

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

Identificación y análisis de diversidad de aislados de

Claviceps paspali en Uruguay

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología

Lucía Castro Priore - 219879

Tutores: Héctor Oberti y Marco Dalla Rizza

2021

Declaración de autoría

Yo, Lucía Castro Priore, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano.

Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Trabajo Final de Carrera;
- Cuando he consultado el trabajo de otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado la obra de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente que fue contribuido por otros y que fue contribuido por mi;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Lucía Castro Priore

Montevideo, 14 de octubre de 2021.

Agradecimientos

Antes de comenzar este trabajo, quisiera agradecer a todas las personas e instituciones que de una u otra forma hicieron que fuese posible.

Principalmente a la Unidad de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) - Las Brujas, que me brindó las instalaciones para realizar el proyecto. Dentro del mismo, un especial agradecimiento a mis tutores Ing. Agr. Marco Dalla Rizza y MSc. Héctor Oberti, que me brindaron su confianza, me aconsejaron, y me guiaron en el camino, compartiendo su experiencia y permitiéndome generar la mía propia. A Sara Murchio y Claudia Schvartzman que me acompañaron día a día, por los consejos y el apoyo constante, y Wanda Iriarte y Rafael Reyno, por compartir sus conocimientos y colaborar conmigo durante distintas instancias.

Al proyecto INIA BT_19 'Estrategias moleculares para implementar la resistencia al hongo *Claviceps paspali* en *Paspalum dilatatum* cultivar Estanzuela Chirú' por el financiamiento del proyecto.

Y sobre todo a mi familia y amigos, por el apoyo incondicional.

Resumen

Claviceps paspali es un hongo biótrofo, que infecta únicamente a especies del género *Paspalum*, algunas de las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en nuestros campos naturales y son base de la dieta de la ganadería en Uruguay. Esta enfermedad presenta múltiples problemáticas para el sector agrícola, entre ellas amplia disminución de producción de semillas y potentes reacciones neurotrópicas en ganado que consume pasturas infectadas. No existe hasta el momento un mecanismo eficiente de control del hongo, ni herramientas de diagnóstico de la infección previo a su detección visual. Comprendido en el proyecto de mejora en *Paspalum*, buscando mejorar la respuesta a *C. paspali*, es relevante contar con una colecta de aislados locales, determinar la estructura genética del hongo y las relaciones filogenéticas entre linajes. Por este motivo, se obtuvieron 40 aislados provenientes de 5 especies de *Paspalum* con signos de la infección obtenidas de distintos puntos del país. Se realizó un análisis filogenético basado en 4 genes de identificación (*TUB2*, *TEF-1 α* , *LSU* y *RPB2*) con el fin de detectar alguna subespecie dentro del género, y se intentó la puesta a punto de un análisis basado en microsatélites multialélicos, para intentar lograr una diferenciación intraespecie. Se realizó una descripción fenotípica *in vitro* en tres medios de cultivo, analizando tasa de crecimiento, características morfológicas y esporulación. El estudio de genes de identificación mostró evidencias de subespeciación entre los aislados de *Paspalum*, particularmente de las muestras tomadas de *P. plicatulum*, y 3 aislados de *P. notatum*. El análisis de microsatélites no mostró los resultados esperados, siendo muy inespecífico. En cuanto a la descripción morfológica, se observó diferencias sustanciales entre aislados en los diferentes medios de cultivo, entre ellas tasa de crecimiento, tipo y color de colonia, y variación de color en el medio. La variación de tasa de crecimiento en diferentes medios de cultivo no fue significativa ($P > 0,01$), pero si la variación entre aislados en un mismo medio ($P < 0,01$). Se logró

observar la esporulación *in vitro* de 12 aislados de *C. paspali* obtenidos de 4 especies de *Paspalum* (*P. dilatatum*, *P. plicatulum*, *P. urvillei*, *P. malacophyllum*). De esta forma se logró contribuir a la descripción molecular y fenotípica de *C. paspali*, aportando al conocimiento público de la especie. Además, se contribuyó con la descripción fenológica y filogenética de una colección de 40 aislamientos que fue conservada en el banco de germoplasma de INIA Las Brujas.

Palabras clave

Paspalum; filogenia; morfología; microsátélites.

Abreviaturas

°C: grados Celsius

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados)

ARN: Ácido ribonucleico

AS: *Agar Sabouraud*

cm: centímetros

dNTPs: deoxiribonucleotidos trifosfato

JC: Jukes-Cantor

K2: Kimura 2 parámetros

K2 + G: Kimura 2 parámetros con distribución *gamma*

K2+I+G: Kimura 2 parámetros con sitios invariables y distribución *gamma*

LSU: ADN ribosomal

M2: *Melanocyte Growth Medium*

min: minutos

ML: *Maximum Likelihood* (máxima verosimilitud)

ml: mililitros

mm: milímetros

mM: milimolar

MP: *Maximum Parsimony* (máxima parsimonia)

ng: nanogramos

nm: nanómetros

p/v: relación peso volumen

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de polimerasa)

PDA: *Potato Dextrose Agar*

PDB: *Potato Dextrose Broth*

pmol: picomoles

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA* (ADN polimórfico amplificado aleatoriamente)

RAS: proteína tipo RAS

RPB2: subunidad II de ARN polimerasa

Rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

SRAP: *Sequence-related Amplified Polymorphism*

SSRs: *Short Sequence Repeats* (microsatélites o repeticiones de secuencia corta)

TEF-1 α o TEF1: factor de elongación 1- α

TUB2: β -tubulina

U: unidades

μ l: microlitros

μ m: micrómetros

Índice

1.	Introducción	13
1.1.	<i>Claviceps paspali</i>	13
1.2.	Características morfológicas.....	16
1.3.	Problemática: <i>Paspalum</i> y <i>Claviceps paspali</i> en Uruguay	19
1.4.	Producción de semillas	19
1.5.	Micotoxinas.....	21
1.6.	Técnicas moleculares utilizadas en el estudio de <i>Claviceps</i>	22
1.7.	Genes de identificación.....	22
1.8.	Estudio de microsatélites	23
2.	Objetivos	25
2.1.	Objetivos generales.....	25
2.2.	Objetivos específicos	25
3.	Materiales y métodos	26
3.1.	Recolección de muestras.....	26
3.2.	Aislamiento de micelio a partir de muestras recolectadas	26
3.3.	Extracción de ADN.....	27
3.4.	Caracterización molecular de los aislados	27
3.5.	Análisis filogenéticos.....	29

3.6.	Amplificación de microsatélites	29
3.7.	Estudio fenotípico	31
4.	Resultados y discusión.....	33
4.1.	Aislamiento <i>in vitro</i>	33
4.2.	Identificación molecular de aislados.....	36
4.2.1.	Diversidad de <i>Claviceps paspali</i> en base a <i>TUB2</i> , <i>TEF1</i> , <i>RPB2</i> y <i>LSU</i>	38
4.2.2.	Estudio de microsatélites	45
4.3.	Estudio fenotípico <i>in vitro</i> de aislados de <i>Claviceps paspali</i>	50
4.3.1.	Crecimiento diametral de micelio.....	50
4.3.2.	Esporulación <i>in vitro</i>	57
4.3.3.	Morfología	62
5.	Conclusiones.....	67
6.	Referencias bibliográficas.....	69
7.	Anexos	75
	Anexo 1: Resultado de búsqueda de BLASTn en base de datos de NCBI para el gen <i>RPB2</i> del aislado U90.....	75
	Anexo 2: Secuencias del gen <i>LSU</i> de distintas especies de <i>Claviceps</i> para análisis topológico de aislados realizados en el estudio.....	76
	Anexo 3: Secuencias utilizadas para alineamiento de genes de identificación.....	77

Anexo 4: Árboles filogenéticos con mayor parsimonia de aislados de <i>Claviceps paspali</i> , para los genes <i>TEF1</i> , <i>TUB2</i> , <i>RPB2</i> y <i>LSU</i>	79
Anexo 5: Árboles filogenéticos de máxima parsimonia y máxima verosimilitud de aislados de <i>Claviceps paspali</i> a partir de genes <i>TEF1</i> , <i>TUB2</i> , <i>RPB2</i> , y <i>LSU</i> concatenados	83
Anexo 6: Medidas diametrales de aislados de <i>Claviceps paspali</i> en medios de cultivo PDA, MC y T2, tomadas al día 0 y 7 de incubación.....	85
Anexo 7: Cálculo de crecimiento y tasa de crecimiento diaria de aislados de <i>Claviceps paspali</i>	89
Anexo 8: Análisis de similitud <i>two-way</i> ANOVA para crecimiento de aislados de <i>Claviceps paspali</i> en medios PDA, MC y T2.....	97
Anexo 9: Esporulación <i>in vitro</i> en medio PDA de aislados de <i>Claviceps paspali</i>	98
Anexo 10: Códigos de pigmentación de micelio de aislados de <i>Claviceps paspali</i> según tabla de Munsell ³⁶	100
Anexo 11: Características morfológicas de aislados de <i>Claviceps paspali</i>	104

1. Introducción

1.1. *Claviceps paspali*

El género *Claviceps* (*Hypocreales: Clavicipitaceae*), perteneciente a la división *Ascomycota* del reino *Fungi*, está compuesto por aproximadamente 60 especies que afectan más de 600 monocotiledóneas, incluyendo plantaciones de importancia económica como centeno, trigo, cebada, arroz y maíz ^{1,2}. Este género se conoce desde hace siglos por ser económicamente importante para la farmacología y la investigación agrícola. Se comenzó a analizar la historia evolutiva del género, con orígenes en América del Sur, y su clasificación a través de características ecológicas, morfológicas y metabólicas en cuatro secciones (*Citrinae*, *Paspalorum*, *Pusillae* y *Claviceps*), dentro de las que *Claviceps* se considera evolutivamente el más exitoso y adaptable ³. En este género la gran mayoría de las especies afectan un rango limitado de huéspedes, con la excepción de *Claviceps purpurea* (*Claviceps*) que es la responsable de la infección de hasta 400 especies diferentes ¹. Recientemente fue propuesto que esta diferencia en cantidad de huéspedes podría deberse a la disposición genómica que presenta el grupo *Claviceps*, que difiere con aquel de *Pusillae* y *Paspalorum*, que le provee una ventaja adaptativa. Sin embargo, la falta de información genómica del género limita el entendimiento de los mecanismos por los cuales esta especie en particular se ha adaptado a tal amplio rango de hospederos en comparación con las otras secciones ³.

