto debido a su capacidad de alimentarse como parásitos, consiguiendo nutrientes del hospedante vivo o como saprófitos que obtienen nutrientes de materia orgánica no viva de tejidos vegetales (Agrios, 2005).

Los pseudohongos y hongos tienen la facultad de afectar todas las partes de una planta y ocasionar una variedad de síntomas, incluyendo en el caso de maíz, la pudrición de raíz, manchas foliares, marchitamiento y raquitismo (White, 2004). Los problemas fitosanitarios del cultivo de maíz, más importantes en México son:

La enfermedad conocida como “damping-off”, marchitez de plántulas y podredumbre de raíz, ocasionada por *Pythium* spp. Otro patógeno aislado frecuentemente de raíces es *Fusarium* spp.,

aunque también, algunas especies son patógenas de tallos y mazorcas, como es el caso de, *F. verticilliodes*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinas* y *F. oxyporum* (White, 2004).

Los daños en el tallo se presentan por infección de *F. graminearum* (*Gibberella zeae*) y *F. verticilliodes* (*G. fujikuroi*). mientras que, en el follaje, se presentan el tizón foliar ocasionado por *Exserohilum turcicum* o *Bipolaris maydis*, royas causadas por *Puccinia sorghi* o *Puccinia polysora*, el complejo mancha de asfalto por *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis*, y el hiperparásito *Conothyrium phyllachorae* y la mancha foliar causada por *Cercospora zea-maydis*. En relación con enfermedades foliares originadas por oomicetes, se encuentran los mildius causados por *Sclerophthora macrospora* y *Peronosclerospora sorghi* (Montessoro y De León, 2008).

En daños a mazorca y espiga, el patógeno capaz de infectar inflorescencias masculinas y femeninas es conocido como carbón de la espiga *Sporisorium reilianum*. El carbón común *Ustilago maydis* produce agallas en mazorcas, hojas, tallos y espigas (Montessoro y De León, 2008).

A nivel mundial, el cornezuelo del maíz causado por *Claviceps gigantea* no se encuentra listado entre las enfermedades más importantes que afectan a la planta de maíz, ya que se encuentra principalmente en los Valles Altos de México, pero se ubica en el grupo de las 125 enfermedades que lo infectan.

El género *Claviceps* y sus efectos tóxicos

En la antigüedad, las temporadas húmedas y cálidas fueron propicias para que hongos filamentosos crecieran en cereales. Estos hongos producían metabolitos secundarios (micotoxinas y alcaloides) sobre alimentos que más tarde eran ingeridos por el hombre, provocándole graves intoxicaciones (Agrios, 2005).

En yacimientos arqueológicos de distintos países europeos y de Israel, se han encontrado esporas y esclerocios de algunos hongos parásitos de cereales, incluyendo *C. purpurea* (Illana-Esteban, 2008), junto a restos de plantas y semillas de cebada, trigo, centeno, mijo y arroz. En el estómago del cuerpo momificado del Hombre de Grauballe, que se calcula vivió hace 2 300 años, encontrado en 1952 en una turbera de Dinamarca, se encontraron restos de *C. purpurea* junto a semillas de trigo y centeno.

Se especula que fue elegido para ofrecerse en sacrificio a una diosa de la fertilidad, tras un largo invierno que destruyó las cosechas y dejó al poblado sin alimento. Su último alimento fue un

potaje de trigo y centeno además de muchos esclerocios del hongo venenoso *C. purpurea*, que probablemente le causó la muerte (Aaronson, 1989).

En contraste, cuando se consumen esclerocios o partes de ellos en pequeñas cantidades, pero de manera frecuente, se origina una enfermedad conocida como ergotismo. Las epidemias de ergotismo se reportaron en zonas con inviernos fríos y húmedos seguidos de primaveras calurosas en donde se consumía pan de centeno. El grano y los esclerocios molidos pasan a las harinas utilizadas en la elaboración del pan y su contaminación con alcaloides tóxicos (White *et al.*, 2003).

El ergotismo en la Edad Media

El ergotismo tiene dos manifestaciones: el convulsivo y el gangrenoso. El tipo convulsivo ha sido más frecuente en Europa, al Este del Rin en Alemania, que se caracteriza por el desarrollo de delirios, alucinaciones y espasmos musculares. El de tipo gangrenoso es debido a una isquemia o falta de irrigación sanguínea causada por los efectos vasoconstrictores de la ergotamina producida por el cornezuelo del centeno que causó importantes epidemias al Oeste del Rin, especialmente en Francia.

La primera epidemia de ergotismo ocurrió en París en el año 945 y fue recogida en los Annales del Escolar de Reims Flodourd en donde se menciona “el caso de algunas personas que sentían arder sus miembros, consumidos por un fuego oculto (Figura 1 A)” (Quesada y Ortega, 2011). Este tipo de ergotismo comenzaba con escalofríos en los miembros, seguido de sensación de quemazón, de aquí se originaron los nombres de fuego de San Antonio. Parecía como si las extremidades se consumieran internamente por un fuego interno (Figura 1 B), se volvían negras y arrugadas y al final se desprendían (Laval, 2004).



Figura 1. Ilustraciones del fuego de San Antonio. **A.** Grabado del Staatliche Graphische Sammlung de Munich, “San Antonio y las víctimas del Ignis sacer” donde las víctimas suplican a San Antonio, a la altura de la cabeza del Santo se aprecian manos y pies cortados. **B.** Grabado de Johannes Wechtlin con una persona enferma que implora a San Antonio. Fuente: Illana-Esteban, 2008.

La importancia del ergotismo gangrenoso inició en la Edad Media, período en el que se extendió por toda Europa cobrándose miles de víctimas. En ese tiempo, el pan se hacía con trigo, centeno o cebada y en los comercios se vendía pan blanco, de mejor calidad reservado para los ricos, y pan negro, de peor calidad y que podía estar elaborado con semillas de centeno mezcladas con esclerocios de *C. purpurea* que comían las clases más pobres (Illana-Esteban, 2008).

Las epidemias de ergotismo gangrenoso se extendieron por varios siglos por Europa, especialmente en Francia. En Europa Oriental (Alemania y Rusia) predominó el ergotismo de tipo convulsivo (White *et al.* 2003).

Relación estrecha entre el ergotismo y la brujería

En 1691-1692, los síntomas del ergotismo pudieron confundirse fácilmente con los de brujería. Debido a las manifestaciones de la enfermedad incluyendo convulsiones, contracciones violentas del cuerpo y alucinaciones, que hacían pensar que las personas eran víctimas de brujas o que estaban poseídos (Quesada y Ortega, 2011).

Dos casos en los que se conserva registro documental que permiten establecer una relación estrecha entre el ergotismo y la brujería, son los casos reportados en Finnmark, Noruega y Salem en EE. UU. En 42 casos se especifica que la brujería fue adquirida por el consumo de pan, leche o cerveza (Laval, 2004).

Importancia del género *Claviceps* en la agricultura

Las especies sobresalientes de *Claviceps* que afectan gramíneas de importancia alimenticia son *C. purpurea* en trigo, cebada y centeno. *C. zizaniae* en arroz silvestre (*Zizania palustris* y *Z. acuática*) usado como alimento por los nativos de EE. UU. y Canadá (White *et al.* 2003). *C. sorghi* y *C. africana* que causan el ergot del sorgo en India, África y en los últimos años reportado en América (Hernández- Martínez *et al.*, 2001), así como *C. gigantea* en maíz que se cultiva en los valles altos y húmedos de México (Moreno-Manzano *et al.*, 2016).

***C. gigantea* patógeno de maíz**

La presencia de *C. gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup and Rodríguez se confirmó en 1962, como un nuevo patógeno de maíz en México (Fuentes *et al.* 1964).

Clasificación taxonómica del patógeno (Mycobank, 2016):

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Claviceps*

Especie: *C. gigantea*.

Hospedantes de *G. gigantea*

La infección de *C. gigantea* se describió por primera vez parasitando maíz (*Zea mays*) (Fuentes *et al.* 1964). Posteriormente, el hongo se encontró en *Z. mexicana* (White, 2003). Se considera que *C. gigantea* es un parásito especializado en el género *Zea* y hasta el momento es el único patógeno de la subfamilia Panicoidea que ha evolucionado en América de un ancestro introducido durante la expansión de este tipo de gramíneas (Pažoutová, 2002). La mayoría de las especies del género *Claviceps* se encuentran en hospedantes de Panicoidea. La especificidad de rango de hospedantes es monogénica para el caso de *C. gigantea*, *C. paspali* y *C. viridis* y poligénica como *C. fusiformis* (Pažoutová y Tudzynski, 1999).

Antecedentes de la interacción *C. gigantea* - Maíz

En el primer reporte documentado de *C. gigantea* se relacionó con el efecto tóxico del hongo en personas y animales debido a la ingesta de esclerocios. La descripción de los esclerocios en maíz coincide con los del diente de caballo (Roullin, 1829). La segunda cita es de 1915 donde se describió otra especie de *Claviceps* parasitando *Paspalum* y se hace una comparación con una enfermedad que se presentó en maíz formando esclerocios (Agurell *et al.*, 1963). La enfermedad del diente de caballo

se hizo notar nuevamente en 1960 debido a los esclerocios que produce y cuando se reportó como una enfermedad desconocida del maíz (Fuentes *et al.*, 1961).

En un período corto de tiempo también se estudiaron por primera vez los compuestos que produce y se encontró una mezcla de festuclavina 68 %, dihidroelimoclavina 15%, chanoclavina 11%, elimoclavina 1.5%, piroclavina 1.5%, agoclavina 3%. Los dos primeros alcaloides constituyen los compuestos mayoritarios y para el caso del cornezuelo del maíz no se detectó la presencia de ácido lisérgico (Agurell y Ramstad, 1965).

Los alcaloides detectados se obtuvieron a partir de esclerocios colectados en campo, pero también se analizaron esclerocios obtenidos de plantas bajo condiciones de invernadero en donde los alcaloides analizados tuvieron la misma naturaleza en su composición. Con relación a la concentración, los esclerocios obtenidos de infección natural contienen un poco más de festuclavina y solo trazas de piroclavina. Este fue el primer reporte en que se aisló dihidroelimoclavina de una fuente natural (Agurell *et al.*, 1963).

Producción de alcaloides tipo ergot por *C. gigantea*

Al elucidar los pasos la ruta biosintética (Figura 2) de los alcaloides ergot (Florea *et al.*, 2017;), se observa el complejo de alcaloides que varía en estructura del alcaloide tricíclico de la clavina, chanoclavina I, a compuestos con el sistema de anillo de ergolina tetra cíclico. Los ergot alcaloides son comúnmente categorizados en cuatro subclases: clavinas, ácido lisérgico, amidas ácido lisérgico simple y ergopeptinas.

La biosíntesis de ergot alcaloides inicia con la formación de 4- (γ,γ)- dimetilaliltriptofano (DMAT) de dimetilalil difosfato (DMAPP) y ι -triptofano, catalizado por la enzima, DMAT sintasa, la cual es codificada por el gen *dmaW*. La siguiente etapa biosintética es catalizada por DMAT *N*-metiltransferasa codificada por *easF* y pasos subsecuentes por una catalasa codificada por *easC*, y chanoclavina I sintasa, una flavina- dependiente oxidoreductasa codificada por *easE* (= *ccsA*). Chanoclavina I es la clavina más simple que se sabe, es un producto final de la ruta, en algunos hongos como *Epichloë elymi* E56 *dmaW*, *easF*, *easC* y *easE*, ya que solo sólo existen cuatro genes funcionales de biosíntesis de alcaloides ergot. Los aislamientos fungosos que producen chanoclavina I pueden también producir el metabolito recientemente descubierto llamado ergotriptamina (Keller, 2006).

La secuenciación del genoma de numerosos productores de ergot alcaloides, ha revelado que los genes para las cuatro etapas de producción de chanoclavina I están presentes y físicamente

vinculados en un grupo (el grupo *EAS*), pero la mayoría de estos hongos tienen muchos genes adicionales en su grupo de *EAS*, para la elaboración específica de alcaloides ergot más complejos (Florea *et al.*, 2017).

Los siguientes tres pasos catalíticos que conducen de la chanoclavina I al alcaloide de clavina tetríclico, agroclavina, se llevan a cabo en secuencia por la chanoclavina I deshidrogenasa codificada por *easD*, una oxidoreductasa flavino-dependiente codificada por *easA* y una reductasa codificada por *easG*. Las variaciones en los pasos EasA y EasG determinan diferencias en los productos generados. La reducción (saturación) del enlace C8-C9 es requerido para permitir la rotación alrededor del enlace, posicionando el aldehído C7 para condensar con N6 para formar un ión amonio (Robinson y Panaccione, 2015).

La subsecuente reducción del enlace N6-C7 es catalizado por EasG. En aquellas cepas de *C. purpurea*, especies de *Balansi*, especies de *Epichloë* y especies de *Periglandula* que producen agroclavina y sus derivados, EasA cataliza la reoxidación de C8-C9 después de la rotación. En contraste las cepas de *C. africana*, *C. gigantea* y *Neosartorya fumigata*, producen festuclavina, el cual ha saturado el enlace C8-C9, porque sus enzimas EasA reducen, pero no reoxidan ese enlace (Florea *et al.*, 2017;).

Análisis de alcaloides

El estudio de los ergot alcaloides tiene especial interés por las propiedades farmacéuticas que se pueden desarrollar. En el caso de *C. gigantea*, se aislaron festuclavina 65%, D-dihidrolisergol- (I) 15%, chanoclavina 7%, y piroclavina 3%, donde se encontró ligera variación con respecto a la concentración en comparación con el reporte anterior.

Las investigaciones realizadas sobre los ergot alcaloides han llevado al desarrollo de un instrumental, que proporciona la habilidad de separar y medir individualmente los compuestos del ergot y sus isómeros, a su vez es posible monitorear y regular la contaminación de alimentos elaborados a base de cereales (Crews, 2015). Sin embargo, en un experimento en úteros de ratas para evaluar la actividad oxitócica de la festuclavina y el dihidrolysergol- (I), tomando como estándar la ergometrina. La actividad de los compuestos evaluados fue extremadamente baja en comparación con el estándar por lo que no se les consideró eficientes (Aguere y Ramstad, 1965).

Una vez que un procedimiento se ha desarrollado, su desempeño se caracteriza por la repetitividad entre laboratorios, por lo que actualmente hay una creciente demanda por métodos de prueba rápidos y que puedan ser aplicados en campo o en la línea de producción.

Los primeros análisis fueron en granos contaminados por esclerocios de especies de *Claviceps* y se basó en el conteo físico de esclerocios en muestras de granos (Flieger *et al.*, 1997). Mientras que, los métodos analíticos actuales pueden detectar niveles dañinos de ergot alcaloides en lotes individuales de granos de granos o harina (Flieger *et al.*, 1997, Crews, 2015).

Cromatografía en capa fina (CCF)

Las cromatografías iniciales se llevaban a cabo usando papel cromatográfico. Sin embargo, esto se sustituyó con el uso de métodos de CCF basados en silica gel o alúmina apoyado en placas de vidrio (Crews, 2013). La CCF es un método utilizado con frecuencia para análisis cualitativos de alcaloides, así como aislamiento de sustancias individuales de mezclas multicomponentes. Igualmente, es posible analizar varias muestras al mismo tiempo en una sola placa, reduciendo el tiempo de análisis y el volumen de solventes por muestra (Petruczynik, 2012).

Los ergot alcaloides se pueden determinar a partir de extractos de esclerocios o cultivos fungosos (Crews, 2013), pastos, granos y alimentos con la fase normal de CCF. Los ergot alcaloides que tienen doble enlace en el C-9 y C-10 y los del tipo clavina, pueden ser detectados con por fluorescencia bajo luz ultravioleta (UV), las manchas localizadas con luz UV, pueden ser eluidas de

la placa de CCF y determinadas usando el reactivo de van Urk o vainillina/70% ácido sulfúrico. El reactivo de van Urk es comúnmente utilizado para asperjar la placa de CCF (Scott, 2007).

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Llamada así por sus siglas en inglés HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Durante los últimos años, el desarrollo del formato de las columnas cromatográficas y las fases estacionarias, y la organización especializada de los componentes de HPLC ha sido notable. Esto debido a la versatilidad de la técnica, el amplio espectro de aplicaciones y sobre todo, la capacidad de cuantificación de trazas (ppb) en muestras de compuestos naturales, incluidos los alcaloides tipo ergot (Crews, 2013). Existen variantes de esta técnica para el eficiente análisis de alcaloides tipo ergot como la cromatografía de líquidos en fase reversa (Petruczynik, 2012).

Cromatografía de líquidos en fase reversa

Esta variante consiste en la reducción de las interacciones de intercambio iónico entre analitos básicos y silanoles de superficie residual. Hay diferentes métodos para conseguir la reducción de las interacciones iónicas como son: usar una fase móvil a pH bajo (supresión de la ionización de silanoles); utilizando una fase móvil a pH alto (supresión de la ionización de alcaloides); adición de reactivo de emparejamiento de iones al móvil fase (formación de pares de iones no polares, no cargados con analito); adición de bases relativamente fuertes al eluyente desempeñando el papel de bloqueadores y / o alcaloides de silanol supresores de ionización; seleccionando una fase estacionaria (Petruczynik, 2012). Los ergot alcaloides, se han considerado metabolitos secundarios fúngicos con importantes actividades toxicológicas y farmacológicas, se analizaron con éxito en una fase estacionaria C18 con un gradiente de 20-70 % acetonitrilo (MeCn) en agua (Scott, 2007; Um *et al.*, 2007).

