

Identificación del Cornezuelo (*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.) del Trigo (*Triticum aestivum* L.) en el Municipio de Nanacamilpa, Tlaxcala, México.

Identification of the Ergot (Claviceps purpurea (Fr.) Tul.) of Wheat (Triticum aestivum L.) in Nanacamilpa, Tlaxcala, Mexico.

Santos Gerardo Leyva-Mir, Aurelio Hernández-Bautista, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Carr. México-Texcoco, Km. 38.5, Chapingo, Edo. de México, CP 56230, **Luis Antonio Mariscal-Amaro, Héctor Eduardo Villaseñor-Mir y Julio Huerta-Espino**, INIFAP, Campo Experimental Valle de México, Km. 18.5 Carr. Los Reyes-Lechería, Chapingo, Edo. de México, CP 56230. Correspondencia: lsantos@correo.chapingo.mx

(Recibido: Diciembre 18, 2009 Aceptado: Mayo 06, 2010)

Leyva-Mir, S.G., Hernández-Bautista, A., Mariscal-Amaro, L.A., Villaseñor-Mir, H.E. y Huerta-Espino, J. 2010. Identificación del Cornezuelo (*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.) del trigo (*Triticum aestivum* L.) en el municipio de Nanacamilpa, Tlaxcala, México. Revista Mexicana de Fitopatología 28: 64-66.

Leyva-Mir, S.G., Hernández-Bautista, A., Mariscal-Amaro, L.A., Villaseñor-Mir, H.E. y Huerta-Espino, J. 2010. Identification of the Ergot (*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.) of Wheat (*Triticum aestivum* L.) in Nanacamilpa, Tlaxcala, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 28: 64-66.

Resumen. *C. purpurea* es el hongo causante de la enfermedad llamada cornezuelo del trigo y afecta el rendimiento hasta en 40 %. En la región de Nanacamilpa, Tlaxcala, se sospecha la presencia de *C. purpurea*; además de que por el tamaño de los esclerocios encontrados se cree que podría ser *Claviceps gigantea*. Algunos autores argumentan que para un diagnóstico temprano y que diferencie a los dos patógenos, el tamaño del esclerocio a temprana edad es una característica distintiva. Mediante la extracción de DNA de esclerocios y la amplificación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) se pudo comprobar que el tamaño no es una característica distintiva para la separación de estos dos patógenos, además se observó que *C. purpurea* en la región de estudio puede alcanzar un tamaño temprano de esclerocio mayor al promedio que se menciona en la literatura. Finalmente se corroboró la presencia de *C. purpurea* en el municipio de Nanacamilpa, Tlaxcala.

Abstract. *C. purpurea* is the fungus causing the disease called "ergot of wheat" and can affect the yield until 40 %. In the region of Nanacamilpa, Tlaxcala, suspects the presence of *C. purpurea*; in addition, by the sclerotia size its believes that could be *C. gigantea*. Some authors argue that for an early diagnosis and differentiation of these two pathogens, the sclerotia size at an early age is a distinctive feature. By extraction of DNA and amplification of the ITS region (Internal Transcribed Spacer), was proved that size is not a distinctive feature for the separation of these two pathogens, besides was observed that the fungus in the region may reach a greater early sclerotia size than average mentioned in the literature. Finally it was confirmed the presence of *C. purpurea* in the town of Nanacamilpa, Tlaxcala.

Additional key words: *Claviceps purpurea*, sclerotia, ITS.

Palabras clave adicionales: *Claviceps purpurea*, esclerocio, ITS.

Los Valles Altos de México (Tlaxcala, Hidalgo, Puebla y Edo. de México) se consideran la región más importante del país en cuanto a la producción de trigo de temporal donde se siembran cerca de 130 mil ha (Rodríguez, 2008).