La ecología del género varía desde parasitismo general u órgano específico a mutualismo, incluso en algunos casos considerándose mutualismo defensivo condicional, ya que previene herbivoría ^{2,3}. *Claviceps* es reconocido por afectar principalmente ovarios no fertilizados y desarrollar en el

lugar de la semilla esclerotos cuyo color y morfología puede variar según la especie ⁴. Esta estructura le permite a *Claviceps* sobrevivir la época del año donde no se encuentran huéspedes disponibles para infección ⁴.



Figura 1: *Paspalum plicatum* infectado con *Claviceps paspali*. Imagen tomada en INIA - Treinta y tres, Departamento de Treinta y Tres, Uruguay.

Claviceps paspali, perteneciente a la sección *Paspalorum* del género, fue descrita por Stevens *et al.* en 1910, y nombrada ‘*paspali*’ por infectar específicamente gramíneas del género *Paspalum* ^{3,5}. En 2020, Oberti *et al.* (2020) logró confirmar que la infección por *ergot* en dos gramíneas del género *Paspalum* con presencia en el territorio uruguayo (*P. dilatatum* y *P. plicatum*) era causada por distintos linajes dentro de la especie *C. paspali*.

El ciclo de vida de *C. paspali* se compone de una fase asexual, encargada de difundir masivamente la infección, y una sexual, que perpetúa el hongo durante su época no infectiva (Figura 2). La primera de estas fases comienza a partir de la infección mediada por ascosporas en los órganos femeninos de la flor de la gramínea, que rápidamente emite hifas y genera la necrosis del embrión. Pasados 4 o 5 días se comienza a observar el primer signo de la enfermedad; una secreción densa, color ámbar, llamada “mielecilla” (*honeydew*) que se acumula sobre la espiga. En esta secreción es donde a partir de los 10 días de infección se pueden encontrar conidios, y dada la textura pegajosa de la misma, se convierte en principal transmisor de la infección mediada por insectos^{5,6}.

Sobre el día 20, la secreción comienza a mostrar grumos blancos en su superficie, y comienza la finalización del primer ciclo con la eventual formación del escleroto entre los días 25-30; éste ocupa en la espiga el lugar correspondiente a la semilla. Aunque el concepto general es que con la formación del escleroto finaliza la fase asexual, se ha comprobado que en *C. paspali*, en condiciones de alta humedad el escleroto logra producir mielecilla en su superficie, o incluso generar hifas (Figura 2, 15), y retomar el ciclo asexual (Figura 2, 14). De no ser así, el escleroto eventualmente cae al suelo, donde comienza la siguiente etapa⁵.

En la fase sexual, luego de transcurrido el invierno, cuando las temperaturas superan los 25 °C, el escleroto inicia su fructificación. Usualmente forma dos mamelones estomáticos (Figura 2, 7), cuya cabeza estomática corresponde al ascocarpo del hongo, que presenta estructura de peritecio. Como tal, muestra una pequeña cavidad donde, rodeados de tejido estomático, se encuentran un ascogonio y uno o más antéridos multinucleados. A partir de la recombinación de estos, se producen los ascos, conteniendo 8 ascosporas cada uno. Estas esporas se liberan de forma activa,

y logran germinar en las posteriores 36-48 horas, reanudando el ciclo. La infección por *C. paspali* es observable en otoño, luego de terminada la temporada estival, principalmente si este fue húmedo

5.

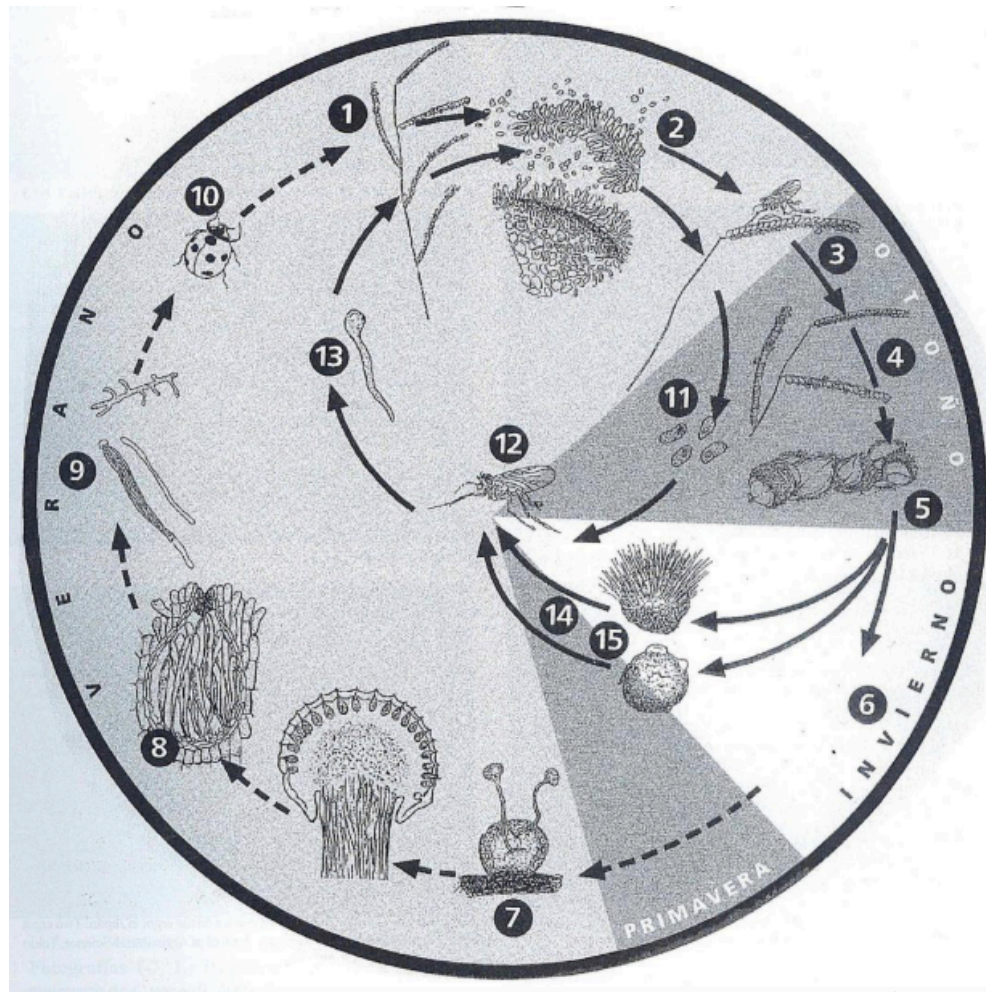


Figura 2: Ciclo biológico de *Claviceps paspali*, descrito por D'esposito R. & López C. (2001).

1.2. Características morfológicas

Entre las características variables del género *Claviceps*, se encuentran aquellas que refieren a su morfología; color y forma del escleroto, color del tronco y sombrero de la estructura estromática, tamaño y color del peritecio, ascos y ascosporas, tamaño y forma de macro y microconidias, entre

otras ⁴. Algunos autores han descrito en mayor profundidad las características morfológicas de algunas especies en particular, como *C. purpurea* ⁷ o *C. africana* y *C. sorghi* ⁸. Este último estudio, se basó no sólo en las características morfológicas *in vivo* de las especies, sino también en el crecimiento controlado de aislados en distintos medios, donde se estudió la tasa de crecimiento, forma de colonias y esporulación.

En *C. paspali*, los estudios más abarcativos de descripción morfológica *in vivo* los realizaron Brown (1916) y D'Esposito & López (2001). En estos trabajos, se definen las características del escleroto, la mielecilla, y las esporas del hongo, además de todas sus estructuras internas. La mielecilla es descrita como una '*secreción densa, pegajosa, de color ámbar claro muy semejante a la miel*' ⁵. Dentro de esta secreción, encuentran las células conidiogénicas, descritas como '*cilíndricas a lageniformes, caracterizadas por presentarse juntas a modo de empalizada*' ⁵ que producen conidios '*de 7,5-10 x 2,5-3,5 µm, cilíndricos a elípticos, de ápices redondeados*' ⁵. En cuanto al escleroto, lo describen como '*esférico, de consistencia dura, color pardo claro, de 2 a 5 mm de diámetro y superficie irregular*' ⁵. Esta estructura, también puede presentar variación en su coloración por contaminantes de superficie, tornándose rosa-anaranjada por presencia de *Fusarium* (Figura 3), o negruzca por contaminantes dematiaceos ⁵.



Figura 3: Esclerotos de *C. paspali* en *Paspalum dilatatum*, exhibiendo coloración anaranjada por infección con *Fusarium*.

Řičicová *et al.* (1986), por otro lado, realizó una caracterización morfológica *in vitro* de una línea comercial específica de *C. paspali* (FA, derivada de la línea F-2056) aislándola en diferentes medios de cultivo y bajo distintas condiciones de temperatura y tiempo de aislamiento. En este estudio, además de observaciones de textura y color de los aislados, se determinó que, en comparación con los medios M2 y Sabouraud, el crecimiento en medio PDA era significativamente menor. Aunque este trabajo es el único del estilo en *C. paspali*, está lejos de ser representativo para la totalidad de la subespecie, por lo que una caracterización más genérica *in vitro* de la especie sería de gran utilidad para futuros estudios.