Electroforesis capilar

En la actualidad, dentro de los métodos más sensibles usados para determinar alcaloides ergot, está la electroforesis capilar, que es eficiente para determinar la presencia de ácido lisérgico, *iso*-ácido lisérgico y ácido paspálico, este método es compatible con “TOF” por sus siglas en inglés Mass spectrometric Time of Flight. Las detecciones realizadas con ésta técnica son 0.1 mg L⁻¹, cuando las detecciones se realizan con UV son 0.5 mg L⁻¹ (Crews, 2015).

Características evolutivas de *C. gigantea*

La interacción del parásito con su hospedante a lo largo de los años explica en cierta forma la evolución paralela de éstos. Sin embargo, la estrategia evolutiva de *Claviceps* se da con la generación conidios en microciclos ya que, la mayoría de las especies de este género, forman conidios secundarios en tubos germinativos emergiendo de macroconidios (microciclos), ya sea en gotas de mielecilla o cuando son sembrados en medio de cultivo (Pažoutová, 2008). El microciclo se termina en su mayoría en el transcurso de 24 h después de la siembra. Los macroconidios de la mayoría de las especies comienzan el crecimiento de la colonia en 5 días después de la conidiación secundaria.

La formación de conidios secundarios es una prueba de la viabilidad macroconidial. En este caso, *C. gigantea* es excepcional ya que sus macroconidios mueren después de completar el microciclo y el crecimiento de las colonias solamente se logra cuando los explantes del esclerocio joven están cubiertos de tejido color violeta (Pažoutová, 2002).

LITERATURA CITADA

- Aaronson S. 1989. Fungal parasites of grasses and cereals: their role as food or medicine, now and in the past. *Antiquity* 63:247-257.
- Agrios G., N. 2005. *Plant pathology*. 5th ed. Ed. Elsevier Academia press. New York. 922 p.
- Aguirell S., L., E. Ramstad, and A.J. Ullstrup. 1963. The alkaloids of maize ergot. Part V of biogenetic studies in ergot; Part IV: *Svensks Farmaceutisk Tidskrift* 66 (741). *Planta Med.* 11:392-398.
- Aguirell, S. L. and E. Ramstad. 1965. A new ergot alkaloid from mexican maize ergot. *Acta pharmaceutica Suecica* 2: 231-238. Doi: 10.1055/s-0028-1100254.
- Crews, C. 2013. Methods for analysis of ergot alkaloids. 1134-1150 p. In: Ramawat, K.G. Mérillon, J.M. (eds.), *Natural Products*, Springer- Verlag Berlin Heidelberg.
- Crews, C. 2015. Analysis of Ergot Alkaloids. *Toxins*. 7:20124-2050. Doi: 10.3390/toxins7062024.
- Illana-Esteban, C. 2008. The ergot of rye (I): Biology, history and ergotism. *Boletin Sociedad Micologica de Madrid*. 32:293-306.
- FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relacion con la Agricultura). 2016. Panorama agroalimentario. Direccion de investigacion y evaluacion economica y sectorial. Maíz 2016. Disponible en linea https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200637/Panorama_Agroalimentario_Maíz_2016.pdf. Consultado el 22/04/2017.
- Flieger, M., Wurst, M., Shelby, R. 1997. Ergot alkaloids-sources, structures and analytical methods. *Folia Microbiolo.* 42(1): 3-30.
- Florea, S., Panaccione, D., Schardl, C. 2017. Ergot alkaloids of the family Clavicipitacea. *Phytopathology*. 107:504-518.
- Fučikovsky, L. y M. Moreno. 1971. Distribution of *Claviceps gigantea* and its percent attack on two lines of corn in the state of Mexico, Mexico. *Plant Disease Reporter*: 55(3):231-233.
- Fuentes, S.F. y L. de la Isla. 1961. Una enfermedad desconocida del maíz el “Diente de caballo”. *Agricultura Técnica* 12:11-12.
- Fuentes, S.F., de la Isla L., Ullstrup, A.J., and A.E. Rodriguez. 1964. *Claviceps gigantea*, a new pathogen of maize in Mexico. *Phytopathology* 54:379-381.
- Hernández- Martínez, M.E., Cárdenas- Soriano, L.E., Mendoza-Onofre, S., Osada-Kawasoe, S., Ramírez-Vallejo, P. y F. Zavala-García. 2001. Patogénesis de *Claviceps africana* en ovarios de sorgo. *Agrociencia* 35: 535-542.

- Keller, U. 2006. Biosynthesis of ergot alkaloids. 499 p. In: Kren, V., Ladiskav, C. (eds.). Ergot; The genus *Claviceps* Ed. Howart academic publishers. The Netherlands.
- Laval, E. 2004. Sobre las epidemias del fuego de San Antonio. Revista Chilena de Infectología. 21:74-76.
- Micobank (Mycobank database). 2016. Fungal Database, Nomenclature & Species Bank. International Mycological Association. Disponible en línea <http://www.mycobank.org/defaultinfo.aspx?Page=Home>. Consultado el 20/06/2017.
- Montessoro, R.R., y C. De León. 2008. El cultivo del maíz. Temas selectos. Ed. Colegio de Postgraduados, Mundi- Prensa. Vol. 1. México. 127 p.
- Moreno, M. y L. Fucikovsky. 1972. Efecto de la posición y el número de esclerocios de *Claviceps gigantea* sobre la germinación de granos de maíz. Fitopatología 5(1-2):7-9.
- Moreno-Manzano, C.E., De León-García de Alba, C., Nava-Díaz, C., y J.R. Sánchez-Pale. 2016. Germinación de esclerocios y formación de ascosporas de *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez. Revista Mexicana de Fitopatología. 34(3):AC1-AC19. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1603-2
- Naudè, T.W., Botha C. J, and J. H. Vorster. 2005. *Claviceps cyperi*, a new cause of severe ergotism in dairy cattle consuming maize silage and teff hay contaminated with ergotised *Cyperus esculentus* (nut sedge) on the Highveld of South Africa. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 72:23–37. Doi: 10.4102/ojvr.v72i1.221.
- Pažoutová, S. 2002. The evolutionary strategy of *Claviceps*. In: White J. F., Bacon C. W., Hywel-Jones N. L., Spatafora J. W., (eds.) Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chamistry, Biocontro, and Cultural Impacts. NY, USA: Marcel Drekker 329-354.
- Pažoutová, S., Kolařík, M., Olšovská, J., Odvody, G.N., and D.E. Frederickson. 2008. A new species complex including *Claviceps fusiformis* and *Claviceps hirtella*. Fungal Diversity 31: 95-110.
- Pažoutová, S. and P, Tudzynski. 1999. *Claviceps* sp. PRL 1980 (ATCC 26245),59 and Pepty 695/ch-I: their true story. Mycological Research. 103 (8): 1044-1048. Doi.101017/S0953756298008132.
- Petruczynik, A. 2012. Analysis of alkaloids from different chemical groups by different liquid chromatography methods. Central European Journal of Chemistry. 10(3): 802-835.
- Quesada, D. A. y D. A. Ortega. 2011. El cornezuelo del centeno a lo largo de la historia: mitos y realidades. Pasaje a la Ciencia. 14:16-25.

- Robinson, S., and Panaccione, D. 2015. Diversification of Ergot Alkaloids in Natural and Modified Fungi. *Toxins*. 7: 201-218.
- Roullin. 1829. Sur l'ergot du maïs et des ses effets sur l'homme et animaux (Iua Acad. Roy. du Sci. 1827) En: Fontenelle, J. *Mem. J. Chim. Medic. de Pharm. et de Toxicol.* 5: 608-610.
- SAGARPA (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2015. Firma México y China protocolos sanitarios para incrementar y abrir exportaciones de productos agroalimentarios mexicanos. Disponible en línea <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B631.aspx>. Consultado el 10/10/2016.
- Scott, P.M. 2007. Analysis of ergot alkaloids – a review. *Mycotoxin Research* 23(3): 113-121.
- SIAP (Servicio de Información Agrícola y Pesquera). 2017. Disponible en línea en <http://www.gob.mx/siap/>. Consultado en 10/10/2016.
- Ullstrup, A.J. 1973. Maize ergot: a disease with a restricted ecological niche. *PANS*. 19(3): 389-390.
- Um, I. H., Min S. W., Dust J. M. 2007. Choise of solvent (MeCN vs H₂O) decides rate- limiting step in S_NAr aminolysis of 1-fluoro-1,4-dinitrobenzene with secondary amines: importance of bronsted-type analysis in acetonitrile. *The Journal of Organic Chemistry*. 72: 8797-8803. Doi: 10.1021/jo701549h
- White, D. G. 2004. *Plagas y enfermedades del maíz*. Ed. Mundi-Prensa México. 77 p.
- White, J. F., Bacon, C. W., Hywel-Jones, N. L. and J. W. Spatafora. 2003. Clavicipitalean fungus evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts. *Mycology* 19 326-327.

CAPITULO I. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA, CARACTERÍSTICAS CULTURALES Y ALCALOIDES DE *Sphaecelia* sp: *C. gigantea*

1.1 RESUMEN

La enfermedad conocida comúnmente como “diente de caballo, ergot o cornezuelo” debe su nombre a la estructura de reposo producida (esclerocio), que toma el lugar de la semilla y deforma al grano de tal manera que se observa un espolón, fue reportada por primera vez en el municipio de Amecameca, Estado de México ubicado en el eje neovolcánico de México, en el municipio de Toluca y en la Sierra Tarasca, Michoacán. Los esclerocios de *C. gigantea* producen una variedad de alcaloides incluyendo festuclavina, D-dihidrolisergol- (I), chanoclavina, y piroclavina. Las especies del género *Claviceps* en general producen alcaloides que inducen problemas de toxicidad en animales. Por lo que, se planteó como objetivos de la presente investigación determinar la actual ubicación geográfica de *C. gigantea* en Valles Altos de México, determinar las diferencias morfológicas entre aislados colectados y la concentración de alcaloides presentes en esclerocios de esas zonas geográficas y la propuesta de un método de inoculación artificial para selección de materiales resistentes. Para lo cual se realizaron rutas de monitoreo para la búsqueda de material sospechoso de *C. gigantea* en cuatro estados de la República Mexicana, Se elaboraron cultivos monospóricos de aislados asociados a *Sphaecelia* en medios de cultivo selectivos para promover el crecimiento de aislados asociados a *Sphaecelia* sp. Se amplificaron diferentes genes para caracterizar molecularmente las colonias. Se analizó la morfometría y características culturales de *Sphaecelia* sp. Se realizó una prueba de patogenicidad para determinar el mejor método de inoculación. Se realizó un análisis cualitativo de los alcaloides presentes en los esclerocios de *C. gigantea* por cromatografía en capa fina y cuantitativo por cromatografía de líquidos de alta resolución. El hongo *C. gigantea* incremento su incidencia al encontrarse en zonas donde no estaba reportado como Hidalgo y Puebla. El fitopatógeno *C. gigantea* produce ergoalcaloides del tipo dihidroergopeptina y dihidroergosina. La cantidad de alcaloides encontrados en esclerocios de *C. gigantea* fue diferente en tiempo y espacio.

Palabras clave: Distribución- diente de caballo, medio selectivo- *Sphaecelia* sp., morfología- *Sphaecelia* sp., alcaloides- *C. gigantea*.

1.2 ABSTRACT

The disease commonly known as "horsetooth, ergot or ergot" owes its name to the resting structure produced (sclerotium), which takes the place of the seed and deforms the grain in such a way that a spur is observed, was reported by first time in the municipality of Amecameca, Estado de México located in the neo-volcanic axis of Mexico, Valley of Toluca and the state of Michoacán. Sclerotia of *C. gigantea* produce a variety of alkaloids including festuclavine, D-dihydrolysergol, pyroclavine and chanoclavine. Claviceps species generally produce alkaloids that induce toxicity problems in animals. Therefore, the objectives of the present investigation were to determine the current geographical location of *C. gigantea* in Valles Altos de México, to determine the morphological differences between isolates collected and the concentration of alkaloids present in sclerotia of those geographical zones and the proposal of an artificial inoculation method for selection of resistant materials. To this end, monitoring routes were carried out to search for suspect material of *C. gigantea* in four states of the Mexican Republic. Monosporic cultures of isolates associated with *Sphacelia* sp. were prepared in selective culture media to promote the growth of isolates associated with *Sphacelia* sp. Different genes were amplified to molecularly characterize the colonies. The morphometry and cultural characteristics of *Sphacelia* sp. A pathogenicity test was conducted to determine the best inoculation method. A qualitative analysis of the alkaloids present in the sclerotia of *C. gigantea* was carried out by thin layer chromatography and quantitative by high performance liquid chromatography. The *C. gigantea* fungus increased its incidence because it was found in areas where Hidalgo and Puebla were not reported. The phytopathogen *C. gigantea* produces ergocalcoids of the dihydroergopeptin and dihydroergosine type. The quantity of alkaloids found in sclerotia of *C. gigantea* was different in time and space.

Key words: Distribution- horsetooth, culture media- *Sphacelia* sp, morphology- *Sphacelia* sp, alkaloids- *C. gigantea*

1.3 INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida comúnmente como “diente de caballo, ergot o cornezuelo” debe su nombre a la estructura de reposo producida (esclerocio), que toma el lugar de la semilla y deforma al grano de tal manera que se observa un espolón (Agrios, 2005). Esta enfermedad del maíz fue reportada por primera vez en el municipio de Amecameca, Estado de México (Fuentes *et al.*, 1964); ubicado en el eje neovolcánico de México a una altitud de 2440 m. Posee un clima templado- semifrío y subhúmedo con lluvias en verano y otoño, con temperatura mínima de -8°C y promedio anual de 14.1 ° C (Conagua, 2017). Así como, en el municipio de Toluca: localizado en la zona central del oeste del estado, en las faldas del Nevado de Toluca o Xinantécatl a una altitud de 2600 m (Municipios, 2017), con clima templado subhúmedo con lluvias en verano, temperatura mínima de -5°C y promedio anual de 20 °C (CONAGUA, 2017).

De igual forma, fue encontrado en la Sierra Tarasca, Michoacán, la cual, forma parte del sistema volcánico transversal, principal sistema montañoso del estado, también llamada Meseta Tarasca, con 2000 a 3000 m de altura (Motte-Florac, 2008). El clima de esta región es muy variado debido a la marcada topografía, considerando las zonas más altas un clima semifrío, el más húmedo de los subhúmedos con verano largo y fresco, con hasta 1500 mm de precipitación total anual y temperatura mínima de 5 ° C (Trujillo, 1971).

Sin embargo, México posee diversidad de relieves debido a que es uno de los países con mayores características y variedades topográficas que influyen directamente en las condiciones climáticas, tipos de suelo y vegetación. En el ambiente montañoso, las condiciones climáticas varían de acuerdo con la altitud, la posición geográfica de las montañas y la orientación de sus vertientes, que en general son zonas húmedas con zonas de alta precipitación (Lugo-Hubp, 1990).

Considerando la variedad de las condiciones climáticas en el país y que en esas zonas se encuentra el hospedante de *C. gigantea*, es cuestión de tiempo para que el patógeno migre, ya sea por ayuda del viento, insectos o el hombre a esas nuevas áreas geográficas y se presente la enfermedad. Una planta se enferma cuando es atacada por un patógeno o afectada por un agente abiótico, en este momento interactúan la planta y el patógeno. Una vez que estos componentes entran en contacto necesitan que las condiciones ambientales tengan un rango adecuado para que se desarrolle la enfermedad. Así, se completa el triángulo de la presencia de la enfermedad y si algún componente no se presenta, esta no se desarrolla (Agrios, 2005).

Los miembros del género *Claviceps*, son parásitos especializados de pastos, ciperáceas y

gramíneas, que afectan específicamente la inflorescencia femenina, ya que los órganos reproductivos del hospedante son remplazados por un esclerocio (Fuentes *et al.*, 1964.). En México, *C. gigantea* es una especie que se especializa en parasitar a los miembros de género *Zea*. Este hongo desarrolla dos estados reproductivos al estado conidiogénico se le conoce como *Sphacelia* sp. que produce filamentos o micelio que invade el ovario de la planta y se forma una masa fungosa de color blanco llamada esfacelium. Una vez establecida la infección inicia, la producción de macro y microcondios, que pueden sobrevivir durante varios meses (Pažoutová, *et al.*, 2003). A esto le sigue la formación de esclerocios, estructuras que permiten que el hongo sobreviva durante el intervalo entre la cosecha y el próximo período de floración. A partir de ésta estructura se formaran estípites que en su interior contienen ascas y ascosporas filiformes (Pažoutová, *et al.*, 2004).

Los esclerocios de *C. gigantea*, producen una variedad de alcaloides incluyendo festuclavina, D-dihidrolisergol- (I), chanoclavina, y piroclavina (Aguirell y Ramstad, 1965). Las especies del género *Claviceps* en general producen alcaloides que inducen problemas de toxicidad en animales (Naude *et al.*, 2005).

Las pérdidas económicas en el cultivo de maíz ocasionadas por este hongo son severas, tanto por la disminución total de la calidad del grano, como por la contaminación de ergot alcaloides (Warham *et al.* 1999). Por tal motivo, se planteó como objetivo de la presente investigación determinar: la ubicación geográfica actual de *C. gigantea* en Valles Altos de México, las diferencias morfológicas entre aislados colectados y la concentración de alcaloides presentes en esclerocios de esas zonas geográficas.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Monitoreo

Con base en reportes de distribución de *C. gigantea* donde se restringe la presencia del patógeno a localidades en el Estado de México, (Fučíkovsky y Moreno, 1971), se decidió buscar la presencia del hongo en lugares con condiciones climáticas similares a las reportadas. Se realizaron monitoreos (Cuadro 1.1) en municipios del estado de México, Puebla, Hidalgo y Veracruz, en temporadas de cosecha de 2011 – 2016.