The highlands of Mexico (Tlaxcala, Hidalgo, Puebla and the State of Mexico) are considered the most important region nationwide in terms of rain fed wheat plant production, where about 130 thousand ha are sown (Rodríguez, 2008). Ergot can affect wheat by up to 40% even in tolerant varieties, infecting sclerotia ovaries producing floral structures to replace the seeds, thus (Zillinsky, 1984). Producers in the Nanacamilpa

El cornezuelo del trigo puede afectar el rendimiento hasta en 40 % aún en variedades tolerantes, infestando los ovarios de las estructuras florales produciéndose esclerocios que reemplazan las semillas (Zillinsky, 1984). En la región de Nanacamilpa, los productores desconocen si los esclerocios que han observado en las espigas pertenecen a *C. purpurea* o si por su tamaño grande pertenecen a *C. gigantea*. Por otro lado, algunos autores mencionan que el tamaño del esclerocio es suficiente para separar a estos dos patógenos; sin embargo, la identificación morfológica puede no ser tan confiable debido a que algunas características morfológicas pueden traslaparse con la de otras especies por lo que otros métodos son necesarios para la exacta y pronta identificación del patógeno, y uno de ellos es mediante el uso de técnicas moleculares y secuenciación de DNA del esclerocio y la amplificación de la región ITS que permitirían acelerar el proceso de identificación. Ante esta problemática respecto al patógeno en la región de estudio y la importancia que está tomando en el sector triguero, se plantearon los objetivos de corroborar la presencia de *C. purpurea* y *C. gigantea* en Nanacamilpa, Tlaxcala; y comprobar si el tamaño del esclerocio es una característica distintiva para separar morfológicamente a los dos patógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la región de Nanacamilpa, Tlaxcala, en un muestreo al azar en plantas de trigo de la variedad Temporalera M87 se colectaron en bolsas de papel esclerocios probablemente de *C. purpurea* (SC1) o *C. gigantea* (SC2). De manera empírica las personas que diagnostican en la región separan a *C. purpurea* y *C. gigantea* de acuerdo al tamaño por lo que esclerocios >2 cm se clasificaron como *C. gigantea* (SC1), y 2 cm como *C. purpurea* (SC2).

Aislamiento de DNA. Fueron dos aislamientos: a) DNA de 20 g de micelio liofilizado de un cultivo puro en PDA proveniente de un esclerocio desinfectado; y b) DNA de 20 mg de esclerocio desinfectado y pulverizado (tratado con nitrógeno líquido). Estos dos procedimientos se hicieron tanto para esclerocios SC1 y SC2 usándose el Kit DNeasy Plant (QIAGEN), mediante el Mini protocolo para purificación del DNA total para tejido vegetal. El procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones dadas por el fabricante (DPH, 2006).

PCR y purificación. Mediante electroforesis (gel de agarosa 1 %) se observó la calidad e integridad del DNA realizándose así la PCR utilizando primeramente la muestra SC1. La región genómica conteniendo los fragmentos de ITS1, 5.8 rDNA y ITS2 fue amplificada usando los primers ITS5, ITS4, ITS1F, ITS1 (White *et al.* 1990), con las combinaciones ITS5-ITS4, ITS1F-ITS4 y ITS1-ITS4. Se realizaron cuatro repeticiones de cada muestra de DNA. Una vez optimizado el protocolo con SC1, se realizó la PCR con estas condiciones usando SC2. Se hizo la purificación de la PCR para SC1 y SC2 sólo con el DNA del esclerocio y los primers ITS4 (reverse) y ITS1F (forward), mediante el kit "AccuPrep PCR Purification Kit" de BIONEER.