1.3. Problemática: *Paspalum* y *Claviceps paspali* en Uruguay

1.4. Producción de semillas

En Uruguay, la disponibilidad de pasturas suficientes para rotación forrajera es uno de los principales problemas de la producción ganadera ^{9,10}. Los cultivos están integrados principalmente por gramíneas y leguminosas invernales (Avena, Raigrás), que no presentan gran crecimiento estival ^{11,12}. Por este motivo, el verano es una época crítica de producción de forraje, lo que conlleva a la explotación ineficiente del ambiente mediante la sobreutilización de pasturas y a la colonización por especies invasoras y malezas ⁹. Esto dificulta tanto el laboreo posterior de la tierra, como la persistencia de las nuevas especies introducidas ⁹. Por todos estos motivos, se hace evidente que la complementariedad de los ciclos de crecimiento entre gramíneas invernales y estivales presentan un rol fundamental en el mantenimiento de la estabilidad ecológica. Sin embargo, la oferta en el mercado de pasturas estivales perennes es muy baja, y se identifica como uno de los grandes problemas a solucionar ¹⁰.

El género *Paspalum* (*Poaceae*; *Paspaleae*) comprende entre 350-400 especies. Múltiples autores han intentado categorizarlas en subgéneros, subespecies o familias basados en caracteres exomorfológicos, empezando por Chase en 1929 ¹³⁻¹⁵. Actualmente hay 4 subgéneros reconocidos; *Anachrys Chasem*, *Cerecia Rchb.*, *Harposrachys* y *Paspalum*, siendo el último el que se compone de más especies (265) que a su vez se dividen en 25 grupos informales ^{14,15}. Múltiples subespecies, principalmente del subgénero *Paspalum*, presentan potencial económico como alimento, césped o uso ornamental, y por tanto son punto de estudio para buscar una solución a la problemática que

enfrenta el cultivo forrajero estival en nuestro país ^{14,15}. Dentro de las mismas, se destacan *P. dilatatum*, *P. notatum*, *P. plicatulum* y *P. urvillei*, y dentro de *Anachrys*; *P. malacophyllum* ¹⁴.

Aunque en el género se puedan encontrar prácticamente todas las características deseables en una planta forrajera, una de las grandes limitantes para su uso es la baja producción de semilla viable. Para ser un cultivo comercializable, se requiere poder obtener una cantidad de semillas considerable, con rendimiento suficiente a un precio razonable ^{10,11,16}. Sin embargo, muchas especies de *Paspalum* como *P. dilatatum* y *P. plicatulum* presentan alta susceptibilidad a infección por *C. paspali* ^{9,10,17}. La infección por este hongo, además de limitar la producción de semillas dado que su mecanismo de infección se basa en invadir los ovarios no fecundados y sustituir las semillas por esclerotos, dificulta la cosecha de las semillas que logran desarrollarse correctamente ^{6,10,18}.

La infección por *C. paspali* es policíclica, y al coincidir su ciclo de infección con el de producción de *Paspalum*, su incidencia aumenta ampliamente durante la estación de recolección de semillas. La infección por este hongo solamente puede ser detectada por la presencia de mielecilla sobre las espigas ¹⁸, por lo que se detecta por primera vez al momento de recolección sin poder evitar su incidencia. El agravante de esta situación es que no se cuenta con métodos de control eficientes, y siendo nuestro país centro de origen de especies de *Paspalum*, el hongo se encuentra presente en todo el territorio y encuentra formas de expandirse rápidamente. El único método descrito para la evasión de la infección hasta el momento es el recorte permanente tanto por pastoreo como por siega-, evitando alturas de más de 20 cm ¹⁸.

1.5. Micotoxinas

Una de las características particulares del género *Claviceps* es la producción de indol alcaloides en los esclerotos conocidos como “alcaloides del *ergot*”, de los que -desde que se logró aislar el hongo *in vitro* en 1960, hasta el momento- se han logrado aislar más de 50 tipos ⁴. Estos metabolitos generan síntomas variados en los animales que los consumen. Tal es así que el género fue inicialmente conocido por generar grandes brotes de intoxicación tanto en animales como en humanos, conocida como “ergotismo” ^{4,19}.

Aunque *C. paspali* produce este tipo de alcaloides, sus concentraciones de producción son lo suficientemente bajas como para no ser problemáticas en la alimentación del ganado ²⁰. Sin embargo, esta especie en particular es la única en la que se ha encontrado información genética potencial de expresión de alcaloides indol-diterpenos (IDTs) ²⁰. Las IDTs en el metabolismo del hongo actúan como efectoras de interacciones con el hospedero, y como defensa de la estructura de supervivencia. Sin embargo, estas micotoxinas provocan potentes síntomas neurotrópicos y tremorgénicos en insectos y mamíferos, ya que al ser consumidas inhiben los canales de potasio del sistema nervioso central. En ganado, la intoxicación por indol-diterpenos por la ingesta de pasturas infectadas presenta temblores característicos, conocidos como “*staggers*” (tambaleos). Los episodios de toxicosis en ganado, tanto por IDTs como por alcaloides del ergot causan significativas pérdidas económicas en la agricultura ^{2,21}.

Dentro de los animales afectados, el ganado vacuno presenta mayor incidencia de ergotismo, ya que muestra preferencia a comer pasturas infectadas. Se ha notado incluso, que los animales que han sufrido infección se vuelven adictos y lo consumen siempre que se encuentre disponible. Contrariamente, aunque se han reportado casos de infección en equinos y bovinos, es menos

frecuente ya que se muestran naturalmente reacios a alimentarse de forraje infectado. Hasta el momento no existe forma de prevenir o curar el ergotismo, por lo que la única solución es apartar a los animales de las pasturas infectadas, ya que si continuaran ingiriendo alcaloides podrían llegar a fallecer por intoxicación ¹⁸.

1.6. Técnicas moleculares utilizadas en el estudio de *Claviceps*

1.7. Genes de identificación

El interés por el estudio de hongos causantes de *ergot* surgió en los últimos años, exceptuando *C. purpurea* que ha sido causante de intoxicaciones severas en humanos y animales a lo largo de la historia, por lo que su morfología, fisiología y rango de hospederos ha sido muy caracterizada ^{7,22}. De hecho, el conocimiento sobre la evolución y la arquitectura genética del género, y sobre su variabilidad genética es muy limitada ^{3,7}. Muchos autores han indagado en técnicas moleculares con la intención de ahondar en la relación entre especies y la distribución de la variabilidad genética entre ellas, sin embargo, los estudios que involucran especies fuera de *C. purpurea* han sido muy limitados ^{23,24}.

Distintos autores han utilizado regiones de genes cromosómicos, como el factor de elongación 1- α (*TEF1*) ^{20,23,24}, β -tubulina (*TUB2*) ^{7,20,23,24}, parte de la subunidad II de ARN polimerasa (*RPB2*) ^{2,20}, e incluso ADN ribosomal (*LSU*) con la intención de obtener información que relacione o diferencie filogenéticamente entre especies de *Claviceps*, para lograr desarrollar herramientas de identificación ²⁰. Recientemente, Wyka *et al.* (2021) en un estudio genómico de distintas especies de *Claviceps* demostró que los resultados filogenéticos obtenidos por Píchová *et al.* (2018) basado en 5 genes de identificación, mostraban topología coincidente con el estudio del genoma completo.

1.8. Estudio de microsatélites

Aunque la gran mayoría de los estudios genéticos en *Claviceps* han sido desarrollados en genes, se ha dilucidado que los ensayos basados en marcadores moleculares (RAPD, AFLP, SRAP) resultan más informativos ^{25,26}.

Dentro de las técnicas moleculares utilizadas para el estudio de *Claviceps*, las técnicas basadas en microsatélites no han sido mayormente desarrolladas. Los microsatélites, o repetidos de secuencia simples (SSRs, por su sigla en inglés *simple sequence repeats*), son una clase de repetidos en tándem que involucran secuencias de 1 a 10 pares de bases, y se pueden encontrar concatenados hasta 100 veces, y dispersos en varios puntos del genoma ^{27,28}. Se ha demostrado que el número de repeticiones varía ampliamente entre individuos, y se cree que esto se debe a un deslizamiento o *slippage* del ADN polimerasa durante la síntesis y reparación del ADN ²⁸. Además de ser polimórficos y muy variables en la población, algunas características interesantes de los microsatélites son su herencia mendeliana, su naturaleza codominante, y su alta tasa de mutación ^{27,28}.

Desde que fueron descubiertos en 1974 por Skinner, Beattie and Blattner (1974) se han utilizado ampliamente en ensayos de identificación genética, mapeo genómico, estructura genética de poblaciones, y análisis de parentesco, principalmente en animales y plantas ^{27,28}. Sin embargo, muy pocos trabajos se han realizado en hongos ^{27,28}. Recientemente Moon *et al.* (1997) y Gilmore *et al.* (2016) utilizaron esta técnica en *Epichloë* y *C. purpurea*, respectivamente. Sus resultados muestran que esta técnica tiene un gran potencial, y resulta incluso más informativa que las técnicas moleculares clásicas utilizadas previamente ^{28,29}. La técnica utilizada por estos autores se basa en una amplificación por PCR que usa como *target* las secuencias conservadas flanqueantes a la

secuencia de interés, logrando amplificar todos los repetidos en conjunto ^{28,29}. De esta forma, se logra comparar los posibles polimorfismos presentes, y combinarlos con la rapidez, sensibilidad y especificidad del PCR ²⁸.

Gilmore *et al.* (2016) describió 34 microsatélites, entre los que se encuentran di-, tri-, tetra-, y pentanucleótidos, que logró utilizar para identificar y diferenciar 74 aislados de *C. purpurea*, y también amplificar en *C. pusilla*, *C. paspali* y *C. fusiformis*. En su trabajo, concluye que la técnica sería valiosa para lograr diferenciar entre especies y linajes dentro del género *Claviceps*, postulando el uso de esta técnica como posible herramienta para la diferenciación molecular de aislados de *C. paspali* ²⁹.