Cuadro 1. 1. Rutas de monitoreo para la búsqueda de material sospechoso de *C. gigantea* en cuatro estados de la República Mexicana.

Estado	Municipio
México	Tlajomulco, Villa Victoria, Calimaya, Almoloya, Tenango, Amanalco, Tenancingo, Toluca.
Puebla	San Nicolás de los Ranchos, Calpan, Santiago Xalinxintla, Amozoc, Acajete, Tepulco, Acatzingo, Chalchicomula de Sesma, Aljojuca, Soltepec, El Seco, Mazapiltepec y Zacatlán.
Hidalgo	San Pedro Tlachichilco, Acaxochitlan, Tulancingo, Real de Monte.
Veracruz	Soledad Atzompa

1.4.2 Toma de muestra

En varias parcelas de maíz muestreadas, se encontraron mazorcas con signos de esclerocios. Las muestras sospechosas se colocaron en bolsas de papel. Estas se llevaron al laboratorio de Patógenos del Suelo del Colegio de Postgraduados para ser procesadas.

En el Laboratorio, se realizó un sub-muestreo seccionando esclerocios en trocitos de 1 cm², los cuales se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1.3 % por 5 min. posteriormente se enjugaron 2 min. en 95% EtOH, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y finalmente se colocaron en cámara húmeda para promover el crecimiento micelial (Pažoutová, 2001) y en medio de

cultivo semi-selectivo. Para su crecimiento, se probaron diferentes medios de cultivo (Cuadro 1.2).

Cuadro 1. 2. Medios de cultivo utilizados para promover el crecimiento de aislados asociados a *Sphacelia* sp. (Warham, 1999; Pažoutová 2001; Pažoutová *et al.* 2004; Muthusubramanian *et al.*,2006).

Medio de cultivo	Componentes g/L	
AG	Agar	15 g
	Agua destilada	1000 mL
CS2	Sucrosa	100 g
	Ácido cítrico	16.8 g
	(NH ₄) ₂ - SO ₄	10 g
	CaCL ₂	1.1 g
	KH ₂ PO ₄	0.25 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g
	KCL	0.12 g
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.02 g
	Zn SO ₄ .7H ₂ O	0.015g
	Agua destilada	1000 mL
EG Suplementado con cloranfenicol	Extracto de levadura	10 g
	Glucosa	10 g
	Agua destilada	1000 mL
EGA	Extracto de levadura	10 g
	Glucosa	10 g
	Agar	15 g
	Agua destilada	1000 mL
Em GA	Extracto de Endospermo de maíz	200 g
	Glucosa	10 g
	Agar	15 g
	Agua destilada	1000 mL

EMA	Extracto de malta	20 g
	Agar	20 g
	Agua destilada	1000 mL
HA	Harina de maíz	20 g
	Agar	8.75 g
	Agua destilada	1000 mL
PDA (pH 5.2)	Papa	200 g
	Dextrosa	12 g
	Agar	15 g
	Ácido láctico	1 mL
	Agua destilada	1000 mL
T2 Agar (pH 5.2 100 µg/mL de ampicilina)	Sucrosa	100 g
	L- asparagina	10 g
	Extracto de levadura	.1 g
	KH ₂ PO ₄	0.25 g
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.25 g
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.02 g
	Zn SO ₄ . 7H ₂ O	0.015g
	Ca(NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	0.12 g
	Agar	20g
	Agua destilada	1000 mL
	T1 (pH 5.2, 100 µg/mL de ampicilina)	L- asparagina
Sucrosa		100 g
L-cisteina HCL		0.1 g
Extracto de levadura		0.1 g
Ca(NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O		1 g

KH ₂ PO ₄	0.25 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.03 g
Zn SO ₄ . 7H ₂ O	0.02 g
Agua destilada	1000 mL

1.4.3 Elaboración de cultivos monospóricos de aislados asociados a *Sphacelia* sp.

Con el crecimiento obtenido en las cámaras húmedas y medios de cultivo PDA, T1 y T2, se hizo una suspensión de conidios para realizar cultivos monospóricos. Utilizando medio T2-agar (Cuadro 2) para purificar las colonias. Durante el procedimiento se observaron diferentes tipos de conidios, y se seleccionaron los que correspondieron a la descripción morfológica de *Sphacelia* sp. (Barnet y Hunter, 2006; Pazoutová *et al.* 2004 Muthusubramanian *et al.* 2006) se evaluó, velocidad de crecimiento, abundancia de micelio y velocidad para producir conidios.

1.4.4. Caracterización molecular

Este procedimiento fue realizado en el Laboratorio de Microbiología de la academia de ciencias de la Republica Checa. Los cultivos monospóricos puros con de 20 días después de la siembra en medio de cultivo T2 –agar, se utilizaron para la extracción del ADN total de cultivos monospóricos con el kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN®). Se amplificaron las regiones de los genes Btubulina; T1 (5' AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT 3') / T22 (5' TCT GGA TGT TGT TGT GAA TCC 3') (O'Donnell and Cigelnik, 1997), RPB2 fRPB2- 5f (5' GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG 3')/ fRPB2-7cR(5' CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT 3'), ITS; ITS1F (5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTAA 3') (Gardens y Bruns, 1993)/ NL4 (5' GGA TTC TCA CCC TCT ATG AC 3') (O'Donell, 1993). Los ácidos nucleicos se enviaron a MACROGEN (Corea), para su secuenciación. Con la información obtenida, se analizaron las secuencias para buscar coincidencias entre las muestras colectadas en las diferentes zonas geográficas en los 4 estados de la República Mexicana.

1.4.5 Prueba de patogenicidad

1.4.5.1 Manejo y Mantenimiento de aislamientos

Las colonias asociadas a *Sphacelia* sp. se sembraron en medio de cultivo agua- agar y se mantuvieron a 24 ° C en oscuridad durante cuatro meses. Previo a la inoculación en plantas de maíz, se realizaron preparaciones temporales que se observó al microscopio a 40X para observar la formación de estructuras de reproducción.

1.4.5.2 Preparación de inóculo

El inóculo se preparó a partir de una muestra proveniente del municipio de Toluca. El micelio de una caja Petri con medio de cultivo T2- agar se raspo con ayuda de una espátula y se preparó una suspensión de conidios en agua destilada estéril con sacarosa 10% a una concentración de 1×10^6 y 1×10^7 conidios mL⁻¹ (Cuadro 3).

Selección de plantas de maíz

La suspensión de conidios preparada se trasladó a la parcela experimental en Toluca Estado de México, (19° 43'00"N, 99°52'00"W). Para ser inoculadas en plantas de maíz del híbrido BG1384W de Biogen® en etapa de floración temprana (Figura 1.1) vía inyección 2 mL o aspersión con 2 mL de la suspensión previamente preparada. La distribución de los tratamientos se realizó completamente al azar dentro de tres repeticiones integradas por cuatro surcos con 16 plantas por surco (Cuadro 1.3).

Una vez inyectada o asperjada la suspensión, se retiró la hoja del jilote inoculado con el propósito de marcar aquellos jilotes expuestos a la suspensión de conidios.

Cuadro 1. 3. Tratamientos de inoculación en plantas de maíz con suspensión conidial de colonias asociadas a *Sphacelia* sp.

Inóculo	Método	Concentración conidios mL ⁻¹	Tratamiento
Conidios de <i>Sphacelia</i> sp.	Inyección	1x10 ⁶	T1
		1x10 ⁷	T2
	Aspersión	1x10 ⁶	T3
Testigo		1x10 ⁷	T4
	Inyección	Agua destilada	T5
	Aspersión	estéril	



Figura 1. 1. Inoculación de plantas de maíz a los 92 días de siembra, con suspensión conidial de crecimientos fúngicos asociados a *Sphacelia* sp.

1.4.5.3 Evaluación de tratamientos

La evaluación de infección de las plantas inoculadas se realizó al momento de la cosecha de forma visual buscando la presencia o ausencia de esclerocios. Con la información recabada se realizó

un análisis estadístico en parcelas divididas, con el programa estadístico SAS (1999). El experimento se realizó en dos ciclos de cultivo diferentes 2016 y 2017.

1.4.5.4 Reaislamiento y análisis morfológico

El material analizado visualmente en campo se llevó al laboratorio para corroborar su identidad con la elaboración de cultivos monospóricos y así cumplir con el procedimiento establecido en los postulados de Koch.

1.4.6 Extracción de alcaloides de muestras de esclerocios colectadas de diferentes zonas geográficas

1.4.6.1 Extracción de alcaloides para análisis cualitativo

El procedimiento para la extracción de alcaloides fue el propuesto por Colin Crews (2001) y Wallwey y Li (2011). Para el que se utilizaron las muestras de esclerocios triturados y micelio las cuales de cubrieron con acetato de etilo y se agitaron durante 4 h a 25°C. La fase orgánica se separó por filtración, y para eliminar el exceso de humedad se agregó sulfato de sodio. Posteriormente se evaporará hasta sequedad con ayuda del rotavapor. Para el análisis de alcaloides en el extracto se disolvió el residuo de la extracción en 10 ml de acetato de etilo. Se extracto dos veces con 1 volumen de 0.01 M de ácido clorhídrico. Se colocó la muestra en un embudo de separación y se agregó 1 volumen de 0.01 M de ácido clorhídrico para recuperar la fase inferior (Este paso se realizó dos veces para recuperar la mayor cantidad del compuesto). Se ajustó la fase acuosa un pH=9 con hidróxido de amonio y se evaporo a sequedad.

1.4.6.1.1 Cromatografía en capa fina

La muestra se colocó de manera puntual en una cromatoplaca, para la fase móvil la solución de alcohol metílico: cloroformo: hidróxido de amonio; en una proporción de 80:20:0.2 respectivamente. Como revelador se utilizó el reactivo de Van Urk (para- dimethylaminobenzaldehido 80 mg, HCL al 25 % 4ml y FeSO₄ 5µl.

1.4.6.2 Extracción de alcaloides análisis cuantitativo

Este procedimiento fue realizado en el Laboratorio de Microbiología de la academia de ciencias de la Republica Checa. Se procesaron 44 muestras con una repetición provenientes de diferentes puntos de colecta y dos muestras comerciales de productos elaborados a base de maíz.

Los reactivos utilizados para procesar las muestras fueron; metanol y ácido trifluoroacético (TFA) (Francia). Diclorometano y solución de hidróxido de amonio (25% g.r.) Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic). Se utilizaron cinco estándares, incluyendo DH-elymoclavine, chanoclavine, pyroclavine, festuclavine, and DH-ergosine Alfarma s.r.o. (Cernosice, Czech Republic).

1.4.6.2.1 Obtención de la fracción alcaloidea

Los esclerocios de *C. gigantea* se molieron hasta obtener un polvo fino. Durante 3 horas 0.2 g se extrajo con 1 ml de diclorometano que contenía 25 μ l de hidróxido de amonio concentrado. Antes del análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución, el extracto bruto se centrifugó a 11000 gravedades y se inyectaron 50 μ l al cromatógrafo.

1.4.6.2.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC

El sistema HPLC Alianza (Waters, Milford, MA), consiste en un módulo de separaciones e2695 y detector PDA 2998 (rango 220 to 600 nm). Los datos fueron procesados con el programa Empower 3. El agua fue filtrada a través del filtro 0.22 μ m (Millipore, UK) y desgasificada por 10 minutos en un baño ultrasónico antes de su uso.

Se utilizó una columna C18 (250mm \times 4.6mm, Phenomenex) con una columna de guardia utilizada para los análisis. La fase móvil consistió en agua (A) y metanol (B), ambos con 1 % de TFA. El gradiente de elusión inició a 30 % B (0 minutos), incrementándose linealmente hasta 100 % B con 30 min. Cada análisis fue seguido por una columna de lavado (100 % B, 15 min.) y un paso de equilibración durante 9 min, resultando un análisis total de cincuenta y cuatro minutos. La tasa de flujo se mantuvo en 1.0 ml min⁻¹.

1.4.6.2.3 Calibración

Las soluciones estándar de festuclavina se prepararon en metanol a una concentración final de 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 μ g.ml⁻¹ (10 μ l inyectados por triplicado). Los gráficos de

calibración se construyeron trazando las áreas de los picos integrados de los compuestos individuales frente a la concentración.

Las gráficas de calibración se construyeron trazando las áreas de los picos integrados de los compuestos individuales frente a la concentración. Se calculó la ecuación de regresión lineal ($y = 8766,1x + 67788$) y se determinó el coeficiente $r^2 = 0.9998$.

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1 Monitoreo

Las zonas monitoreadas en el Estado de México presentaron al fitopatógeno en todas las localidades visitadas y en el caso de Puebla en 2 localidades de 18 visitadas y en Hidalgo 2 de las 5 localidades visitadas (Cuadro 1. 4). Fuentes *et al.* (1963) reportaron por primera vez *C. gigantea* en el Valle de Toluca, Estado de México y en la región Tarasca de Michoacán, posteriormente se reportó en 20 municipios del Estado de México (Fučíkovsky y Moreno. 1971). Actualmente siete municipios colindantes a los ya reportados en el Estado de México presentan la enfermedad (Figura 1. 2), mientras que las localidades en el estado de Puebla e Hidalgo son nuevos reportes de la presencia del patógeno en maíces comerciales y nativos.

Además, fue notable la diferencia de incidencia del hongo ya que, los porcentajes más alto se encontraron en municipios del Estado de México con hasta el 32 % de incidencia de *C. gigantea*/ ha. (Cuadro 1. 4.) a diferencia de las zonas muestreadas en Puebla e Hidalgo que presentaron incidencias por debajo del 15 %/ ha.

Cuadro 1. 4. Distribución actual e incidencia de *C. gigantea* en cuatro estados de la República Mexicana en materiales nativos y comerciales.

Estado	Municipio	Coordenadas		Fecha de colecta	Incidencia (%) / ha.
México	El Rosedal.	19°24'27.3"	99°43'06.3"	2012	21
		19°24'40.7"	99°43'06.5"	2013	19
	Atlajomulco	19°24'15.2"	99°43'10.2"	2014	25.8
		19°25'48.4"	100°00'21.2"	2011	5
		19°25'48.4"	100°00'21.2"	2012	10.5
		19°25'58.8"	100°00'17.2"	2013	9
		19°26'04.8"	100°00'24.8"	2014	28
	Villa Victoria	19°19'58"	99°61'14"	2013	38
		19°19'58"	99°61'14"	2014	27
		19°19'58"	99°61'14"	2015	22
		19°19'58"	99°61'14"	2016	12
	Amanalco	19°15'03.0"	100°01'36.8"	2012	7.1

		19°15'03.0"	100°01'36.8"	2013	4.2
	Almoloya	19°25'08.8"	99°45'22.2"	2012	5.6
		19°25'08.8"N	99°45'22.2"	2013	4.9
	Tenango	19°06'55.1"	99°33'54.8 "	2014	35
		19°06'55.1"	99°33'54.8 "	2015	37
	El Cerrillo, Tenancingo	19°24'54.3"	99°41'43.9"	2015	3.8
	Guadalupe Victoria	19°18'06.6"	99°40'22.2"	2012	10.2
	Joquicingo	19°03'20"	99°32'48"	2014	7.3
Puebla	Ayotla	19°55' 58.68"	98°0'33.55"	2013	10
		19°55' 58.68"	98°0'33.55"	2014	12
		19°55' 58.68"	98°0'33.55"	2015	10
	Ayehualulco	19°56'57.23"	97°57'47.23"	2014	12
Hidalgo	Acaxochitlan	20°08'34.2"	98°11'14.3"	2015	15
	San Pedro	20°09' 40"	98°15'47.001"		14
	Tlachichilco				
	Cerro Colorado, Atotonilco el Grande	20° 24' 29.88"	-98° 42' 20.16"		9.7

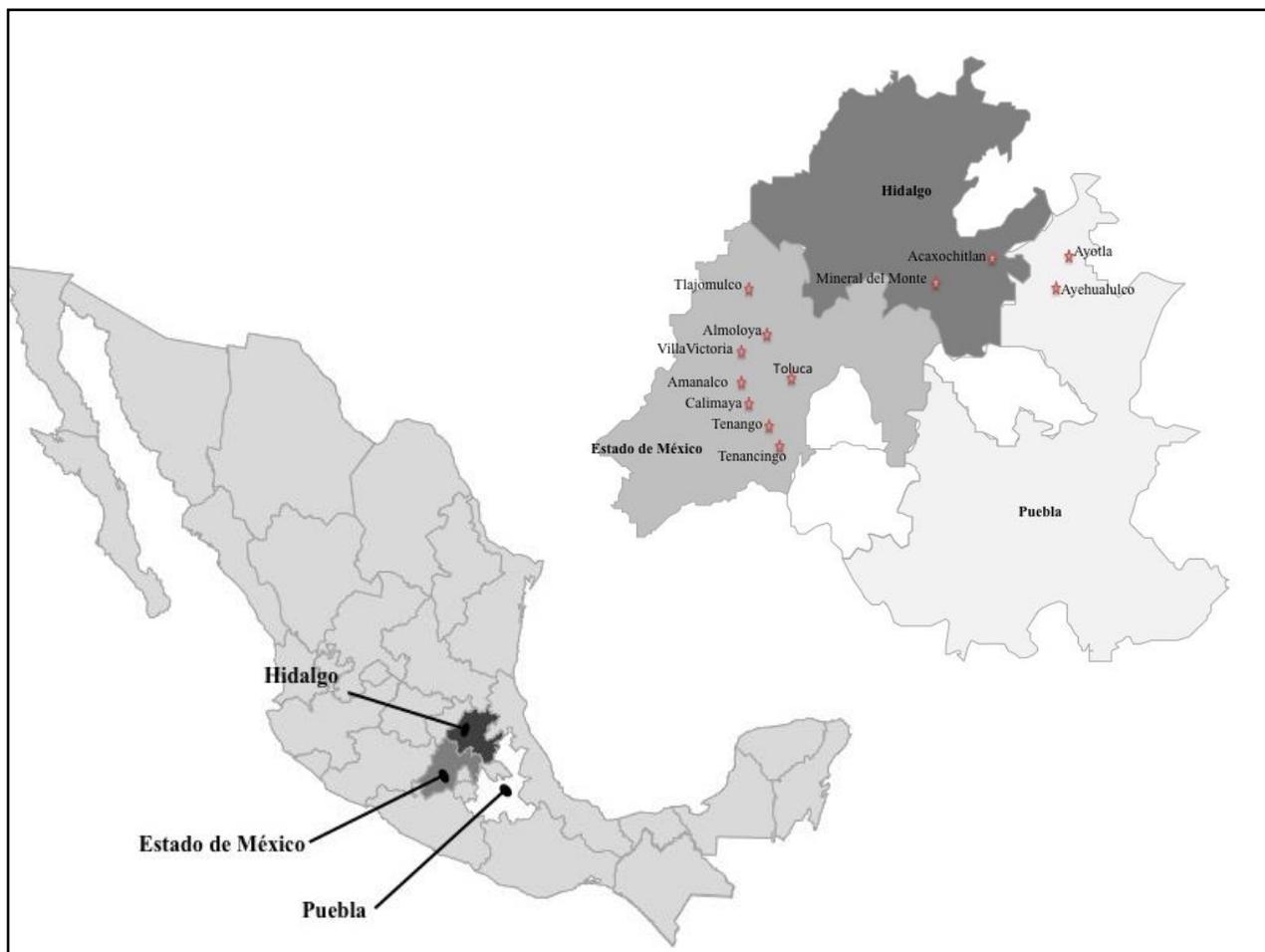


Figura 1. 2. Recolección de esclerocios de *C. gigantea* (tomadas en campos sembrados con maíz, en México). Puntos de colecta marcado en rojo.