Secuenciación y análisis. Los productos purificados de esclerocio SC1 y SC2 se secuenciaron en el Colegio de

region are not aware if the sclerotia currently observed in plant stems belong to *C. purpurea* or if it is because of their size that they belong to *C. gigantea*. It has been reported by some authors, on the other hand, that the size of sclerotium is sufficient to have these two pathogens separated; however, a morphological identification may not be as reliable, since some morphological characteristics may overlap themselves with other species. Therefore, other methods are required for accurate and early pathogen identification, being the use of molecular techniques for DNA sequencing and sclerotium amplification of the ITS region one of the methods that would accelerate the identification process. Facing such problems with regards to the pathogen in the study site and the growing relevance in the wheat producing sector, the objectives have been set to have the presence of *C. purpurea* and *C. gigantea* confirmed in Nanacamilpa, Tlaxcala, as well as having the sclerotium size revealed as a distinctive feature to separate the two pathogens in a morphological context.

MATERIALS AND METHODS

A wheat plant random sampling of the Temporalera M87 variety was performed in the Nanacamilpa region, having probable *C. purpurea* (SC1) or *C. gigantea* (SC2) sclerotia collected in paper bags. The people who perform an empirical diagnosis in the region have *C. purpurea* and *C. gigantea* separated in accordance to size being >2 cm sclerotia classified as *C. gigantea* (SC1), and 2 cm as *C. purpurea* (SC2).

Isolation of DNA. Two isolates were performed: a) DNA of 20 g of lyophilized mycelium in a pure culture from a PDA disinfested sclerotia; b) 20 mg DNA disinfested sclerotia and sprayed (treated with liquid nitrogen). These two procedures were performed for both SC1 and SC2 sclerotia, having the Kit DNeasy Plant (QIAGEN) used throughout the Mini protocol for plant tissue total DNA purification. The procedure was performed in accordance with the instructions given by the manufacturer (DPH, 2006).

Purification and PCR. The DNA quality and integrity and PCR carried out using the first SC1 sample was revealed by electrophoresis (1 % agarose gel). The genomic region containing the ITS1, 5.8 rDNA and ITS2 fragments was amplified using the ITS5, ITS4, ITS1F, ITS1 primers (White *et al.* 1990), with the ITS5-ITS4, ITS1F-ITS4 and ITS1-ITS4 combinations. There were four replicates of each DNA sample. Once the protocol had been optimized with SC1, a PCR was performed with these conditions using SC2. The PCR purification was performed for SC1 and SC2 only with the sclerotia DNA and the ITS4 (reverse) and ITS1F (forward) primers by using the BIONEER AccuPrep PCR Purification Kit.

Sequencing and analysis. The sclerotia SC1 and SC2 purified products were sequenced at the College of Biological Sciences, University of California (Davis, Ca.). The sequences were analyzed with the BioEdit program; the Cap contig was used to obtain the consensus sequence. Finally, the

Ciencias Biológicas de la Universidad de California (Davis, CA). Las secuencias se analizaron con el programa BioEdit, se usó la opción Cap contig para obtener la secuencia consenso. Finalmente se compararon las secuencias de ITS1, 5.8 rDNA y ITS2 con las secuencias depositadas en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) por medio del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para saber si SC1 y SC2 pertenecían a la misma o a diferente especie, y para asegurar ese resultado también se usó el programa ClustalW2 para seleccionar una en base al número de nucleótidos, homología y referencia de la secuencia. Además, ambas secuencias se compararon con otras 19 secuencias de especies diferentes de *Claviceps* spp., más un control (*C.purpurea*_AB371642). El análisis se realizó por medio de un árbol filogenético, tomándose las secuencias de ITS disponibles de la misma especie de la base de datos de GenBank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de DNA extraído, integro y de alta calidad, fue 5 ng/μl para micelio y 73 ng/μl para esclerocio. Solo se observó una buena amplificación ITS en la PCR de DNA de esclerocio con bandas gruesas y brillantes. Para DNA de micelio no hubo amplificación, posiblemente por degradación del DNA. Los aislamientos SC1 y SC2 mostraron bandas gruesas de DNA arrojando productos aproximados de 600 pares de bases (pb), para cada aislamiento. La secuencia de SC1 con 599pb tuvo una alta homología a las contenidas dentro del GenBank. Los resultados del BLAST del NCBI arrojaron una identidad del 99% con *C. purpurea* AB160991.1 y *C. purpurea* AB162147.1. Para SC2 el BLAST arrojó un 99% de homología con las secuencias AJ309368.1 y 97% de homología para de *C. purpurea*. El análisis de homología en ClustalW2 arrojó un 98% de semejanza entre las secuencias de SC1 y SC2, por lo que para la identificación molecular de *Claviceps* spp., sólo es necesario la amplificación de la ITS. Se concluye que los esclerocios, SC1 y SC2, molecularmente son de *C. purpurea*. Se desecha la idea de que el tamaño de esclerocio puede ser una característica distintiva de diagnóstico de campo para separar a *C. gigantea* de *C. purpurea*, ya que *C. purpurea* puede desarrollar esclerocios grandes en la región de Nanacamilpa, Tlaxcala, posiblemente por las condiciones ambientales en las cuales se desarrolla el cultivo. Así mismo, se corrobora la presencia de *C. purpurea* en esta región.