Aumentar la información disponible sobre la estructura genética de estos patógenos, hace más cercana la posibilidad de implementar estrategias efectivas de erradicación o control de la infección en el futuro ⁷. Poder identificar con mayor precisión las subespecies podría permitir la discriminación entre cepas según persistencia, virulencia, e incluso producción de alcaloides ²⁰. Además, permitiría seleccionar cepas de *C. paspali* específicas a utilizar en ensayos de patogenicidad en accesiones utilizadas en programas de mejoramiento de especies del género *Paspalum*.

2. Objetivos

2.1. Objetivos generales

Identificar y analizar la diversidad fenotípica y genotípica de aislados de *C. paspali* obtenidos a partir de 5 especies de *Paspalum* presentes en Uruguay.

2.2. Objetivos específicos

- Generar una colección de aislados de *Claviceps paspali* causante del *ergot* en especies del género *Paspalum* a nivel nacional;
- Verificar que *C. paspali* sea el único causante de los síntomas del *ergot* observados en *Paspalum spp.* en Uruguay;
- Generar una caracterización molecular de aislados obtenidos de distintos hospederos a partir de 4 genes de identificación;
- Realizar un análisis filogenético de los aislados obtenidos a partir de forrajeras presentes en el territorio uruguayo;
- Ajustar las condiciones de reacción para estudio de variabilidad basado en microsatélites multialélicos;
- Obtener datos fenotípicos de los aislados obtenidos (capacidad de crecimiento en diferentes medios, capacidad de esporulación *in vitro*, pigmentación de colonias).

3. Materiales y métodos

3.1. Recolección de muestras

Para este estudio, durante los meses de febrero a abril de 2021 se recolectaron inflorescencias de 5 especies distintas de *Paspalum* de distintos puntos del país exhibiendo signos coincidentes con los de infección por *C. paspali*. Entre las muestras recolectadas, se encuentran algunas obtenidas a partir de *P. malacophyllum*, especie que se considera resistente a la infección por *C. paspali*.

3.2. Aislamiento de micelio a partir de muestras recolectadas

Los aislados se realizaron por metodologías distintas según el material vegetal de partida.

Para el aislado a partir de esclerotos, previo al aislamiento se probaron distintas condiciones de esterilización para lograr su crecimiento sin la presencia de contaminantes. En todas las condiciones se partió retirando los esclerotos de la panoja, y realizando una inmersión en etanol 95% por 1 minuto, luego se varió entre diluciones 1:2, 1:3 y 2:5 de hipoclorito, por tiempos de 1, 5, 10 y 15 minutos. Todas las condiciones fueron continuadas por dos lavados en agua destilada.

Los esclerotos se secaron por aireado en cabina de flujo laminar.

Una vez obtenidos los esclerotos estériles, se les realizaron al menos dos cortes transversales, y se colocaron en placas con medio PDA (*Potato Dextrose Agar* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos)), con la superficie interna en contacto con el medio. Se incubaron 7 días a 27°C.

Para aquellas muestras en las que se partió de mielecilla, el aislado se realizó tomando una ansada directamente de panojas infectadas y diluyéndola en 1 ml de agua destilada. A partir de esa muestra

se realizaron las diluciones correspondientes para alcanzar concentraciones de 100 conidios/ml y se realizaron cultivos en placas con medio PDA por estriado y recuperación de conidios germinados individuales. Se incubaron 15 días a 27°C, y posteriormente se conservaron a 4°C.

3.3. Extracción de ADN

Se realizaron cultivos en PDB (*Potato Dextrose Broth*, Oxoid, Massachusetts, Estados Unidos) a partir de micelio recortado de cada uno de los aislados, por 7 días a 27°C, 180 rpm. A partir del crecimiento micelial se realizó la extracción de ADN mediante el kit *Quick-DNA Plant/Seed Miniprep* de Zymo Research (California; Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante. Se conservaron las muestras a -20°C.

Las extracciones fueron cuantificadas mediante espectrofotometría a 580 nm en NanoDrop 8000 (ThermoFischer Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

3.4. Caracterización molecular de los aislados

A partir de extracciones de ADN realizadas previamente, se amplificaron -según lo descrito por Oberti *et al.* (2020)- regiones del factor de elongación 1- α (*TEF1*), β -tubulina (*TUB2*), parte de la subunidad II de la ARN polimerasa (*RPB2*) y la subunidad nuc del ADN ribosomal (*LSU*).

Para el fragmento de *TUB2* se utilizaron los *primers* T10 (ACGATAGGTTACCTCCAGAC)³⁰ y Bt2b (ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC)³¹. Las extracciones que no mostraron amplificación con el *primer* T10, fueron amplificadas con Bt2a (TTTCGTGGTATTGTTTCGCAGA)³¹. Los *primers* EF1-728F (CATCGAGAAGTTCGAGAAGG) y EF1-986R (TAC TTGAAGGAACCCTTACC) fueron utilizados para la región del gen *TEF1*³². Para el gen *LSU* se utilizaron LROR

(GTACCCGCTGAACTTAAGC) y LR5 (ATCCTGAGGGAAACTTC), y para *RPB2*; RPB2_CpaspF (GAGACGGAAAAGTGGCAAAG) y RPB2R_CpaspR (ACATGTGTGTCGTCGGATTG)²⁰.

Se realizaron reacciones de PCR conteniendo 2,5X *Buffer* Taq +KCl-MgCl₂ 10X (ThermoFischer Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), 2 mM MgCl₂, 1U ADN Taq polimerasa (ThermoFischer Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), 0.2 mM dNTPs, 2 pmol de cada *primer* correspondiente, y 20-50 ng de ADN molde, en 25 µl finales. Las condiciones de reacción para *LSU* y *RPB2* fueron; 3 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 95°C 30 s, 58°C 60 s, y 72°C 60 s, y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Para *TEF1* el ciclado fue; 95°C 3 min, 30 ciclos de 95°C 30 s, 58°C 30 s, y 72°C 90 s, con una extensión final de 10 min a 72°C, y para *TUB2*; 95°C 3 min, 30 ciclos de 95°C 30 s, 55°C 30 s, y 72°C 90 s, con una extensión final de 30 min a 30°C. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Los productos de reacción fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa 2% p/v con *buffer* TBE 0,5X, y observados en un transiluminador UV. Las muestras en las que se visualizó amplificación se enviaron a Macrogen (Seúl, Corea) a secuenciar en ambas direcciones.

Para verificar la especie a la cual pertenecen los aislados, una vez obtenidas las secuencias, se seleccionó un aislado al azar y a partir del gen *RPB2* se realizó una búsqueda en base a BLASTn utilizando la base de datos de nucleótidos de NCBI. A partir de esa búsqueda se descargaron las secuencias de las especies cercanas, siguiendo el procedimiento de Oberti *et al.* (2020), y se alinearon utilizando ClustalW en MEGA7³³. Se realizó un árbol filogenético usando los *tests* de

máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML) a partir del alineamiento utilizando secuencias de referencia de 7 especies de *Claviceps*, y *Epichloë typhina* como control externo.

Todos los aislados coincidentes con *C. paspali* realizados para este estudio fueron reaislados en medio PDA o AS (*Agar Sabouraud*) y agregados a la colección del Banco de germoplasma de INIA Las Brujas.

3.5. Análisis filogenéticos

Se realizó alineamientos individuales para los genes *TUB2*, *TEF1*, *RPB2*, y *LSU* a partir de los aislados obtenidos en este estudio, y 33 aislados de *C. paspali* (Anexo 3), utilizando como grupo externo *C. africana*. A partir de las mismas se realizaron árboles filogenéticos por separado y concatenados conteniendo los cuatro genes de identificación, utilizando los algoritmos de máxima parsimonia (MP) y máxima probabilidad (ML) considerando un *bootstrap* de 1000.

3.6. Amplificación de microsatélites

De la selección de *primers* descritos por Gilmore *et al.* (2016), se realizó una subselección de aquellos que resultaron multialélicos para *C. paspali* (Tabla 1). Tal como lo describe el autor, a los *primers forward* se les agregó una secuencia M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') en el extremo 5', para permitir el etiquetado fluorescente para el estudio posterior de las amplificaciones, y a los *primers reverse* se les agregó una cola de adenilación (5'-GTTT-3') en 5' para reducir el número de picos divididos.

Tabla 1: Selección de *primers* multialélicos para *C. paspali* utilizados en el ensayo, descritos por Gilmore *et al.* (2016). Se detalla secuencias, tamaño esperado en pares de bases para *C. purpurea*, y alelos observados en *C. paspali*.