1.5.2 Caracterización Morfológica

1.5.2.1 Micobiota de esclerocios de *C. gigantea*

Se obtuvo un total de 120 aislados de hongos a partir de tejido esclerótico sembrado en medio de cultivo PDA y T2-agar. Además de las colonias identificadas como *Sphacelia* sp. (Ascomycota: Hypocreales) se detectaron otros hongos dos de ellos con alta actividad micoparásita como es el caso de *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) y *Trichoderma harzianum* (Ascomycota: Hypocreales) que pueden degradar a los esclerocios hasta 80 % debido a su acción parasítica sobre estos (Ondrej *et al.* 2010). Otro hongo detectado fue *Geosmithia* sp. (Ascomycota: Hypocreales), este hongo filamentoso es comúnmente asociado a coleópteros barrenadores y algunas especies son fitopatógenas (Kolařík *et al.*, 2011).

La frecuencia de aislamiento fue distinta dependiendo del lugar de procedencia de las muestras (Figura 1.3), la frecuencia más alta de hongos micoparásitos se obtuvo de muestras provenientes del estado de Puebla.

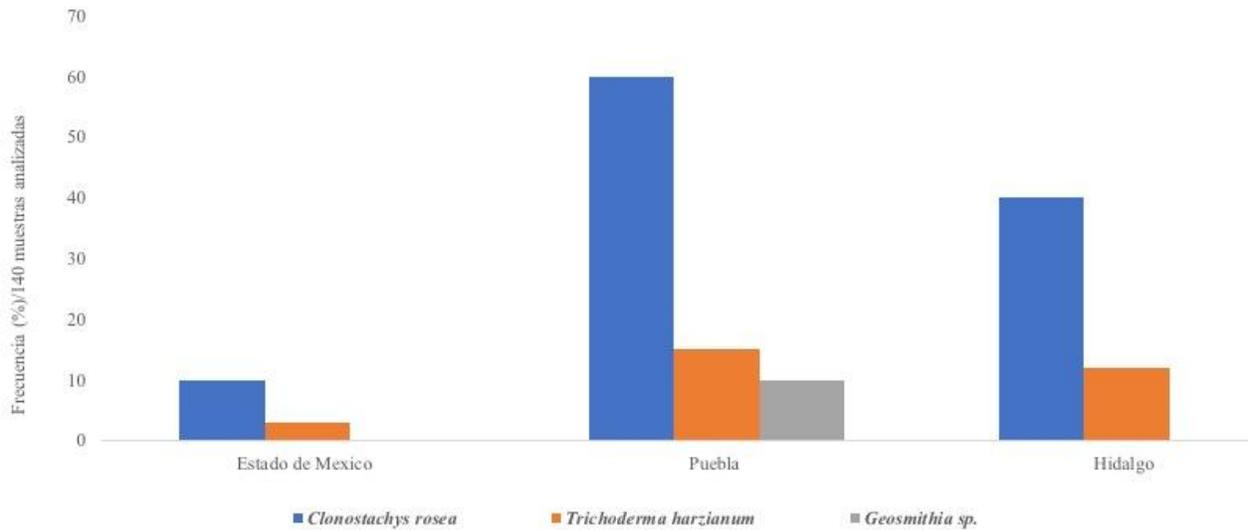


Figura 1. 3. Hongos aislados de esclerocios de *C. gigantea* provenientes de diferentes zonas geográficas, colectados de 2012- 2015 en maíces comerciales y nativos.

1.5.2.2 Morfometría y características culturales de *Sphacelia* sp.

Las características morfológicas que presentaron las colonias obtenidas de tejido esclerótico fueron: conidióforos hialinos simples crecen en palisada compacta (Figura 1. 4. A) (Barnet y Hunter, 2006). Se encontraron microconidios ovoides, hialinos, sin septos, sus dimensiones fueron de 4 – 6 x 2.5-3 μm (Figura 1. 4. B). Así como macroconidios (Figura 1. 4. C) elípticos, con forma de uso, no septados, hialinos y sus dimensiones fueron de 8-27 x 4-5.5 μm , características que coinciden con las mencionadas por Fuentes *et al.* (1964) y Pažoutová (2001).

La colonia en medio de cultivo T2- agar y medio líquido T2, tuvo un crecimiento estromático compacto no esporulado, de color crema a beige (Figura 1. 5. A-B). En medio sólido se observan esporodoquios agrupados (Figura 1. 5. D), con ligeras pigmentaciones café en el agar. El micelio mostró una velocidad de crecimiento típica para el género de 1-1.5 cm de diámetro a 20 dds, 25°C \pm 2. Muthusubramanian *et al.* (2006). En el medio de cultivo se produce un líquido similar a una mielecilla (Figura 1.5. C), (Barnet y Hunter, 2006). La velocidad de crecimiento se vio afectada con las sub cultivación (2 años) disminuyendo el tamaño de la colonia 0.5- .08 cm 20 dds, las características concuerdan con las reportadas por Pazoutová *et al.* (2004).

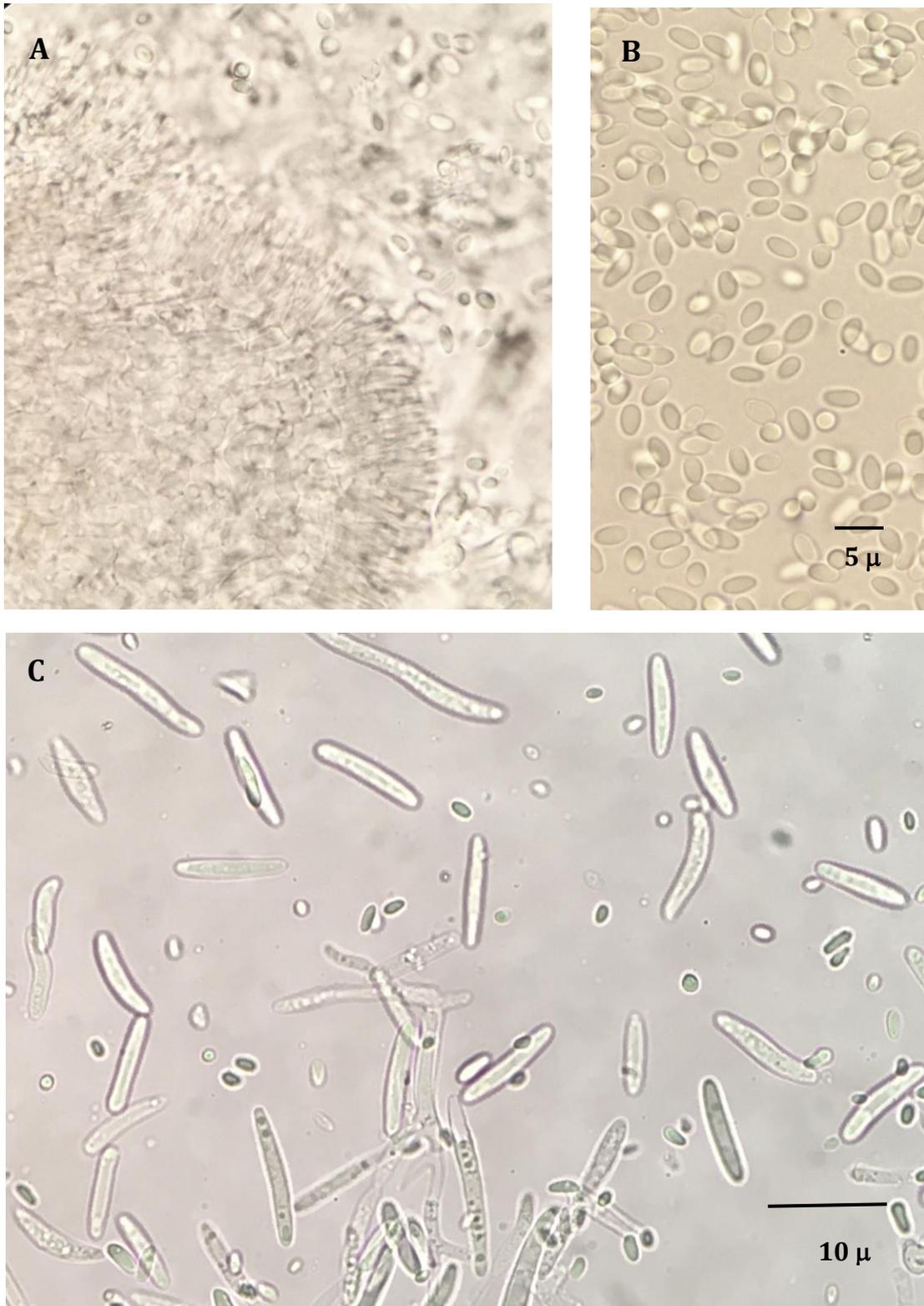


Figura 1. 4. Morfometría de *Sphacelia* sp. A. Crecimiento en palizada de conidioforos simples. B. Microconidios. C. Macroconidios. Observaciones realizadas a 40 X.

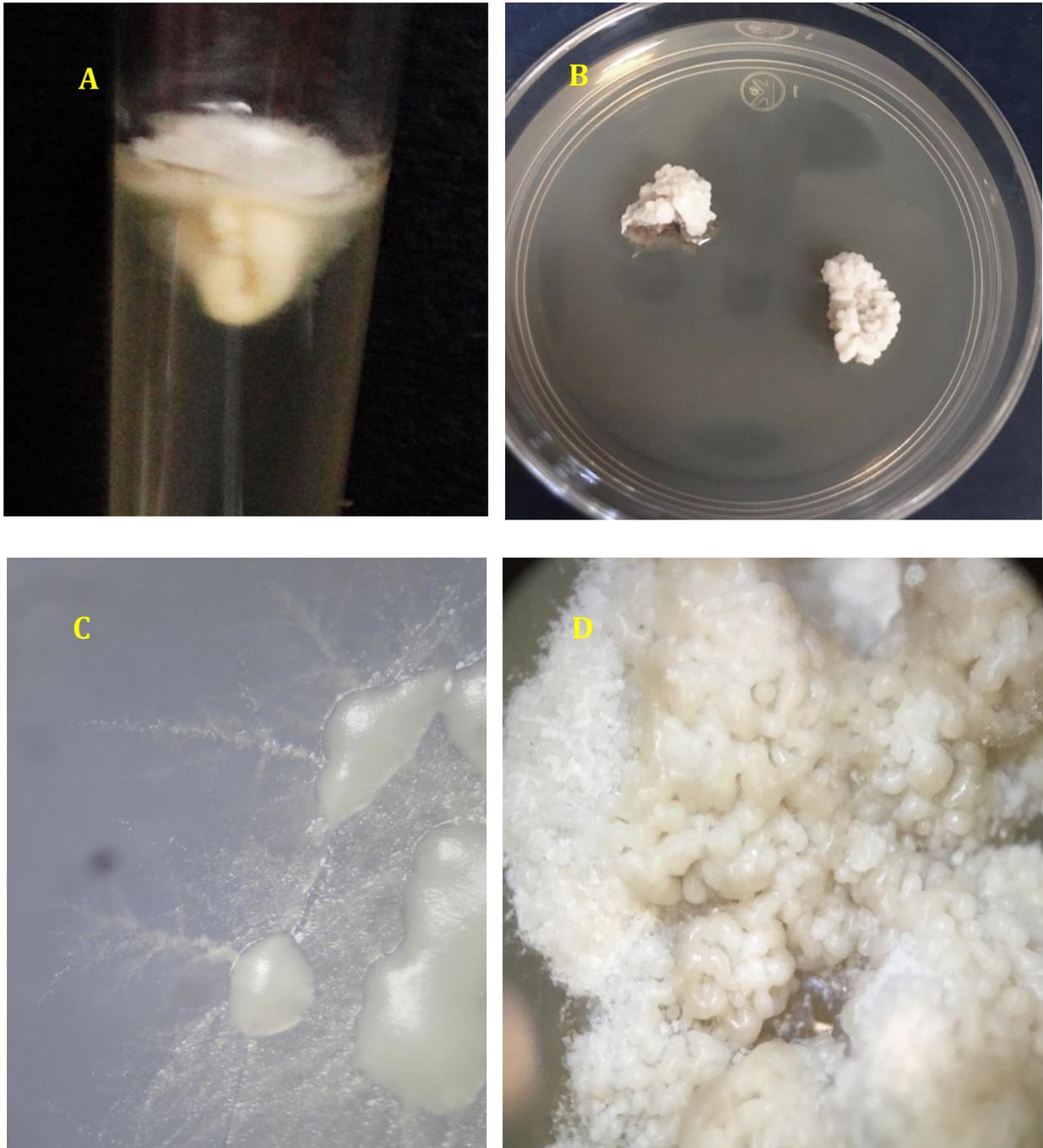


Figura 1. 5. Características culturales de *Sphacelia* sp. (*C. gigantea*, teleomorfo). A. crecimiento micelial en medio de cultivo papa-dextrosa 20 días después de la siembra (dds). B crecimiento micelial en medio de T2- agar (Pazoutová *et al.*, 2004), 20 dds. C. micro-colonias de *Sphacelia* sp. con producción de mielecilla en medio de cultivo T2- agar 2 dds. D. Colonia fungosa de *Sphacelia* sp. formación de esporoquios en medio de cultivo T2- agar 20 dds. acercamiento a 10 X.

1.5.3 Caracterización molecular

El ADN proveniente de los cultivos monospóricos obtenidos de las muestras procedentes de Estado de México, Puebla e Hidalgo. Amplificaron fragmentos de las regiones Internal Transcribed Spacer (ITS) 1, 5.8S rRNA, NL4 y parte de la subunidad grande del ribosoma (LSU), con los que el análisis BLASTn de la región secuenciada mostró un 99 % de similitud con el aislamiento CCC:336 de *C. gigantea* de maíz de México con numero de accesoión LT216554, (Pažoutová, 2001.). Así como 98 % de similitud con gen β tubulina exones 3 y 4 de la secuencia con numero de accesoión AY960841.1 (Tooley *et al.*, 2006).

Con base en la combinación de características morfológicas y análisis de secuencias de las regiones amplificadas, todas las muestras colectadas fueron asociadas a *C. gigantea*.

1.5 4 Postulados de Koch

Es necesario desarrollar métodos de inoculación artificiales para generar epidemias controladas y de este modo identificar fuentes de resistencia (Bandyopadhyay *et al.*, 1998). Con este fin se realizó la inoculación del híbrido comercial de maíz, donde los signos de *C. gigantea* fueron visibles desde el día 40 después de la inoculación. Sin embargo, se cosecho al día 60 cuando los esclerocios estaban completamente formados (Figura 1. 6 y 1. 7).

El método de inoculación por inyección fue eficiente para producir infección en mazorcas de maíz (Cuadro 1. 5). Con respecto al método de inoculación por aspersión, se obtuvo una cantidad mínima de mazorcas infectadas por lo que estadísticamente tuvo un comportamiento similar al del testigo inoculado con agua destilada estéril (Cuadro 1. 5).

La alta concentración de macroconidios en el inóculo de mayor severidad ya que estos son los que causan la dispersión de la enfermedad de manera natural (Pažoutová *et al.*, 2004.). Sin embargo, para seleccionar posibles fuentes de resistencia, es necesario que la infección artificial generada permita evaluar el material sin causar una infección total (Musabyimana, *et al.*, 1995).