LITERATURA CITADA

- DNeasy Plant Handbook (DHP). 2006. QIAGEN. www1.qiagen.com/HB/DNeasy96Plant.01/01/2009.
- Rodríguez-Contreras, E., Villaseñor-Mir H. E., Leyva-Mir S. G., Huerta-Espino J., Sandoval-Islas S y Santos-Posadas H. M. 2008. Efecto de *Septoria tritici* en el rendimiento de trigo de temporal en ambientes lluviosos de los Valles Altos Centrales de México. *Agrociencia* 42:435-442.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp 315-322. *In*: PCR

ITS1, 5.8 rDNA and ITS2 sequences were compared with the sequences previously deposited at the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) by means of Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), looking forward to see if SC1 and SC2 belong to the same or different species, as well as to ensure that such result also required the ClustalW2 program in order to select one, based on the nucleotide homology number and reference sequence. Moreover, both sequences were compared to other 19 different species sequences of *Claviceps* spp., plus a control (*C.purpurea*_AB371642). The analysis was performed by means of a phylogenetic tree, taking the available ITS sequences of the same species from the GenBank.

RESULTS AND DISCUSSION

The extracted integrated and high quality DNA concentration was 5 ng/μl for mycelium and 73 ng/μl for sclerotium. There was only a good ITS amplification in the PCR of the sclerotia DNA with thick and bright bands. There was no amplification for mycelium DNA, probably because of DNA degradation. Thick DNA products bands were revealed by the SC1 and SC2 isolations, yielding 600 base pairs (bp) approximate products for each isolate. A high homology to those contained in the GenBank was revealed by the SC1 sequence with 599 bp. A 99 % identity with *C. purpurea* AB160991.1 and *C. purpurea* AB162147.1 was revealed by the NCBI BLAST results. A 99 % homology with the AJ309368.1 sequence was revealed by the BLAST for SC2, and a 97 % homology for AB162147.1 and AB160991.1 for *C. purpurea*. A 98 % similarity between the SC1 and SC2 sequences was revealed by the ClustalW2 homology analysis; consequently, for *Claviceps* spp. molecular identification only ITS amplification is required. Thus it is concluded that SC1 and SC2 sclerotia, in a molecular context, are *C. purpurea*. The idea that the sclerotia size can be a distinctive characteristic on the field to have *C. gigantea* separated from *C. purpurea*, due to the fact that *C. purpurea* may have bigger sclerotia developed in the region of Nanacamilpa, Tlaxcala, Mexico, probable because of the environmental conditions in which the crop develops itself. Likewise, the *C. purpurea* presence is confirmed in this region.

-
- protocols: A Guide to Methods and Applications (ed. M.A Innis, D.H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), Academic Press: San Diego, CA, USA. 520 p.
- Zillinsky, F. J. 1984. Enfermedades comunes de los cereales de grano pequeño: una guía para su identificación. CIMMYT, el Batán, México. 141 p.