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Tamaño esperado (pb)</i>	<i>Alelos</i>
Cpur6	F: GACTGGCATCCGCATTTC	317-375	103, 245, 442
	R: GTCGCGCGTGAATCTTGAG		
Cpur7	F: TCAACGCACAGAGCAATCC	371-395	156, 427
	R: CTGCACAAGCACTGGAAGG		
Cpur8	F: TTCTCCCGCCGTATAACCG	302-317	97, 136
	R: GTTCGCGATCTGACGTTCC		
Cpur12	F: CGGAGCAAATGTTTCGTCCC	413-433	107, 247, 364, 371
	R: AGTACATCGGCCTGGAACC		
Cpur20	F: GACACCCATTGGCAACCAG	318-321	203, 353, 502
	R: TCAGAGGCGCAGTATCGAC		
Cpur23	F: TGCCTTGCCTTCTTTCAGC	350-365	151, 228, 341
	R: GGCAACTTGGCAGAAGACC		
Cpur26	F: GGTTCGTCTATGGCGTGGAG	411-426	92, 301, 421
	R: CTCCGAATCAATCCCGTGC		
Cpur30	F: CCACCGGGCATTGTTGAAG	225-305	166, 247, 396, 417
	R: CATGTCTCAAGGCGGCAAG		
Cpur41	F: ACTTGACGGCTGGGTATGG	431-454	220, 254, 379, 500
	R: GCTGTTTCCAAGACGGCAG		
Cpur43	F: TGAGTCGTGACCCAACCAG	250-280	122, 258, 510
	R: TCACCCGTAAGTGTGCTCC		
Cpur48	F: TCCATCCGACAACGAGCTG	431-442	252, 358, 510
	R: GGTATGCCGGAGGGTATGG		
Cpur58	F: AGGTTGGACTIONTGGTAGGCG	437-458	106, 205, 319
	R: GCTTCAGTACAGCATGGGC		
Cpur68	F: TTGTAAACGTCGCGAAGGC	97, 255-263	98, 146, 175, 240
	R: AAGTTGGCGTTGAATGGGC		
Cpur69	F: ATTCCTCGCCCTCTTTGGG	104, 427-436	159, 176, 325
	R: CGTCAACTTCGCCGATTCC		
Cpur177	F: CCCTCACGGTACGAGATCC	465-475	261, 317, 475
	R: CTGCCATCATCAAAGCCC		

Se utilizaron tres condiciones distintas de amplificación. Inicialmente, se utilizó el protocolo y ciclado descrito por Gilmore *et al.* (2016) con ligeras modificaciones. Cada reacción conteniendo

1,5 µl *buffer* Taq +KCl-MgCl₂ 10X (ThermoFischer Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), 0,4 µl dNTPs 10 mM, 1,2 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,075 µl ADN Taq polimerasa (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), 0,13 µl *primer forward* 10 µM, 0,75 µl *primer reverse* 10 µM, 0,075 µl de *tag* M13 10 µM y 50 ng ADN molde, en un volumen final de 15 µl. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) mediante un ciclado *touchdown*, iniciando con una desnaturalización a 94°C por 3 min, 10 ciclos de 94°C 40 s, 62°C 45 s (disminuyendo 1°C por ciclo), 72°C por 45 s, seguido de 20 ciclos de 94°C 40 s, 52°C 45 s, 72°C 45 s, 8 ciclos de 94°C 40 s, 53°C 45 s, 72°C 45 s, y una extensión final de 72°C por 30 min ²⁹, y mediante un ciclado clásico con una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, 30 ciclos de 94°C 30 s, 56°C 45 s y 72°C 45 s, seguido de 8 ciclos de 94°C 30 s, 53°C 45 s, y 72°C 45 s, con una extensión final de 72°C 10 min ³⁴. El ciclado descrito por Gilmore *et al.* (2016) fue también utilizado para la amplificación mediante el *Mastermix MyFiTM 2X* (Meridian Bioscience, Ohio, USA), modificando levemente las condiciones especificadas por el fabricante; en un volumen final de 25 µl, 12,5 µl *Mastermix*, 0,5 µl *primer forward* 10 µM, 0,5 µl *primer reverse* 10 µM, 0,75 µl *tag* M13, y 50 ng ADN molde.

Los productos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa 2% con *buffer* TBE 0,5X, y observados en un transiluminador UV.

3.7. Estudio fenotípico

A partir del crecimiento de hifas en medio PDA (Oxoid, Massachusetts, Estados Unidos), se realizaron cortes superficiales circulares de 4 mm de diámetro y se colocaron en placas de PDA (Oxoid, Massachusetts, Estados Unidos), T2 ³⁵ y Medio *Claviceps* (MC) ²⁹ por triplicado. Se incubaron 7 días en oscuridad a 27°C. Se tomaron imágenes previo y posterior a la incubación.

Se comparó crecimiento diametral midiendo por triplicado cada aislado previo y posterior a la incubación. Las medidas fueron tomadas mediante la herramienta ImageJ (*National Institutes of Health*, Estados Unidos) a partir de las imágenes tomadas. Se comparó crecimiento total y se calculó la tasa de crecimiento diario, tomando en cuenta los días de incubación y el crecimiento total, y considerando el desvío estándar de las medidas.

Además, se registró color de micelio anverso y reverso según el código de colores de Munnell³⁶, forma, textura, elevación, margen y presencia de pigmento en el medio de cultivo.

Se evaluó esporulación *in vitro* en medio PDA. En las placas que mostraron producción de mielecilla, se tomó directamente. En las que no, se colocó 1 ml de agua destilada sobre el micelio, raspando levemente la superficie. Se observaron en cámara de Neubauer, y en los casos en los que se observó esporulación, se realizaron cálculos de concentración de esporas por placa.

4. Resultados y discusión

4.1. Aislamiento *in vitro*

A partir de las muestras recolectadas, se determinó un protocolo de esterilización de esclerotos para lograr el aislamiento de *C. paspali* sin contaminantes. Se seleccionó la condición de dilución 1:2 de hipoclorito por 15 minutos, por mostrar crecimiento de hongos con morfología similar a *C. paspali* sin contaminaciones (Figura 4). Todos los esclerotos utilizados para realizar los aislamientos subsiguientes se esterilizaron según este protocolo.

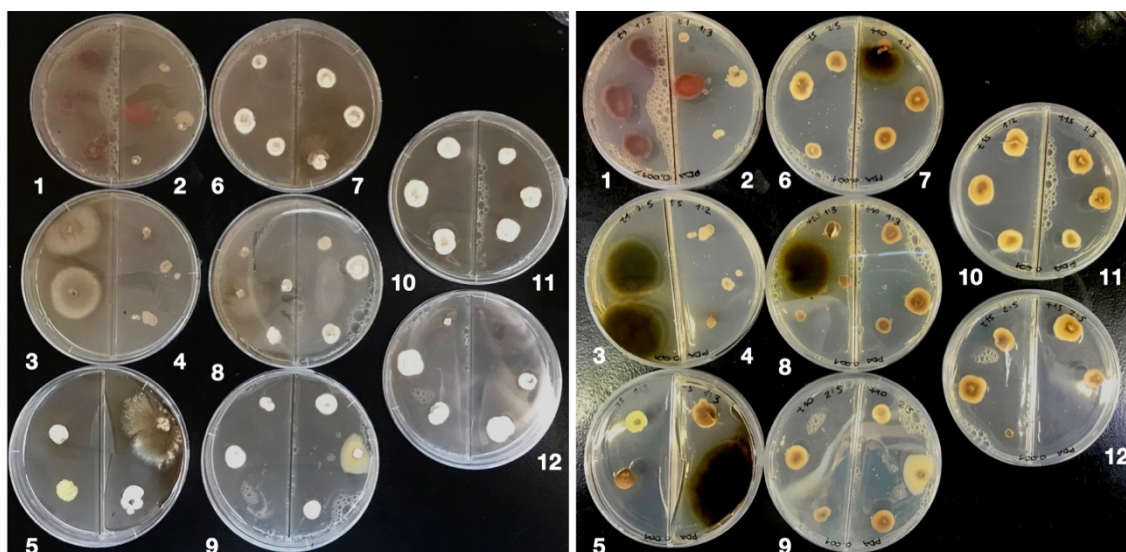


Figura 4: Aislados de *C. paspali* a partir de esclerotos esterilizados utilizando distintos procedimientos; 1- 1 minuto, dilución hipoclorito 1:2; 2- 1 minuto, dilución hipoclorito 1:3; 3- 1 minuto, dilución hipoclorito 2:5; 4- 5 minutos, dilución hipoclorito 1:2; 5- 5 minutos, dilución hipoclorito 1:3; 6- 5 minutos, dilución hipoclorito 2:5; 7 - 10 minutos, dilución hipoclorito 1:2; 8 - 10 minutos, dilución hipoclorito 1:3; 9 - 10 minutos, dilución hipoclorito 2:5; 10 - 15 minutos, dilución hipoclorito 1:2; 11 - 15 minutos, dilución hipoclorito 1:3; 12 - 15 minutos, dilución hipoclorito 2:5.

Se lograron realizar 34 aislados con morfología similar a *C. paspali* de 5 puntos del país, partiendo de 5 especies distintas de *Paspalum* (Figura 5). Dos de estos aislados fueron realizados a partir de *P. malacophyllum* (Tabla 2; U69, 70), especie considerada primeramente como inmune³⁷ y posteriormente como resistente a la infección por *C. paspali*³⁸.

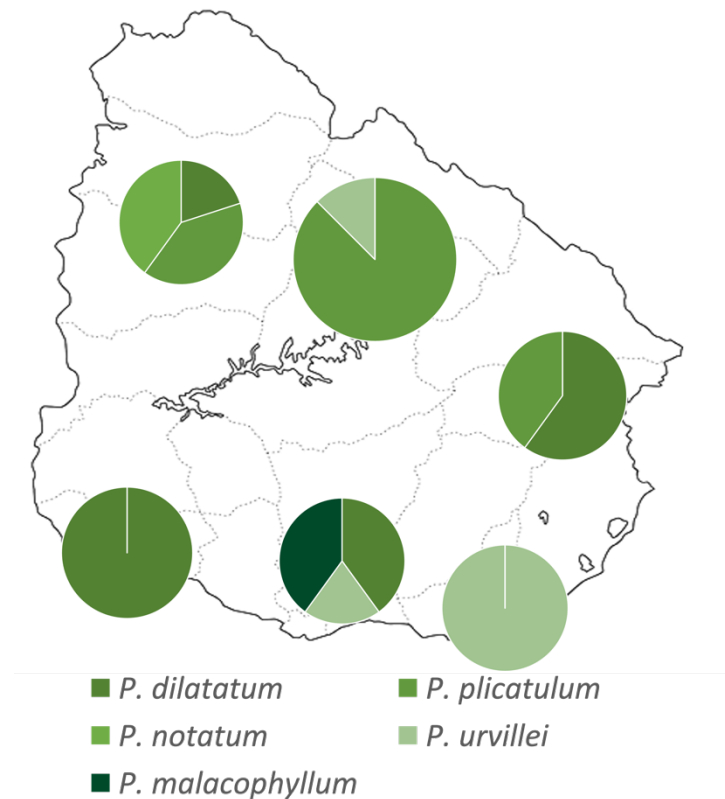


Figura 5: Mapa mostrando porcentaje de aislados recolectados a partir de distintos hospederos, en los diferentes puntos del país.