El método de inoculación por inyección produjo infección en todas las plantas inoculadas, por lo que, aun se debe continuar con la búsqueda de la concentración de inóculo adecuado para evaluar materiales resistentes.

Cuadro 1. 5. Porcentaje de plantas infectadas con *C. gigantea* generadas con inoculación artificial del estado asexual (*Sphacelia* sp.) en los ciclos de cultivo 2016 y 2017, en Toluca Estado de México.

Tratamiento	Media	
	Evaluación 2016 ^{&}	Evaluación 2017 [¶]
T1: Inyección 1x10 ⁶ /mL	76.630 ^b	78.629 B
T2: Asperción 1x10 ⁷ /mL	90.373 ^a	96.40 A
T3: Inyección 1x10 ⁶ /mL	3.420 C	6.510 C
T4: Asperción 1x10 ⁷ /mL	7.5100 C	4.420 C
T5: Testigo inoculado con agua destilada	0.000 C	0.000 C

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

[&]DMS (5%): 9.4936 [¶]DMS (5%): 9.65

[&]CV: 8.1449 [¶]CV: 8.16



Figura 1. 6. Mazorcas cosechadas, 60 días después de la inoculación en un híbrido comercial, Toluca, Estado de México ciclo de cultivo 2017. A. Mazorcas del testigo inoculado con agua destilada estéril. B. Mazorcas con signos de *C. gigantea* del tratamiento de aspersión.



Figura 1. 7. Mazorcas cosechadas con signos de *C. gigantea* ,60 días después de la inoculación en un híbrido comercial, Toluca, Estado de México ciclo de cultivo 2017. A. Mazorcas inoculadas con inyección a 1×10^6 conidios/ ml. B. Mazorcas inoculadas con inyección a 1×10^7 conidios/ ml.

1.5.5 Análisis cualitativo de ergot alcaloides

Los extractos analizados obtenidos de los esclerocios triturados mostraron seis bandas que presumiblemente representan un compuesto de tipo alcaloide con Rfs de 0.05, 0.125, 0.33, 0.38, 0.68 y 0.81 (Figura 1. 8 A-B), relacionado con la polaridad del compuesto (Agurell, 1963). Las bandas fueron evidentes después del revelado con el reactivo de van Urk's y luz ultravioleta (Figura 1. 8 A-B).

Los esclerocios de *C. gigantea* producen una mezcla de alcaloides donde los componentes se encuentran en diferentes proporciones como, festuclavina 65 %, D-dihydrolysergol- (I) 15 %, chanoclavina 7 %, pyroclavina 3 % (Agurell, 1965). Las bandas observadas se asociaron a estos compuestos (Naudé *et al.*, 2005).

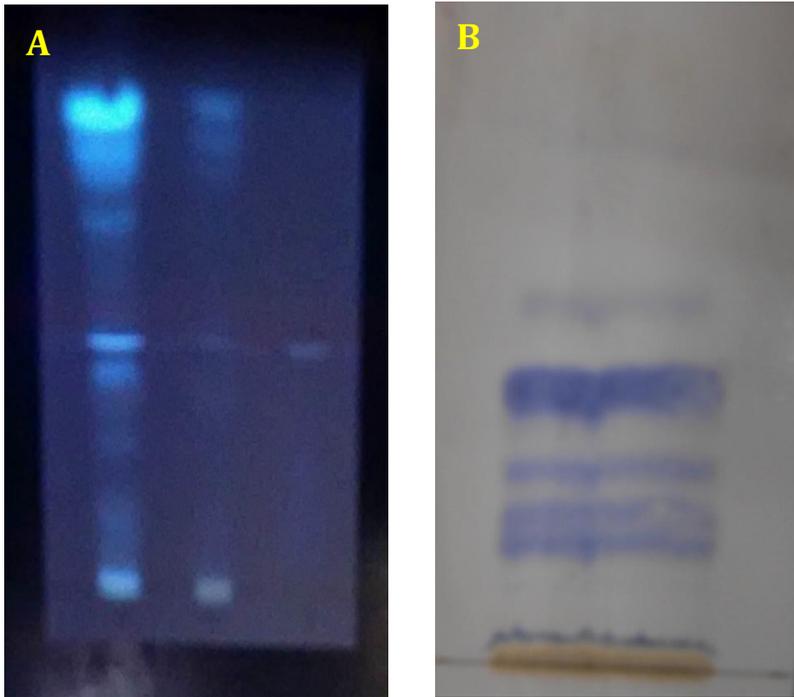


Figura 1. 8. Cromatoplasmas de sílica gel. A expuesta a luz UV. B. asperjada con el reactivo de Van Urk.

1.5.6 Análisis cuantitativo Análisis cuantitativo

La concentración de alcaloides se analizó en el polvo de esclerocios por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los compuestos que se detectaron estuvieron relacionados con los derivados de ergolina (Figura 1. 9), que incluyen una serie de metabolitos como dh- elymoclavina, chanoclavina, pyroclavina y el alcaloide considerado como derivado peptídico como dh- ergosina (Figura 9) También se encontró otro alcaloide desconocido en relación con los estándares utilizados. Además, se encontraron compuestos ergosteroles en altas concentraciones. Pero no se detectó la presencia del ácido lisérgico.

Los esclerocios de *C. gigantea* producen una mezcla de alcaloides donde los componentes se encuentran en diferentes proporciones como, festuclavina 65 %, D-dihydrolysergol- (I) 15 %, chanoclavina 7 %, pyroclavina 3 % (Agurell 1965). No obstante, en las muestras utilizadas de *C. gigantea* se encontraron proporciones diferentes, como Chanoclavina I que fue la más abundante, siendo este compuesto, el primer intermediario que se acumula en productores de alcaloides tipo ergot, y en algunos casos en concentraciones relativamente altas. En el caso de *C. gigantea* y *C. africana*, este compuesto se oxida en Chanoclavina I aldehído, seguido de una reducción y como producto final festuclavina (dihidroergot) (Robinson y Panaccione 2015).

Piroclavina es un estereoisomero de festuclavina que se considera un producto menor (Agurell 1965). Sin embargo, en las dietas elaboradas, este alcaloide estuvo en mayor proporción. La formación de este compuesto pudo estar influenciada por el proceso de peletización, aunque las micotoxinas pertenecen a diferentes grupos de compuestos regularmente son termoestables y no volátiles (White et al. 2003). Existen estudios que demuestran que los alcaloides producidos por especies del género *Claviceps* no solo sobreviven el proceso de formación de pastas para alimento, sino también el proceso de horneado (Shelby, 2006).

Aun cuando los principales alcaloides en el género *Claviceps* son festuclavina y dihidrolisergomidas (Pažoutová 2001), dos miembros de la familia Clavicipitecea (*C. africana* y *C. gigantea*) producen el alcaloide dihidroergot vía la rama de festuclavina, que sigue una vía lineal sin generar mucha diversidad. *C. gigantea* termina su ruta en dihidrolisergol, la primera oxidación producto de festuclavina. Mientras que *C. africana* completa la oxidación de festuclavina a partir de

ácido dihidrolisergico e incorpora ácido dihidrolisergico exclusivamente dentro de dihidroergopeptina y dihidroergosina (Robinson y Panaccione 2015).

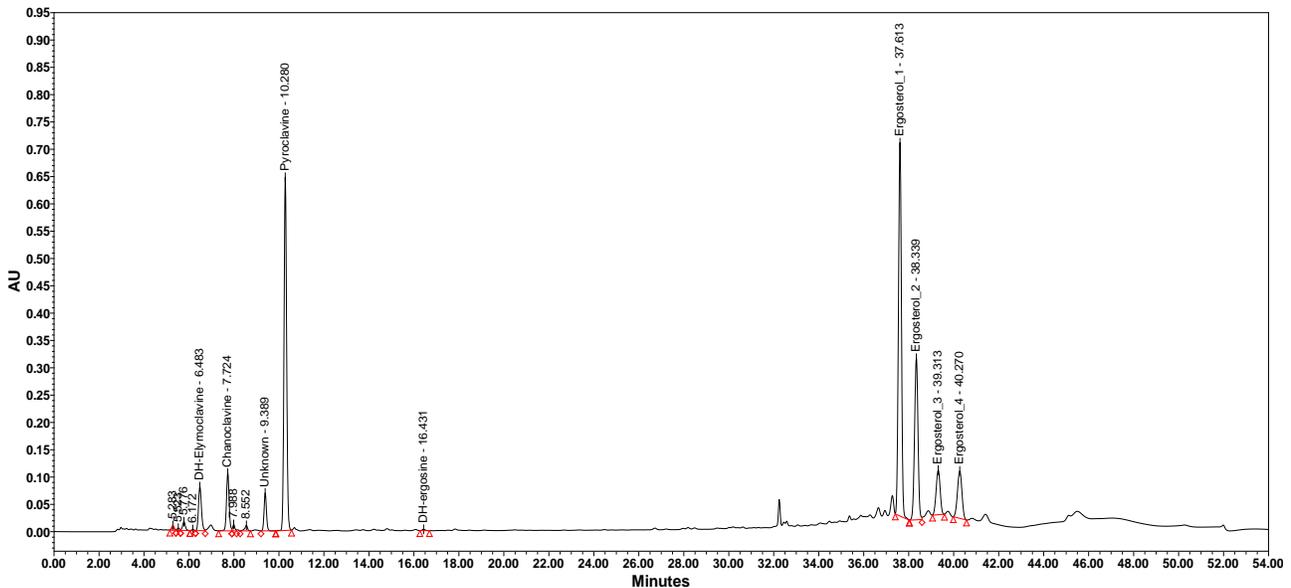


Figura 1. 9. Cromatograma de HPLC de extracto crudo de esclerocios (UV 228 nm). Alcaloides obtenidos con diclorometano y amonio colectados en Calimaya, Estado de México.

La concentración total de alcaloides fue diferente fue diferente con respecto al año de colecta y lugar de procedencia (Figura 1. 10 y 1. 11). Se han reportado diferentes rutas biosintéticas de alcaloides ergot que se encuentran en la naturaleza, pudiendo asociarse al resultado de mutaciones naturales, o a una completa falta de genes relevantes, lo que define que se sintetice o no un compuesto (Tudzynski *et al.*, 2001).

Los alcaloides son compuestos químicos que tienen propiedades farmacológicas a concentraciones bajas (Ibarra- Estrada *et al.*, 2011). Aun cuando los alcaloides ergot son metabolitos fungosos que tienen una larga historia en las micotoxinas, aunque sus efectos en el sistema nervioso central son deletéreos también tienen una larga aplicación biotecnológica, con múltiples aplicaciones en terapia humana (Tudzynski *et al.*, 2001) para el caso específico de los producidos por *C. gigantea* no existe información de su uso en farmacología o en otro tipo de industria. Por lo tanto, se consumen de manera accidental en productos elaborados a base de maíz contaminado o son ingeridos por el ganado alimentado con este tipo de maíz.

La muestra de producto comercial hecho a base de maíz amarillo y azul, presento un alto contenido de alcaloides (Figura 1. 12), lo que evidencia la falta de regulación para la comercialización de maíz contaminado.

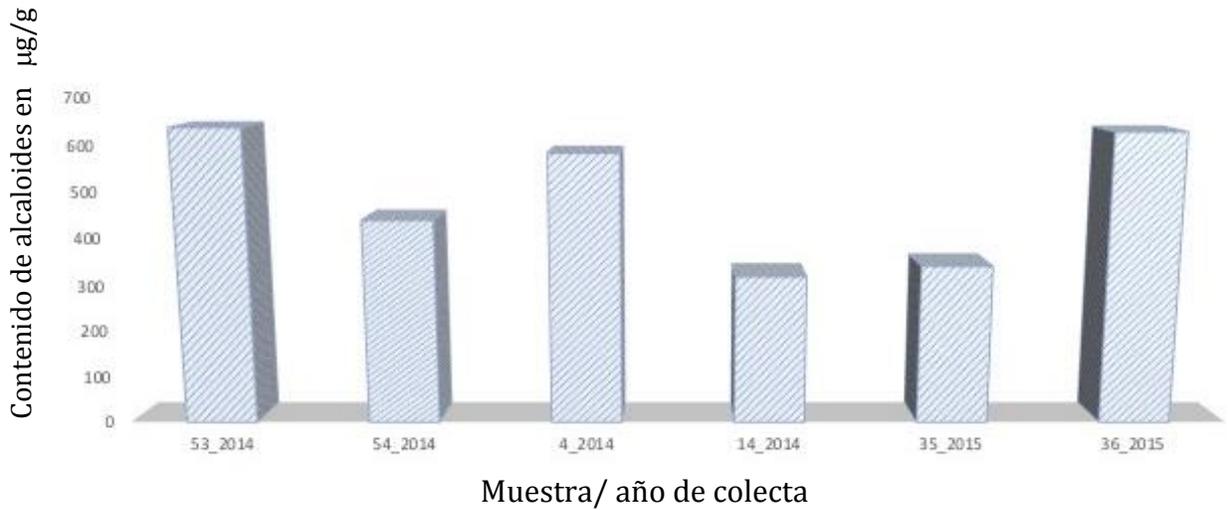


Figura 1. 10. Contenido total de alcaloides en esclerocios de *C. gigantea* provenientes de Tenango, Estado de México y Acaxochitlan, Hidalgo, México.

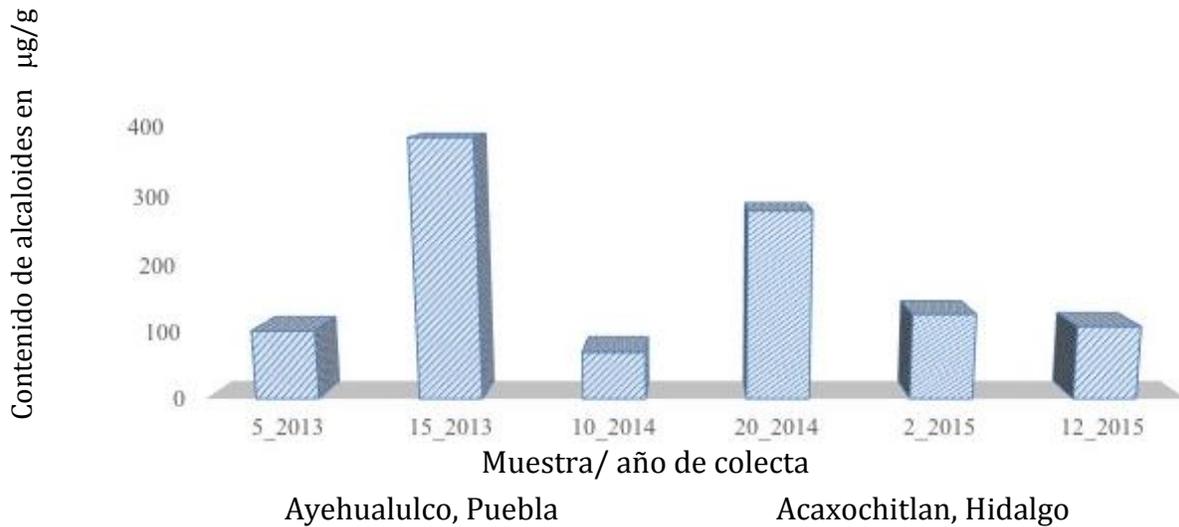


Figura 1. 11. Contenido total de alcaloides en esclerocios de *C. gigantea* provenientes de Ayehualulco, Puebla, México (muestra 5, 15 y 10) y Acaxochitlan, Hidalgo, México (muestra 20, 2 y 12).

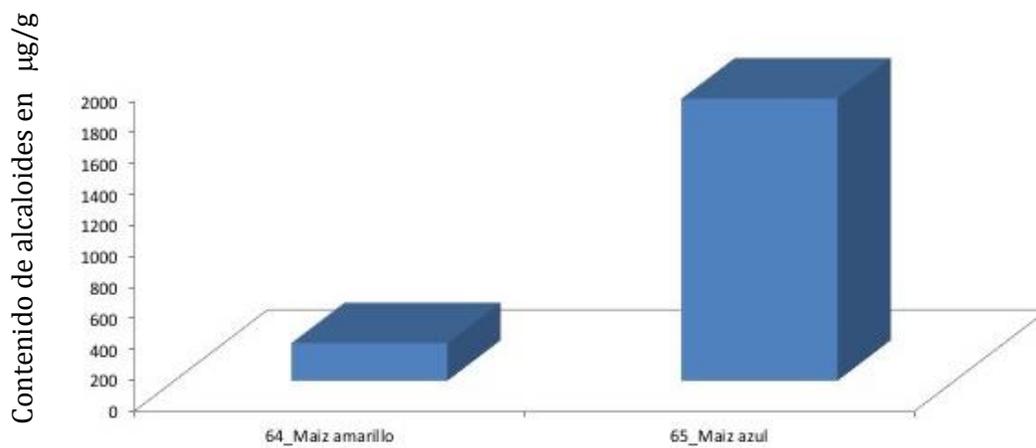


Figura 1. 12. Contenido total de alcaloides en 100 g de muestra de producto comercial elaborado a base de tortilla de maíz azul y amarillo.

1.6 CONCLUSIONES

El hongo *C. gigantea* se encontró en zonas donde no estaba reportado como Hidalgo y Puebla.

El fitopatógeno *C. gigantea* produce ergoalcaloides del tipo dihidroergopeptina y dihidroergosina.

La cantidad de alcaloides encontrados en esclerocios de *C. gigantea* es diferente en tiempo y espacio.