Además de estas muestras, se utilizaron para el estudio 4 aislados previamente realizados por Oberti *et al.* (2020) (Tabla 2; ILB374, 388, 375 y 432), que mostraron esporulación *in vitro* en medio MC, y han sido evaluados en invernáculo en estudios de infección en *Paspalum spp.* (datos sin publicar). Estos se encuentran en la colección del Banco de germoplasma INIA Las Brujas con los códigos descritos en la Tabla 2.

Tabla 2: Aislados utilizados en este ensayo. Se detalla código de almacenamiento en colección de Banco de germoplasma INIA Las Brujas (Código ILB), accesión de donde fue tomada la muestra y locación.

Aislado	Código ILB	Accesión	Locación
U 29*	374	<i>P. dilatatum spp.</i>	El Eucaliptus (Paysandú)

U 30*	388	<i>P. plicatulum</i>	Villa Ansina, Tacuarembó
U 31*	375	<i>P. dilatatum spp.</i>	INIA Las brujas
U 59*	432	<i>P. urvillei</i>	VerdeMora, Maldonado
U 67	459	<i>P. urvillei</i>	Ruta 26 Km 247,700
U 68	460	<i>P. dilatatum spp.</i>	Treinta y Tres
U 69	461	<i>P. malacophyllum</i>	INIA Las brujas
U 70	462	<i>P. malacophyllum</i>	INIA Las brujas
U 71	463	<i>P. plicatulum</i>	Ruta 30 km 24,100 (Tranquera)
U 72	464	<i>P. plicatulum</i>	INIA Tacuarembó
U 73	465	<i>P. plicatulum</i>	INIA Salto Grande
U 74	466	<i>P. notatum CV. Pensacola</i>	INIA Salto Grande
U 75	467	<i>P. urvillei</i>	INIA Las brujas
U 77	469	<i>P. plicatulum</i>	Treinta y Tres
U 79	471	<i>P. plicatulum</i>	Treinta y Tres
U 80	472	<i>P. dilatatum CV. Estanzuela Chirú</i>	INIA Salto Grande
U 83	474	<i>P. dilatatum CV. Estanzuela Chirú</i>	INIA Treinta y tres
U 85	475	<i>P. notatum CV. Sepé</i>	INIA Salto Grande
U 86	468	<i>P. notatum CV. Pensacola</i>	INIA Glencoe (Paysandú)
U 88	476	<i>P. dilatatum CV. Estanzuela Chirú</i>	INIA Colonia
U 89	477	<i>P. dilatatum Flavescens</i>	INIA Colonia
U 90	478	<i>P. plicatulum</i>	INIA Tacuarembó
U 91	479	<i>P. notatum CV. Sepé</i>	INIA Salto Grande
U 92	480	<i>P. dilatatum CV. Estanzuela Chirú</i>	INIA Las brujas
U 93	481	<i>P. dilatatum flavescens</i>	INIA Treinta y tres
U 94	482	<i>P. plicatulum</i>	INIA Tacuarembó
U 95	483	<i>P. plicatulum</i>	INIA Tacuarembó
U 96	484	<i>P. plicatulum</i>	INIA Tacuarembó
U 97	485	<i>P. urvillei</i>	INIA Salto Grande
U 98	486	<i>P. plicatulum</i>	INIA Salto Grande
U 99	487	<i>P. plicatulum</i>	INIA Salto Grande

U 100	488	<i>P. plicatum</i>	INIA Salto Grande
U 101	489	<i>P. urvillei</i>	INIA Salto Grande
U 102	490	<i>P. urvillei</i>	INIA Salto Grande
U 103	491	<i>P. urvillei</i>	INIA Salto Grande

* Aislados realizados previamente en Oberti *et al.* (2020).

4.2. Identificación molecular de aislados

Para confirmar la especie de los aislados, se realizó un análisis que incluyó 11 secuencias obtenidas de Genbank, abarcando 7 especies de *Claviceps* (*C. monticola*, *C. zizinar*, *C. nigricans*, *C. sorghi*, *C. africana*, *C. clavispora* y *C. paspali*) (Anexo 2), y *Epichloë typhina* como grupo externo. Se realizó análisis por MP (Figura 6) y por ML, donde se utilizó el modelo de 2 parámetros de Kimura (K+2) por considerarse el más apropiado. En ambos casos todos los aislados obtenidos en este ensayo se agruparon junto con la secuencia de *Claviceps paspali* CCC 130, obtenida de Genbank, y se diferenciaron del resto de las especies con un *bootstrap* de 99%. De esta forma se puede afirmar que los aislados pertenecen a *C. paspali*.

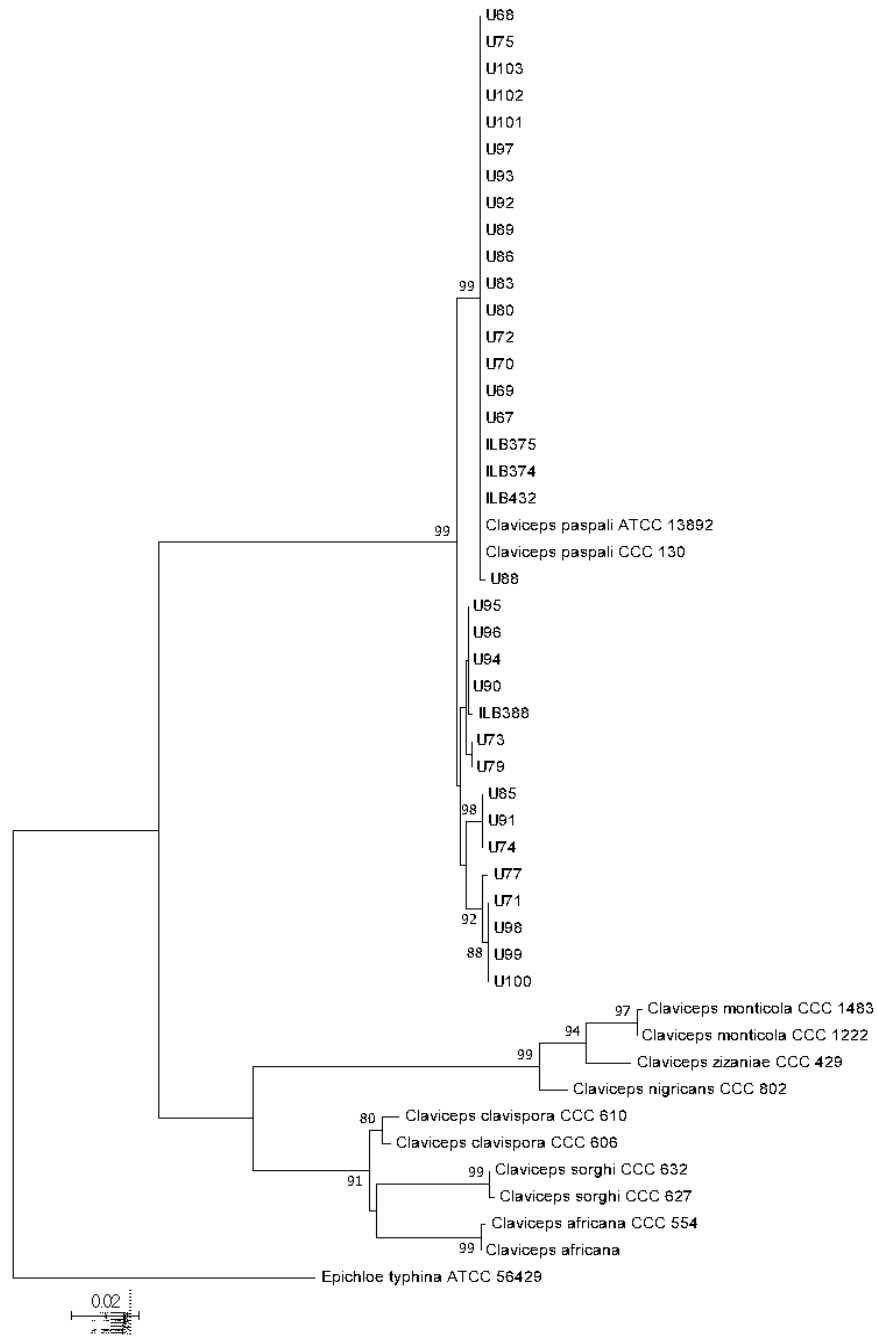


Figura 6: Árbol de mayor parsimonia obtenido por análisis filogenético a partir de secuencias de *RPB2* de 7 especies distintas de *Claviceps* y 38 aislados utilizados en este estudio, ubicando a *Epichloë typhina* como grupo externo. Realizado en software MEGA7.

Mediante este estudio se logra también verificar el resultado obtenido por Oberti *et al.* (2020) sobre la infección por *C. paspali* en las forrajeras *P. dilatatum* y *P. plicatulum*. Se agrega a esa

información, que *P. urvillei*, *P. notatum* y *P. malacophyllum*, también son infectadas por *C. paspali*.

Interesantemente, se observa en la sección *Paspalorum* una división entre los aislados, con un *bootstrap* de 99-64. Esta observación resulta coincidente con la subespeciación planteada por Oberti *et al.* (2020).

4.2.1. Diversidad de *Claviceps paspali* en base a *TUB2*, *TEF1*, *RPB2* y *LSU*

A partir de la verificación de la especie, se realizó un estudio filogenético entre aislados para estudiar una posible variabilidad entre ellos. Para esto, se realizó el alineamiento de los genes *TEF1*, *TUB2*, *RPB2* y *LSU* de cada aislado, con 33 secuencias de referencia para cada gen y *C. africana* como control externo (Anexo 3).

Se realizaron árboles filogenéticos mediante ML y MP con un *bootstrap* en base a 1000 repeticiones para los genes *LSU*, *RPB2*, *TUB2* y *TEF1* de todos los aislados en estudio (Figuras 7-10; Anexo 4), incluyendo aquellos previamente obtenidos por Oberti *et al.* (2020), y luego de una concatenación de estos (Anexo 5). Como grupo externo se utilizó *C. africana*.

En los análisis por ML para cada gen, todos los aislados obtenidos de *P. dilatatum*, *P. urvillei*, y *P. malacophyllum* fueron agrupados en un mismo clado, separados del los obtenidos de *P. plicatulum* con un soporte de *bootstrap* de entre 89-99 (Figuras 7-10). En cuanto a los aislados obtenidos de *P. notatum*, un solo aislado se observó en el grupo contenido por las primeras 3 especies, y los restantes junto con los aislados de *P. plicatulum*. Los resultados observados podrían

ser coincidentes con una subespeciación dentro de la especie, resultado planteado previamente por Oberti *et al.* (2020).

Una situación similar fue descrita por Pazoutova *et al.* (2014) y Douhan *et al.* (2008) en *C. purpurea*, donde estudios filogenéticos basados en distintos genes de identificación formaron parte de la descripción de subespecies dentro del género.

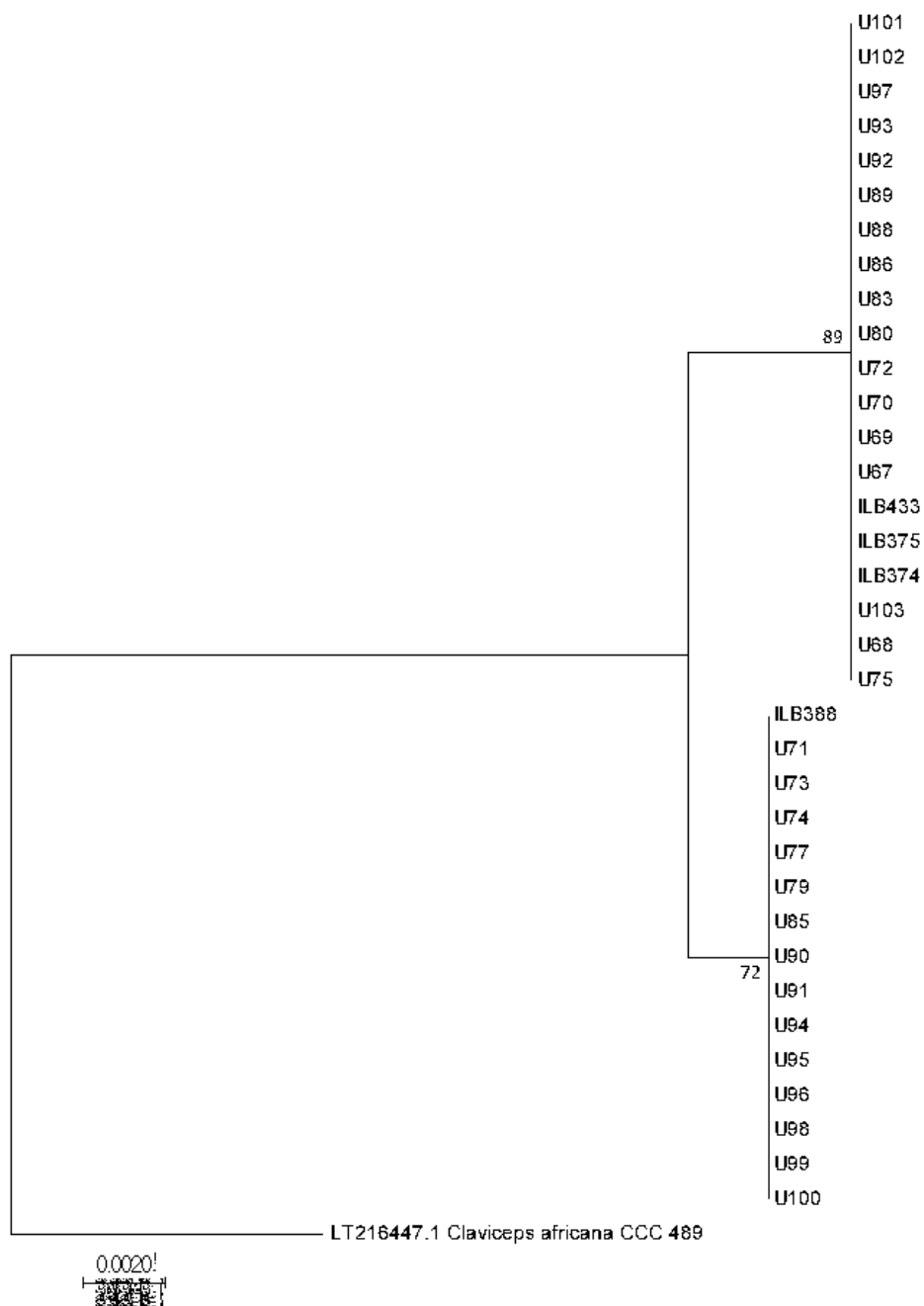


Figura 7: Árbol filogenético para el gen *LSU* de aislados de *C. paspali* obtenidos en este estudio, mediante máxima verosimilitud utilizando el modelo Jukes-Cantor (JC) considerando un *bootstrap* de 1000, utilizando *Claviceps africana* como grupo externo. Realizado mediante el software MEGA7

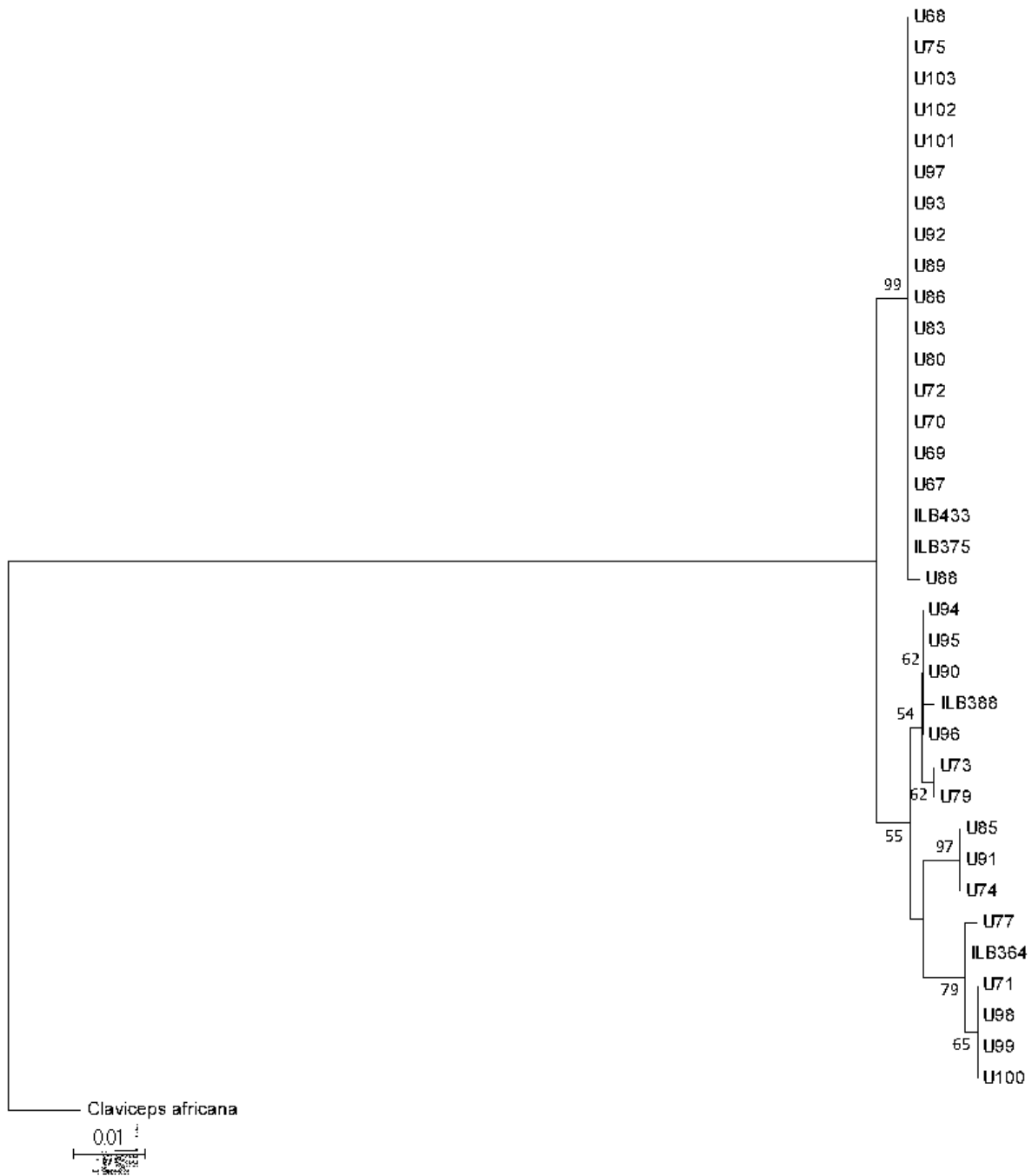


Figura 8: Árbol filogenético para el gen *RPB2* de aislados de *C. paspali* obtenidos en este estudio, mediante máxima verosimilitud utilizando el modelo K2 considerando un *bootstrap* de 1000, utilizando *Claviceps africana* como grupo externo. Realizado mediante el software MEGA7