1.7 LITERATURA CITADA

- Agrios G., N. 2005. Plant pathology. 5th ed. Ed. Elsevier Academia press. New York. 922 p.
- Agurell, S. L. and E. Ramstad. 1965. A new ergot alkaloid from mexican maize ergot. Acta Pharmaceutica Suecica 2: 231-238. DOI: 10.1055/s-0028-1100254.
- Bandyopadhyay, R., Frederickson, D., McLaren, N., Odvody, G., and M. Ryley. 1998. Ergot: A new disease threat to Sorghum in the Americas and Australia. Plant Disease 82(4): 356- 367.
- Barnet L.H., and Hunter, B.B. 2006. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th E. APS . 241 p.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). 2017. Información climatológica por estado – Servicio Metrológico Nacional. Disponible en línea: <http://smn.conagua.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=mex>. Consultado el 28/10/17.
- Fučíkovsky, L. y M. Moreno. 1971. Distribution of *Claviceps gigantea* and its percent attack on two lines of corn in the state of Mexico, Mexico. Plant Disease Reporter: 55(3):231-233.
- Fuentes, S.F., De la Isla, M. L., Ullstrup, A. J. y Rodríguez, A.E. 1964. *Claviceps gigantea* a new pathogen of maize in México. Phytopathology 54:379-381.
- Gardes, M. and T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rust. Molecular Ecology 2:113-118.
- Ibarra- Estrada, E., Pacheco-Sanchez, M., García- Mateos, R., San Migel- Chavez, R., Ramirez- Valverde G. y M.R., Soto-Hernandez. 2011. Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller. Revista Fitotecnia Mexicana 34(4): 241-246.
- Kolařík, M., Freeland, E., Utley, C., and N. Tisserat. 2011. *Geosmithia morbida* sp. nov., a new phytopathogenic species living in symbiosis with the walnut twig beetle (*Pityophthorus juglandis*) on *Juglans* in USA. Mycologia 103 (2):325-332. Doi: 10. 3852/10-124.
- Moreno, M.C. 2014. Germinación de esclerocios y formación de ascosporas de *Claviceps gigantea*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, México. 54 p.
- Motte-Florac E.S. 2008. Santos, humores y tiempo: el clima y salud entre los purépechas de la sierra tarasca (Michoacán) In: Aires y lluvias. Antropología del clima en México: Centro de estudios mexicanos y centroamericanos. Disponible en línea <http://books.openedition.org/cemca/1285>. ISBN: 9782821827790. Doi:10.4000/books.cemca.1285.
- Musabyimana, T., Sehene, C., and R. Bandyopadhyay. 1995. Ergot resistance in sorghum in relation to flowering, inoculation technique and disease development. Plant Pathology 44: 109-115.

- Muthusubramanian, V., Bandyopadhyay, R., Rajaram, R.D., Tooley, P. W. 2006. Cultural characteristics, morphology, and variation within *Claviceps africana* and *C. sorghi* from India. *Mycological Research* 110: 452-464.
- Municipios. 2017. Todos los municipios del estado del México. Disponible en línea en <http://www.municipios.mx/mexico/toluca/>. Consultado el 28/10/2017.
- Naude, T.W., Botha C. J., and J. H. Vorster. 2005. *Claviceps cyperi*, a new cause of severe ergotism in dairy cattle consuming maize silage and teff hay contaminated with ergotised *Cyperus esculentus* (nut sedge) on the Highveld of South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 72:23–37. DOI: 10.4102/ojvr.v72i1.221.
- Lugo-Hubp, J. 1990. El relieve de la República Mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geología. 9 (1): 82-111.
- Ondřej, M., Cagaš, B., and E. Ondráčková. 2010. Effect of the Mycoflora of Ergot (*Claviceps purpurea*) Sclerotia on their viability. *Plant Protection Science* 46(2): 66-71.
- O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In the *Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, 225-233.
- O'Donnell, K. And E, Cigelnik. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7(1): 103-106.
- Pažoutová, S. 2001. The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps* *Mycological Research* 105 (3): 275–283.
- Pažoutová S. 2003. The evolutionary strategy of *Claviceps*. 329-354 p. In: White J. F., Bacon C. W., Hywel-Jones N. L., Spatafora J. W., (eds.) *Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol, and Cultural Impacts*. NY, USA: Marcel Drekker
- Pažoutová, S. Kolarík, M., Kolínská. 2004. Pleomorphic conidiation in *Claviceps*. *Mycological Research* 108: 126-135.
- SAS Institute.1999. *Statistical analysis System. The SAS system for Window release 8.0 U.S.A.* pp. 558.
- Tooley, P., Bandyopadhyay, R., Carrar, M., and S. Pažoutová. 2006. Analisis of *Claviceps africana* and *C. sorghi* from India using AFLPs, EF-1 α gene intron 4, and β -tubulin gene intron 3. *Mycological Research* 110: 441-451.
- Tudzynski, T., Correia, T., and U. Keller. 2001. Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 593-605. Doi. 10.1007/s002530100801.

- Trujillo, T.R. 1971. "Los climas de la Sierra Tarasca (según el sistema original de Köppen y el modificado por García)" en Boletín del Instituto de geografía: 4: 37-48. Disponible en. línea http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-46111975000100007&lng=pt&nrm=iso. Consultado el 20/10/17.
- Ullstrup, A.J. 1973. Maize ergot: a disease with a restricted ecological niche. PANS Pest Articles and News Summaries. 19(3): 389-390. doi.10.1080/09670877309412786.
- Warham, E.J., Butler, L.D., and B.C. Sutton. 1999. Seed testing of wheat a laboratory guide. CIMMYT, Mexico. 83 p.
- White, J. F., Bacon, C. W., Hywel-Jones, N.L. and Spatafora, J. W. 2003. Clavicipitalean fungi evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts. Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology Chemistry, Biocontrol, and Cultural Impacts. Marcel Denkker, Inc. New York, pp 329-354.

CAPITULO II. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Claviceps gigantea* EN CONEJOS NUEVA ZELANDA

2.1 RESUMEN

El hongo *Claviceps gigantea* infecta inflorescencias femeninas de maíz y sintetiza una mezcla de alcaloides, principalmente dihydrolysergamides. Existen antecedentes limitados del daño de estos compuestos en mamíferos, a pesar de haber en siembras comerciales de maíz incidencia del 90 % de esclerocios del hongo. Se decidió llevar a cabo una investigación para determinar la actividad biológica de compuestos presentes en esclerocios de *C. gigantea* en gazapos machos de 38 días. Por esto, se extrajeron metabolitos secundarios y aminoácidos de esclerocios *C. gigantea*, para analizarlos utilizando cromatografía en capa fina. Esclerocios colectados en campo, se molieron y se analizaron bromatológicamente. Se elaboraron dietas experimentales con cuatro tratamientos, agregando polvo de los esclerocios en sustitución de harina de alfalfa de manera progresiva [*C. gigantea*: harina de alfalfa (0:100, 5:95, 15:85 y 25:75)], en las que se analizó el contenido total de alcaloides por cromatografía de líquidos de alta resolución. Se utilizaron gazapos machos, que se distribuyeron completamente al azar con cuatro repeticiones. Se registró el peso inicial de cada uno de ellos y se les ofreció la dieta experimental. En esta investigación, se evaluó peso vivo, consumo alimenticio y conversión alimenticia de cada conejo. Se tomaron muestras de sangre para elaborar hemogramas y finalmente, se les practicó la eutanasia. El consumo de *C. gigantea* tiene un efecto negativo, en relación con el peso corporal y disminución del consumo de alimento. Las necropsias revelaron anomalías proporcionales al consumo de alimento contaminado con esclerocios.

Palabras clave: ergot alcaloides-maíz, nutrientes-ergot, clavininas-efecto, conejos- diente de caballo.

2.2 ABSTRACT

The Ascomycete fungus *Claviceps gigantea* infects female maize inflorescence and synthesizes several alkaloids, mostly dihydrolysergamides. There is limited information on the damage these toxics cause in mammals, despite reports from infested areas with 90% presence of the fungal sclerotia. With this background, it was decided to determine the biological activity of chemical compounds present in sclerotia of *C. gigantea* in 38 days old male rabbits. To this end, secondary metabolites and amino acids were extracted from *C. gigantea* sclerotia to be analysed by thin layer chromatography. The sclerotia were collected in fields with high incidence of the disease, ground to powder and analysed bromatologically. Experimental diets were prepared with 4 treatments, where sclerotial powder was added substituting alfalfa flour in increasing proportions [*C. gigantea*: alfalfa flour (0:100, 5:95, 15:85, and 25:75%)]. Total alkaloid content was analysed by high resolution liquid chromatography. Male juvenile rabbits were utilized and distributed in completely randomized design with four replications. Initial weight was recorded in each animal and experimental diet was offered. In this study, body weights, feed consumption, and feed conversion were evaluated in individual animals. Blood samples were taken for haemograms, and finally euthanasia was practiced. The consumption of *C. gigantea* has a negative effect on body weight. The necropsies showed anomalies proportional to the consumption of feed contaminated with the fungus.

Key words: ergot-maize, ergot-nutrients, clavines, ergot- juvenile rabbits.

2.3 INTRODUCCIÓN

Los hongos fitopatógenos del género *Claviceps* parasitan plantas de la familia Poacea, Ciperacea y Juncacea, remplazando el ovario de flores femeninas con un esclerocio. El problema principal no es una pérdida severa en la cantidad de semilla, sino la mala calidad de grano debido al contenido de alcaloides en los esclerocios (Kren y Ladiskav 2006). Especies del género *Claviceps* producen compuestos alcaloideos como ácido d- lisérgico, ergopeptinas y clavinas, que pueden inducir problemas de salud en animales (Naudé *et al.* 2005).

Específicamente *C. gigantea* metaboliza una mezcla de alcaloides de tipo clavinas que causa problemas en el sistema nervioso central muscular, hemorragias en el endocardio y pulmones de mamíferos (Yui y Takeo 1958). En la agricultura, los alcaloides del cornezuelo tienen efecto antiherbívoro y pueden manifestar efecto tóxico en animales (Panaccione *et al.* 2006).

En pollos en crecimiento, existe una disminución de su peso al incorporar esclerocios en su dieta (Márquez y Ávila, 1973), úlceras estomacales y lesiones hemorrágicas en el hígado, coloración amarilla intensa en piel y palidez en patas y pico, así como malformación en alas (Fučíkovský *et al.* 1967).

En ratones blancos, al ser alimentados con esclerocios de *C. gigantea* rechazaron el consumo del alimento y posteriormente su progenie nació muerta (Fučíkovský y Moreno 1968). En conejos blancos alimentados con esclerocios, al ser sacrificados, se observó hemorragias internas (Fučíkovský y Moreno 1968). Sin embargo, los alcaloides del tipo dihidroergolina, presentes en esclerocios de *C. gigantea* no han sido estudiados con respecto al efecto tóxico en humanos (Pažoutová 2002).

En Toluca, Estado de México, se presentó una incidencia del 90% en maíz híbrido causado por *C. gigantea* (Moreno-Manzano *et al.* 2016). El maíz que se produce en esa zona, es comercializado para consumo humano y animal, sin ningún tipo de regulación con respecto al límite máximo de esclerocios permitido en la cosecha, lo cual representa un riesgo para la salud. Debido a la alta incidencia, el objetivo principal de este estudio fue examinar el efecto de incrementar porciones de ergot, con una concentración definida de alcaloides en conejos en iniciación, sobre su salud y usarlo como un modelo de referencia para comportamiento en mamíferos.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Sitio de recolección de muestras

Durante los ciclos de producción primavera-otoño 2012-2014, se realizaron colectas de esclerocios dirigidas en parcelas con cultivo comercial de maíz en el Estado de México. En el sitio de muestreo, se tomaron las coordenadas del lugar con ayuda de un GPS (Garmin, EE. UU).

2.4.2 Detección de alcaloides en esclerocios de *C. gigantea*

Se determinó la presencia de metabolitos secundarios en esclerocios de *C. gigantea*, antes y después de ser incorporados en las dietas experimentales. Se utilizaron muestras de esclerocios triturados y pulverizados con un molino de martillo y pasados por una tamiz de 2 mm. (Milley Will, EE. UU).

El extracto de la fracción alcaloidea, se obtuvo cubriendo esclerocios triturados con acetato de etilo durante 4 h en agitación. Se separó la fase orgánica por filtración, se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a sequedad con ayuda de un rotavapor. Para analizar los alcaloides presentes en el extracto el residuo obtenido se disolvió en 10 mL de acetato de etilo, se extrajo dos veces con un volumen de 0.01 M de ácido clorhídrico y se ajustó la fase acuosa a pH 9 con hidróxido de amonio, se extrajo dos veces la fase acuosa con diclorometano y se evaporó a sequedad. De esa forma, se purificó y detectaron los alcaloides del tipo clavina (Wallwey y Shu-Ming 2012).

El extracto alcaloideo se utilizó para su detección por cromatografía en capa fina (CCF). La muestra se colocó de forma puntual, con ayuda de un tubo capilar, sobre una placa de sílice 60, F₂₅₄ (Sigma-Aldrich), donde se aplicaron aproximadamente 15-20 µL del extracto. Para la fase móvil se utilizó una mezcla de solventes polares [metanol: cloroformo: hidróxido de amonio (J.T. Baker, EE:UU)] en una proporción de 80: 20 : 0.02.

La cromatoplaqueta completa se asperjó con 3 ml con el reactivo de van Urk's (0.2 g 4-dimetilaminobenzaldehído) (Sigma Aldrich, EE.UU), se disolvió en 100 ml de ácido clorhídrico (Sigma, Mexico) 25 % y 5µL de FeSO₄ (Fermont) 10 %. Posteriormente, la placa se visualizó con luz negra a una longitud de onda de 365 nm, con una lámpara con luz ultravioleta UVP (UVLMS-38). Una vez corroborada la presencia y abundancia de los alcaloides se procedió a elaborar las dietas experimentales (Sauvant *et al.*, 2004; Adamo y Costanza 2013).

2.4.3 Elaboración de dietas experimentales para conejo

Los esclerocios triturados se trabajaron en el Laboratorio de Nutrición Animal del postgrado en Ganadería, del Colegio de Postgraduados, donde se determinó proteína, extracto etéreo, cenizas, fibra detergente cruda, fibra detergente ácida, fibra detergente neutra y lignina, de acuerdo con los protocolos de A.O.A.C. (1995) de muestras por triplicado.

Adicionalmente, se envió una muestra de esclerocios molidos a Evonik Industries AG Analytical Lab, EE. UU (certificado por la ISO 9001), para obtener un aminograma y calcular las dietas experimentales (Adamo y Costanza 2013) (Cuadro 2. 1).

En la dieta calculada para alimentar a los conejos, el análisis bromatológico de los esclerocios molidos reveló valores similares a los de alfalfa en materia seca y mayor contenido de fibra, diferencias que se balancearon al elaborar las dietas experimentales. El polvo de esclerocios de *C. gigantea* usado proporciona la cantidad de fibra necesaria para cumplir los requerimientos alimenticios de estos animales. La alfalfa representó 25.31 % del total de los componentes, seleccionado para ser sustituido en diferentes porcentajes por esclerocios molidos [*C. gigantea*: harina de alfalfa (0:100, 5:95, 15:85 y 25:75)]. De acuerdo con esta proporción, se formuló una dieta testigo que no contenía esclerocios molidos, en su composición nutricional (Sauvant *et al.*, 2004).

Cuadro 2. 1. Composición de las dietas experimentales para conejo de engorda con diferentes cantidades de polvo de *C. gigantea*.

Ingrediente %	Tratamientos			
	0 [§] /100 [¶]	5 [§] /95 [¶]	15 [§] /85 [¶]	25 [§] /75 [¶]
Esclerocios	0.00	5.31	15.31	25.31
Maíz amarillo	6.00	6.00	6.00	6.00
Cascarilla de soya	10.53	10.53	10.53	10.53
Alfalfa				
deshidratada(17PC)	25.317	20.00	10.00	0.00
Salvado de trigo	38.27	38.27	38.27	38.27
Melaza	5.00	5.00	5.00	5.00
Canola (36PC)	5.86	5.86	5.86	5.86
Pasta de soya (48PC)	6.00	6.00	6.00	6.00
Aceite crudo	0.50	0.50	0.50	0.50
FM Conejo engorda	2.00	2.000	2.000	2.000
CaCO ₃ (38%)	0.44	0.44	0.44	0.44
Fosfato (18/21)				
	100	100	100	100
Análisis calculado				
EM (kcal ⁻¹ kg)	2800	2800	2800	2800
Proteína cruda (%)	16.5	16.54	16.62	16.71
Fibra bruta(%)	14	14	14	14
Calcio (%)	0.9	0.9	0.9	0.9
Fósforo disponible(%)	0.66	0.66	0.66	0.66
Lisina (%)	0.87	0.89	0.95	0.99
Metionina+cisteina(%)	0.64	0.64	0.63	0.63
Triptofano (%)	0.27	0.27	0.27	0.27
Treonina (%)	0.67	0.69	0.74	0.79

18 % = fósforo y 21 % = calcio, 38 % = calcio. [§] Porcentaje de *C. gigantea*; [¶] Porcentaje del ingrediente en el alimento. Composición nutricional de esclerocios molidos de *C. gigantea*. Porcentajes dados en base seca. Materia seca; 94.02 %, extracto etéreo; 15.48 %, fibra cruda; 38.77 %, lignina 17.37 %. Composición nutricional de alfalfa en base seca, materia seca; 93 %, extracto etéreo; 3 %, fibra cruda; 24 %, lignina 7.8 %. Fuente: Cuca *et al.* (2009).

2.4.4 Producción de pellets

Los ingredientes de la dieta se mezclaron y fue necesario incorporar un aglutinante en cada tratamiento, (4 g kg⁻¹ de alimento y 3 L de agua por cada 40 kg de alimento). Posteriormente, con una mezcladora industrial (Eureka® EE. UU), se obtuvo una mezcla homogénea. Cada dieta experimental se introdujo a una máquina peletizadora (California Pellet Mill ® EE. UU), a 75 rpm que elabora las píldoras con presión mecánica. Las píldoras recuperadas se secaron a temperatura ambiente para finalmente ser almacenados.

2.4.5 Análisis de alcaloides en dieta experimental con esclerocios de *C. gigantea*

Para la cuantificación de alcaloides se utilizaron 200 mg de polvo fino de esclerocios de las muestras empleadas en la elaboración de las dietas. La extracción se realizó con 1 mL de diclorometano (Neratovice, Czech Republic) y 25 µL de hidróxido de amonio. Para el análisis con cromatografía de líquidos de alta definición (por sus siglas en inglés HPLC: High performance liquid chromatography), el extracto crudo se centrifugó a 10000 g y se inyectó 50 µl en el cromatógrafo (Flieger *et al.* 1993). Para la cuantificación de los alcaloides, se utilizaron cinco estándares DH-elymoclavina, chanoclavina, pyroclavina, festuclavina, y DH-ergosina obtenidos de Alfarma s.r.o. (Cernosice, Czech Republic), con los que se realizaron curvas de calibración de cada compuesto. Las lecturas se hicieron en una absorbancia de 288 nm.

2.4.6 Diseño experimental y procedimientos

Declaración ética. El experimento se desarrolló bajo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999 por la que se establecen las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Se utilizó un total de 40 gazapos machos Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) de 38 días postdestete, con un peso inicial homogéneo. Estos se distribuyeron completamente al azar en cuatro tratamientos, con 10 conejos por tratamiento y un conejo como unidad experimental. Los conejos se mantuvieron en jaulas individuales de acero galvanizado provistas de bebederos automáticos.

El alimento se ofreció a libre acceso para un período inicial de adaptación alimentándolos durante seis días con la dieta antes elaborada mezclada con alimento comercial. Posteriormente, se alimentaron con las dietas experimentales [Dieta experimental: Dieta comercial (25:75, 50:50, 75:25 y 0:100)]. El consumo de alimento se obtuvo diariamente resultado de la diferencia del peso de alimento ofrecido y del rechazado.

Se registró el peso inicial de cada conejo y se realizó el pesaje cada 7 días. Durante el experimento se calculó el peso vivo semanal durante un periodo de 28 días. La conversión alimenticia se obtuvo del consumo de alimento y la ganancia de peso.

Los gazapos se medicaron con Enrofloxacin al 10 % para manejo de enfermedades respiratorias (Maver) y Trisulfa (Oeffler) para prevención de coccidiosis. Los medicamentos se suministraron en el agua.

2.4.7 Parámetros clínicos considerados por el consumo de *C. gigantea*

Para el análisis de química clínica, se colectaron muestras de sangre tomadas del corazón de cada conejo en tubos vacutainer con EDTA-K₂. Con la finalidad de analizar los componentes de la sangre se evaluaron: hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, reticulocitos, plaquetas, leucocitos, neutrófilos, metamielocitos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. Posteriormente, a los conejos se les practico la eutanasia. Las muestras se enviaron el mismo día en refrigeración al Laboratorio de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

2.4.8 Salud animal y comportamiento

El comportamiento de los conejos se monitoreo de manera visual tres veces al día, registrándose actividades como movimiento, frecuencia de problemas estomacales y respiratorios, consumo de agua y cecotrofia.

2.4.9 Análisis estadístico

La información colectada, se analizó con un diseño experimental completamente al azar, haciendo un análisis de varianza con el procedimiento MIXED, mediante el programa estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute Inc, 2003). El modelo estadístico para cada variable fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde;

Y_{ij} = valor de la variable respuesta correspondiente al i -ésimo tratamiento, en la j -ésima repetición;

μ = media general;

T_i = efecto del i esimo tratamiento donde $i = 1, 2, 3, 4$;

E_{ij} = error experimental del i -ésimo tratamiento y la j -ésima repetición.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Sitio de recolección de muestras

La mayor incidencia de *C. gigantea* se detectó en los Municipios de Calimaya (19°19'58"N, 99°61'14"O), Villa Victoria (19°25'48.4", 100°00'21.2", Tenancingo (19°24'54.3", 99°41'43.9") y Tlajomulco (19°24'27.3", 99°43'06.3"), localizados en el Estado de México, México.

2.5.2 Detección por cromatografía en capa fina

Los extractos analizados obtenidos de los esclerocios triturados mostraron seis bandas que presumiblemente representan un compuesto de tipo alcaloide con Rfs de 0.05, 0.125, 0.33, 0.38, 0.68 y 0.81, relacionado con la polaridad del compuesto. Las bandas fueron evidentes después del revelado con el reactivo de van Urk's y luz ultravioleta.

2.5.3 Cuantificación de alcaloides por HPLC en dietas experimentales para conejo

La concentración de alcaloides se analizó en el polvo de esclerocios utilizando cromatografía líquida de alta resolución

(HPLC). Los compuestos que se detectaron estuvieron relacionados con los derivados de ergolina (Cuadro 2.2), que incluyen una serie de metabolitos como dh-elymoclavina, chanoclavina, pyroclavina y el alcaloide considerado como derivado peptídico como dh- ergosina (Figura 2.1). También se encontró otro alcaloide desconocido en relación con los estándares utilizados. Además, se encontraron compuestos ergosteroles en altas concentraciones. Sin embargo, no se detectó la presencia del ácido lisérgico.

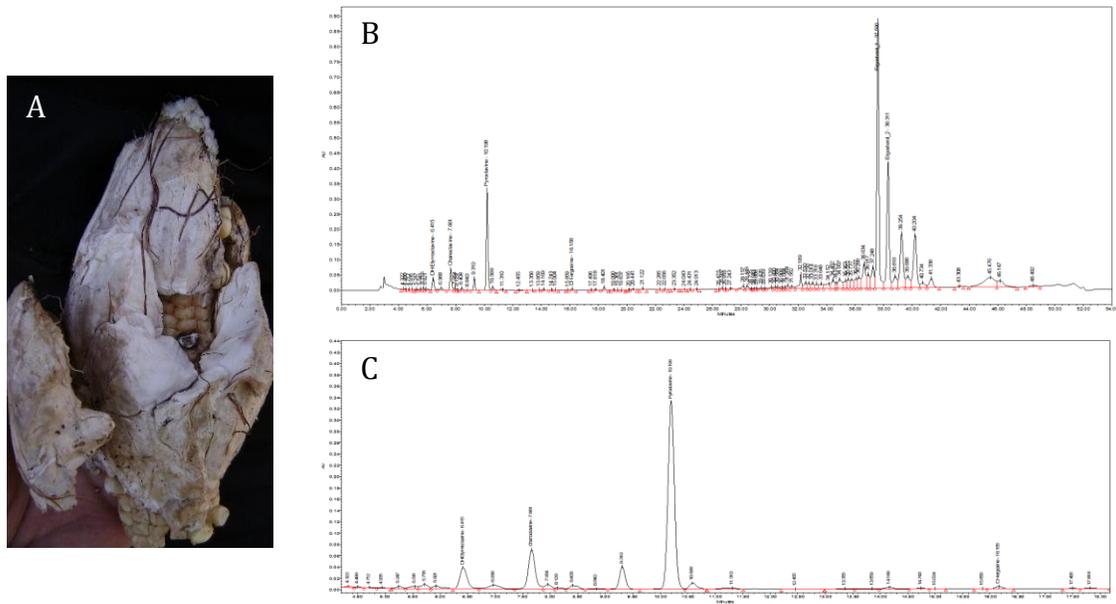


Figura 2. 1. Esclerocios y Cromatograma de *Claviceps gigantea* colectados en Calimaya Estado de México. **A.** Signos típicos del anamorfo de *C. gigantea*. **B- C.** Cromatograma de HPLC de extracto crudo de esclerocios (UV 228 nm) **C.** Alcaloides obtenidos con diclorometano y amonio.

Cuadro 2. 2. Concentración de alcaloides en la dieta experimental. Porcentaje total de alcaloides por tratamiento con porciones incrementadas de ergot.

Alcaloides	Testigo	Grupo			Ergot [§]	
		Esclerocio: Alfalfa				
		0 [§] :100 [¶]	5 [§] :95 [¶]	15 [§] :85 [¶]		25 [§] :75 [¶]
DH-Elymoclavina	-	1.6325	4.8975	8.1625	0.0326 5	
Chanoclavina	-	3.0580	9.1725	15.287	0.0611 5 5	
Desconocido	-	1.3280	3.9840	6.6400	0.0265 6	
Pyroclavina	-	149.889	44.9670	74.945	0.0299 0 7	
DH-Ergosina	-	0.5000	0.1500	0.2500	0.0010	

Total de alcaloides	-	155.957	63171	105.28	0.4211
		5		5	4

§ Contenido de alcaloides de *C. gigantea* (mg g⁻¹).

¶ Concentración de alfalfa en la dieta experimental.

Durante las cuatro semanas posteriores al período de adaptación al consumo de alimento, la cantidad de alcaloides ingerida por los conejos fue variable y se cuantificó semanalmente con base al consumo de alimento (Figura 2.2), a partir de la segunda semana, debido a que la primera fue el período de adaptación. El incremento o disminución en la concentración de los compuestos alcaloides a través del tiempo estuvo directamente relacionado con la cantidad de dieta experimental ingerida.

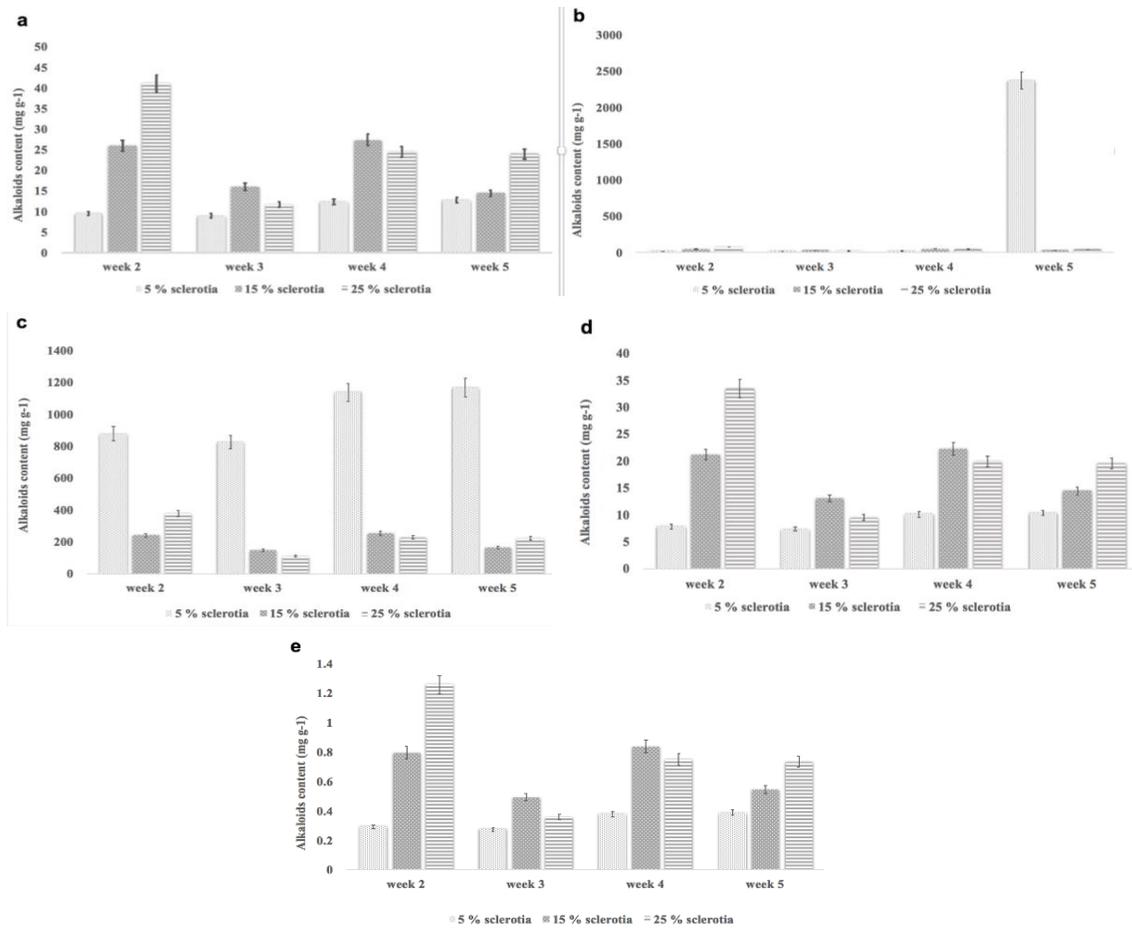


Figura 2. 2. Concentración de alcaloides ingeridos por conejos en un período de 4 semanas. **a.** DH-Elymoclavine **b.** Chanoclavine **c.** Pyroclavine **d.** Unknown alkaloid **e.** DH-Ergosine. Barra de error indica error estándar de la media.

2.5.4 Manejo de conejos

En el tratamiento testigo hubo un incremento en el peso (Figura 2. 3 A), que evidencio que el crecimiento no se afectó por la dieta experimental proporcionada, el consumo de alimento e indican que la conversión alimenticia en los conejos (Figura 2. 3 A, B y C) fue estable y creciente con el tiempo. Estos animales tuvieron un desarrollo normal y su crecimiento fue superior al resto.

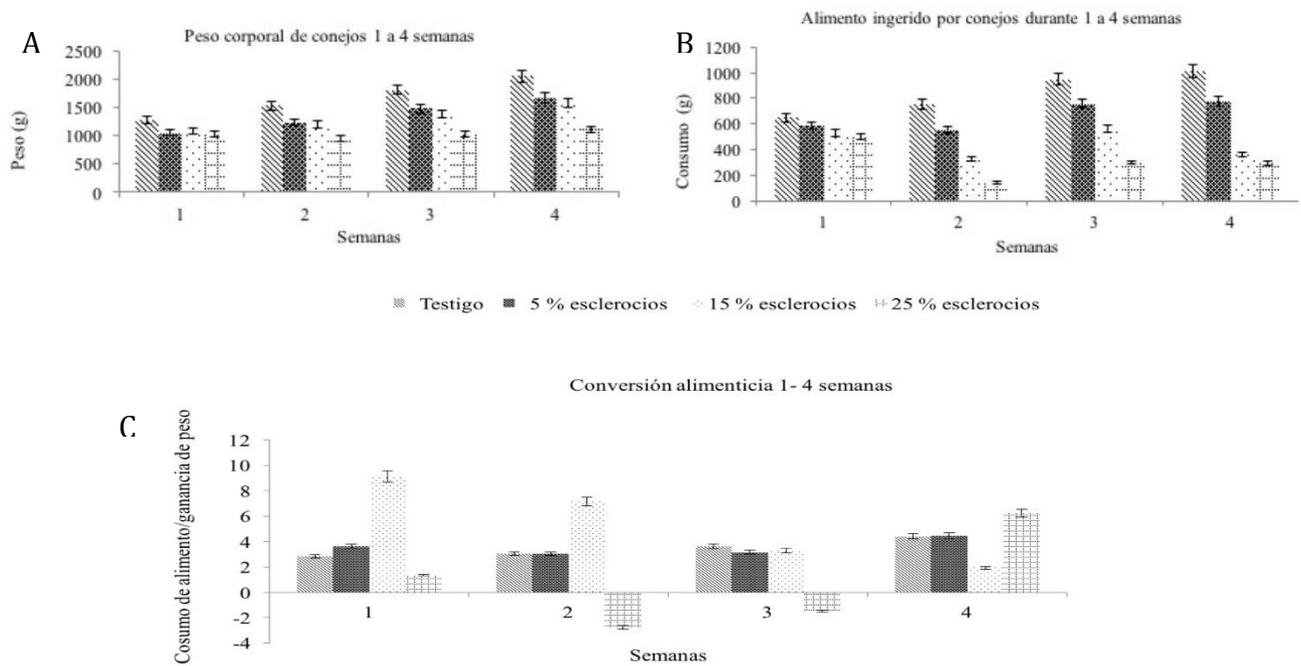


Figura 2. 3. Variables evaluadas por cuatro semanas en conejos de 1 a 4 semanas a alimentados con dietas experimentales que contienen dosis incrementadas de esclerocios de *C. gigantea*, colectado en el estado de México. **A:** ganancia de peso **B:** consumo alimenticio, **C:** conversión alimenticia. Diferencias significativas con DMS ($p > 0.05$).

Los conejos alimentados con 5 y 15 % de contenido de esclerocios, no presentaron efecto negativo ($p < 0.05$) en ganancia de peso, comparado con los demás tratamientos. Los animales que ingirieron dieta de 5 % de esclerocios consumieron más alimento, en comparación con los conejos del tratamiento con 15 % de esclerocios, pero la ganancia de peso fue similar. Durante la segunda y tercera semana la conversión alimenticia, fue variable para el tratamiento de 15 % de esclerocios, indicando que estos conejos toleraron un mayor consumo de esclerocios.

Con relación al consumo de alimento, los conejos del tratamiento testigo comparados con los que consumieron el tratamiento de 25 % de esclerocios, mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$).

En peso corporal, se registró una ganancia promedio < 50 g (Figura 3) en todos los conejos del tratamiento con 25 % de esclerocios, en lo que también se observó un rechazo al alimento.

2.5.5. Parámetros clínicos

Hemogramas. Los componentes de la sangre evaluados no indicaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ningunos de los cuatro tratamientos. Sin embargo, se observó la presencia de fibrinógeno (proteína elaborada por el hígado para detener sangrado) en los conejos de los tratamientos con 5 %, 15% y 25% de esclerocios.

Necropsia. Los conejos que consumieron dietas experimentales con algún porcentaje de esclerocios presentaron degeneración hidrópica, hepatocelular y nefritis interticial en riñón.

Los animales del tratamiento con 15% de esclerocios, manifestaron intestino grueso con enteritis necrótica, necrosis hepatocelular y degeneración tubular multifocal, acompañada de necrosis ligera multifocal en riñón. En conejos que consumieron el tratamiento con 25% de esclerocios, el 20 % de ellos presentaron la cavidad torácica con coágulos que ocuparon 25 % del espacio torácico. Los conejos que consumieron los tratamientos con 5 %, 15% y 25% de esclerocios, los hallazgos macroscópicos y microscópicos encontrados fueron similares, pero con mayor grado de severidad, a medida que hubo un incremento en la concentración de esclerocios en las dietas.

2.5.6 Salud animal y comportamiento

Durante el desarrollo del experimento, el comportamiento de los conejos del tratamiento testigo se utilizó como referencia para evaluar el comportamiento de los conejos con los tratamientos con esclerocios. Los conejos del tratamiento testigo se mostraron, alertas, activos con búsqueda de alimento y desarrollo del mecanismo de cecotrofia por las mañanas.

Los conejos del tratamiento 5 % y 15% de esclerocios, en su mayoría manifestaron enfermedades de vías respiratorias a pesar de recibir medicación preventiva para este fin, así como diarreas frecuentes que causó la muerte a 10 % de los conejos y a 10 % más que murieron por enfermedades en vías respiratorias. La eutanasia realizada al final de la semana 5 de seguimiento, el 20 % de los conejos mostró neumonía. En cuanto a la cecotrofia, de los conejos del tratamiento con 5 % fue matutina en contraste con los conejos que consumieron 15% y 25% de esclerocios, donde fue poco frecuente este comportamiento.

Los conejos del tratamiento con 15% de esclerocios, se observaron decaídos, dormidos en horario no habitual y con anorexia, después de consumir alimento se acercaban de inmediato al

bebedero de agua. El consumo de agua fue más frecuente en comparación con los conejos del tratamiento testigo. Algo similar ocurrió con los conejos del tratamiento con 25% de esclerocios, que después de conservar las pildoras bebían agua en abundancia.

2.6 DISCUSIÓN

2.6.1 Sitio de recolección de muestras

Las especies del género *Claviceps* producen ascosporas, como resultado de un evolucionado mecanismo para sobrevivir en diversos hábitats (White, 2003). Sin embargo, *C. gigantea* es un fitopatógeno con un nicho ecológico restringido a zonas geográficas con condiciones ambientales específicas, con bajas temperaturas y alta humedad relativa (Ullstrup, 1973), que concuerdan con las condiciones que prevalecen en los sitios de muestreo donde se encontró alta incidencia del patógeno, ya que tienen clima templado subhúmedo con lluvias en verano. La temperatura promedio es 12 ° C -14 ° C, con heladas de noviembre a enero y precipitación anual de 800 a 900 mm. (Loera *et al.* 2016).

2.6.2 Cuantificación de alcaloides por HPLC en dietas experimentales para conejo

Los esclerocios de *C. gigantea* producen una mezcla de alcaloides donde los componentes se encuentran en diferentes proporciones como, festuclavina 65 %, D-dihydrolysergol- (I) 15 %, chanoclavina 7 %, pyroclavina 3 % (Agurell, 1965). No obstante, en las muestras utilizadas de *C. gigantea* se encontraron proporciones diferentes, como Chanoclavina I que fue la más abundante, que es, el primer intermediario que se acumula en productores de alcaloides tipo ergot y, en algunos casos, en concentraciones relativamente altas. En el caso de *C. gigantea* y *C. africana*, este compuesto se oxida en Chanoclavina I aldehído, seguido de una reducción y como producto final festuclavina (dihidroergot) (Robinson y Panaccione 2015). Piroclavina es un estereoisomero de festuclavina que se considera un producto menor (Agurell, 1965). Sin embargo, en las dietas elaboradas, este alcaloide estuvo en mayor proporción. La formación de este compuesto pudo estar influenciada por el proceso de peletización, aunque las micotoxinas pertenecen a diferentes grupos de compuestos regularmente son termoestables y no volátiles (White *et al.*, 2003). Existen estudios que demuestran que los alcaloides producidos por especies del género *Claviceps* no solo sobreviven el proceso de formación de pastas para alimento, sino también el proceso de horneado (Shelby, 2006).

En la dieta experimental también se encontraron trazas del alcaloide DH- ergosina, compuesto que únicamente se había encontrado en aislamientos de *Claviceps purpurea* (Mai y Li, 2013).

Aun cuando Los principales alcaloides producidos en el género *Claviceps* son festuclavina y dihidrolisergomidas (Pažoutová, 2002), dos miembros de la familia Clavicipatecea (*C. africana* y *C. gigantea*) producen el alcaloide dihidroergot vía la rama de festuclavina, que sigue una vía lineal sin generar mucha diversidad. *C. gigantea* termina su ruta en dihidrolisergol, la primera oxidación producto de festuclavina, mientras *C. africana* completa la oxidación de festuclavina a partir de ácido dihidrolisergico e incorpora ácido dihidrolisergico exclusivamente dentro de dihidroergopeptina y dihidroergosina (Robinson y Panaccione, 2015).

2.6.3 Manejo de conejos

Las micotoxinas se caracterizan por su efecto tóxico que puede ser agudo en caso de ingerir una dosis alta, pero que a dosis bajas y prolongadas ocasiona una toxicidad crónica. Los esclerocios contienen metabolitos tóxicos que también pueden llegar a causar esa condición crónica, hasta ahora, se conocen más de 40 alcaloides diferentes en el género *Claviceps* (White *et al.*, 2003). La enfermedad provocada por el consumo de alcaloides es conocida como ergotismo (Kren y Ladiskav, 2006).

Los alcaloides del tipo clavinas como los producidos por *C. gigantea*, reducen el apetito de conejos al consumirlos (Canty *et al.*, 2014), lo que ocurre en consumo de altas cantidades, ya que en esta investigación la dieta con 5 % de esclerocios, que representó una dosis baja, el consumo de los esclerocios fue tolerado. Además de que los conejos alimentados tuvieron ganancia de peso, mientras que los conejos con la dosis más alta (25 % de esclerocios) hubo rechazo del alimento, lo que conlleva a una conversión alimenticia anormal. De manera similar, conejos alimentados con pasto infectado con *C. purpurea*, también especie productora de alcaloides, rechazaron el alimento, a diferencia de los que fueron alimentados con dieta sin alcaloides (Panaccione *et al.*, 2006).

2.6.4 Parámetros clínicos considerados por el consumo de *C. gigantea*

Para tener un diagnóstico más certero con respecto a una afección patológica, es importante considerar parámetros sanguíneos (Verde y Gómez, 1997). Sin embargo, los datos obtenidos del análisis químico de la sangre no indicaron diferencias marcadas, por lo que se deben buscar alternativas para detectar niveles de toxicidad en conejos.

Las observaciones macroscópicas de los órganos dañados fueron más eficientes, ya que fue posible observar daños en hígado y riñón ocasionados por el consumo de *C. gigantea*. Una situación similar ocurrió en conejos que tras una dieta con alcaloides producidos por *Claviceps purpurea* los individuos mostraron una degeneración hepatocelular (Korn *et al.*, 2014).

2.6.5 Salud animal y comportamiento

En el periodo de adaptación a la dieta experimental hubo 7.5 % de decesos de conejos que se consideran dentro del rango aceptable de mortandad en una engorda cotidiana (Palma y Hurtado 2010).

Los conejos que estuvieron bajo tratamiento con dosis creciente de alcaloides no desarrollaron de manera normal el mecanismo de cecotrofia. La cecotrofia es una particularidad del sistema digestivo de los conejos. Los cecotrofos contienen de 23 a 33 % de materia seca y 15 % de proteína, aminoácidos esenciales, reciclaje de vitaminas B y K, así como minerales (Orengo y Gidenne 2007).

Los conejos que consumieron la dieta experimental con los tratamientos 5% y 15% de esclerocios, presentaron problemas respiratorios. Un alto contenido de alcaloides tipo ergot inducen una supresión del sistema inmune, en diferentes experimentos se ha encontrado que al incorporar esclerocios en las dietas se desarrollan problemas intestinales, principalmente diarrea (Schumann *et al.*, 2007).

La conducta de ingerir abundante agua en los tratamientos 15% y 25% de esclerocios, es una respuesta a ingesta de alimento contaminado, que se presentó como síntoma de intoxicación (Panaccione *et al.*, 2006).

Perusia y Rodríguez (2001) mencionan que especies del género *Claviceps*, producen un síndrome de trastornos en locomoción y miclonías en bovinos, ovinos y equinos, además de que los animales presentan una sensibilidad al ruido, leves períodos diarreicos, salivación y lagrimeo. En bovinos se presenta falta de coordinación y envaramiento, seguido de períodos de depresión. En los conejos que consumieron alimento con esclerocios también se observaron períodos diarreicos, y en el caso de los conejos alimentados con la dieta de 15% de esclerocios, también se observó falta de coordinación.

2.7 CONCLUSIONES

En conejos recién destetados el consumo de alimento con esclerocios de *C. gigantea* provoca disminución de la ganancia de peso. El consumo de esclerocios molidos produce degeneración hepatocelular y tubular multifocal.

Dosis altas de esclerocios en las dietas alimenticias provoca intoxicación en el conejo y necrosis multifocal en riñón.

2.8 LITERATURA CITADA

- Agurell S., L. 1965. A new ergot alkaloid from mexican maize ergot. *Acta pharmaceutica Suecica* 2: 231-238. Doi: 10.1055/s-0028-1100254
- Adamo G., Constanza A. 2013. Rabbits; biology, diet and eating habits and disorders. Ed. Nova Sciene Publishers, Inc. New York USA. 136 p.
- A.O.A.C. 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 16th ed. Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C. USA. 1088 p.
- Canty M., J., U. Fogarty., M. Sheridan K., S. Ensley S., D. Schrunck E., and S. More J. 2014. Ergot alkaloids intoxication in perennial ryegrass (*Lolium perenne*): an emerging animal health concern in Ireland? *Irish Veterinary Journal* 67: 1- 7. Doi: 10.1186/2046-0481-67-21
- Cuca, G. M., G. E. Ávila y A. M. Pro. 2009. Alimentación de las aves. ED. Dpto. de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. México. 276 p.
- Easley J. F., J. T. McC all, G. K. Davis and R. L. Shirley. 1965. Analytical Methods for Feeds and tissues. Laboratory Nutrition. Department of Animal Science. University of Florida, EUA.
- Flieger M., Sedmera P., Havlíček V., Cvak L., Stuchlík J. 1993. 10- Hydroxi-cis- and 10 Hydroxy-Trans- Paspalic Acida mide: New Alkaloids from *Claviceps paspali*. *Journal of Natural Products*. 56 (6): 810-814. Doi: 10.1021/np50096a002
- Fučíkovský, Z.L., M.G. Cuca y E. Ávila. 1967. Notas preliminares sobre *Claviceps gigantea* y su efecto en pollos. MEMORIAS. V Congreso Nacional de Fitopatología. MEXICO.
- Fučíkovský, Z.L. y M.P. Moreno. 1968. Efecto de los esclerocios de *Claviceps gigantea* en conejos. Informe anual de labores y resultados de la sección de fitopatología. Campo Exp. "Sta. Elena".
- Korn A., K., M. Gross. E., E. Usleber N. T. Köhler K., G. Erhardt. 2014. Dietary ergot alkaloids as a possible cause of tail necrosis in rabbits. *Mycotoxin Research* 30: 241-250. DOI: 10.1007/s12550-014-0208-0
- Kren V, Ladiskav C. 2006. Ergot; The genus *Claviceps* Edited. Ed. Howart academic publishers The Netherlands 499 p.
<http://www.crcnetbase.com/doi/pdfplus/10.1201/9780203304198.fmatt>

- Loera Chaves, M., García- García F., Millan García S. 2016. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México: Estado de México Calimaya. Disponible en línea <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15018a.html>
- Mai P., and Li S M. 2013. Alkaloids derived from tryptophan a focus on ergot alkaloids. In K.G. Ramawat, J.M. Mérillon eds Natural Products; Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids phenolics and terpenes. Doi. 10.1007/978-3-642-22144-6_24
- Márquez A., V., y E., Ávila. 1973. Toxicidad del hongo del maíz *Claviceps gigantea* en pollos en crecimiento. Técnica Pecuaria 1:69-71.
- Moreno- Manzano, C., De León- García de Alba, C., Nava- Diaz, C., Sanchez-Pale, R., 2016. Germinación de esclerocios y formación de ascosporas de *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez. Mexican Journal of Phytopathology 34: 223-241 Doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1603-2.
- Muthusubramanian, V., Bandyopadhyay, R., Rajaram, R.D., Tooley, P. W. 2006. Cultural characteristics, morphology, and variation within *Claviceps africana* and *C. sorghi* from India. Micological Research 110: 452-464. DOI. 10.1016/j.mycres.2005.12.005
- Naudè TW, Botha CJ, Vorster JH, *et al.* (2005) *Claviceps cyperi*, a new cause of severe ergotism in dairy cattle consuming maize silage and teff hay contaminated with ergotised *Cyperus esculentus* (nut sedge) on the Highveld of South Africa. Onderstepoort J Vet Res 72:23–37. Doi: 10.4102/ojvr.v72i1.221
- Nieves D., O. Teran., M. Vivas., G. Arciniegas., C., Gonzalez. y Ly. J. 2009. Comportamiento productivo de Conejos alimentados con dieta basadas en follajes tropicales. Revista Científica FCV-LUZ 19: 173-180.
- Palma O., R., y E. Hurtado A. 2010. Comportamiento productivo de Conejos durante el periodo de crecimiento-engorde alimentados con frutos de mango (*Manguifera inidica*) en sustituto parcial del alimento balanceado comercial. IDESIA 28: 33-37.
- Orengo J., T. Gidenne. 2007. Feeding behavior and caecotrophy in the Young rabbit before weaning: An approach by analysing the digestive contents. Applied Animal Behavior Science 102: 106-118.
- Panaccione D., G., J. Cipoletti R., A. Sedlock B., K. Blemings P., C. Schardl L., C. Machado., G. Seidel E. 2006. Effects of Ergot Alkaloids on food preference and satiety in rabbits, as assessed with gene-knockout endophytes in perennial ryegrass (*Lolium perenne*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 54:4582-4587.

- Pažoutová, S. 2002. The evolutionary strategy of *Claviceps*. In: White J. F., Bacon C. W., Hywel-Jones N. L., Spatafora J. W., (eds.) *Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol, and Cultural Impacts*. NY, USA: Marcel Drekker 329-354.
- Perusia R., O. y R. Rodríguez A. 2001. Micotoxicosis. *Revista de Investigación Veterinaria Perú* 12: 87-116.
- Robinson S.L., y D. G. Panaccione. 2105. Diversification of ergot alkaloids in natural and modified fungi. *Toxin* 7: 201-218; doi:10.3390/toxins7010201
- SAS Institute. 2003. *Statistical Analysis System Institute. The SAS system for Window release 8.0 USA*. pp. 558.
- Sauvant D, Perez J-M, Tran G, Ponter A. 2004. *Tables of composition and nutritional value of feed materials*. 2ed. Wageningen Academic Publishers. The Netherlands. 304 p.
- Schumann B, Dänicke S, Hübner S, et al (2007) Effects of different levels of ergot in concentrate on the health and performance of male calves. In: *Mycotoxin Research*. pp 43–55.
- Shelby R, 2006. Toxicology of ergot alkaloids in agriculture. In Kren V, Ladiskav C. 2006. *Ergot; The genus Claviceps* Edited. Ed. Howart academic publishers The Netherlands 499 p. <http://www.crcnetbase.com/doi/pdfplus/10.1201/9780203304198.fmatt>
- Ullstrup A.J. 1973. Maize ergot: a disease with a restricted ecological niche. *PANS*. 19(3): 389-390.
- Verde M., T. y J. Gómez. 1997. Parámetros sanguíneos de interés clínico normales. *Informe Técnico. Boletín de Cunicultura* 38: 38-45.
- Wallwey C., Li Shu-Ming 2012. Production, detection and purification of clavine-type ergot alkaloids. *Capitol* 8. In Nancy P. Keller and Geoffrey (eds.), *fungal Secondary Metabolism: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 944.
- White, J. F., Bacon, C. W., Hywel-Jones, N. L. and J. W. Spatafora. 2003. *Clavicipitalean fungus evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts*. *Mycology*. 19 326-327.
- Yui T, y Y. Takeo. 1958. *Japan Journal Pharmaceutical*. 7, 157-161.

CONCLUSIONES GENERALES

El hongo *C. gigantea* incremento su incidencia al encontrarse en zonas donde no estaba reportado.

La morfometría de los hongos aislados de todos los sitios de coleta corresponde con *Sphacelia. sp.* (Teleomorfo *C. gigantea*).

El hongo *C. gigantea* produce alcaloides del tipo dihidroergosina.

Los alcaloides analizados en los esclerocios difirieron en tiempo y espacio.

El consumo de esclerocios molidos produce daños en algunos órganos de conejos.