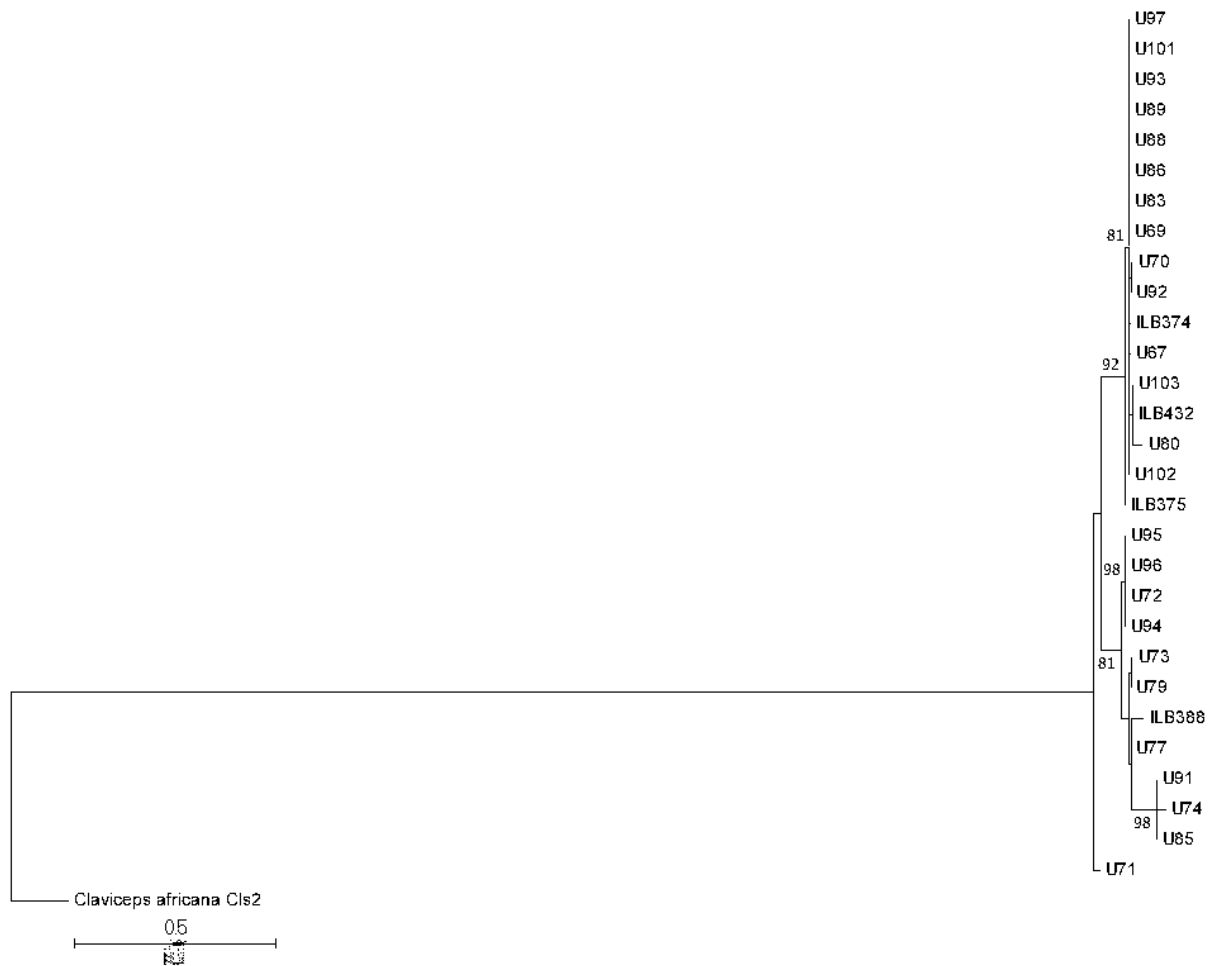


Figura 9: Árbol filogenético para el gen *TEF1* de aislados de *C. paspali* obtenidos en este estudio, mediante máxima verosimilitud utilizando el modelo K2+G considerando un *bootstrap* de 1000, utilizando *Claviceps africana* como grupo externo. Realizado mediante el software MEGA7

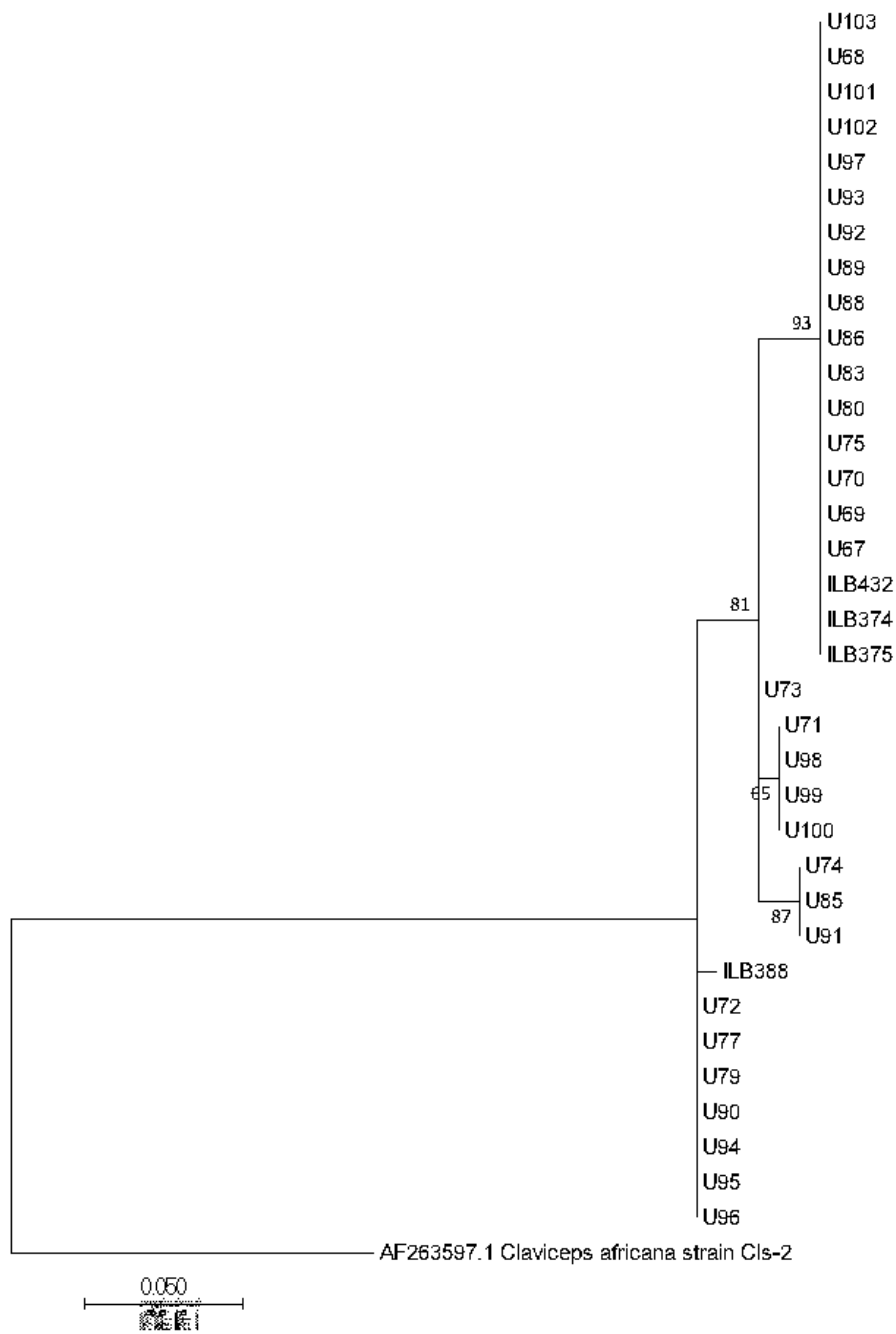


Figura 10: Árbol filogenético para el gen *TUB2* de aislados de *C. paspali* obtenidos en este estudio, mediante máxima verosimilitud utilizando el modelo K2 considerando un *bootstrap* de 1000, utilizando *Claviceps africana* como grupo externo. Realizado mediante el software MEGA7.

Los árboles filogenéticos basados en los genes *LSU* y *RPB2* claramente separan en dos clados la especie, soportado por *bootstraps* de 89 y 72 (*LSU*), y 99 y 55 (*RPB2*). *TUB2* y *TEF1* generan una separación en la especie pero de una forma no tan clara, con separaciones menores en los aislados obtenidos de *P. plicatulum* y *P. notatum*. Una posible explicación para la diferencia de nitidez observada es que la diferenciación en *RPB2* y *LSU* haya sido evolutivamente más temprana que en *TEF1* y *TUB2*. Para poder corroborar esta teoría se requeriría un estudio más profundo de topología y evolución.

Este estudio podría demostrar la subespeciación dentro de la especie *C. paspali* propuesta por Oberti *et al.* (2020). En las Figuras 7-10 se puede observar claramente la separación de 11 aislados, de los cuales 8 provienen de *P. plicatulum*, y se agrupan junto con ILB388, uno de los aislados por los cuales Oberti *et al.* (2020) propuso la subespeciación inicialmente. Los 3 restantes fueron aislados de *P. notatum*, lo que podría significar su susceptibilidad a ésta posible subespecie de *C. paspali*. Sin embargo, uno de los aislados obtenidos a partir de *P. notatum* se encontró por fuera de esta separación, lo cual ameritaría consideración aparte. Se podría hipotetizar entonces, que mientras *P. plicatulum* se ve solamente afectada por la posible nueva subespecie descrita dentro de *C. paspali*, *P. notatum* es susceptible a ambas subespecies.

Una situación similar se observó en *C. purpurea*, donde a causa de su diferenciación en hospederos y características morfológicas se planteó la posibilidad de una subespeciación, que luego se verificó mediante análisis filogenético basado en 3 genes de identificación (*ITS*, *TUB2* y *RAS*)^{26,39}. En ese caso, finalmente se determinó que la especificidad de hospederos era meramente causa de la preferencia por el hábitat donde se encontraban los mismos, y que las forrajeras por sí mismas eran susceptibles a las diferentes subespecies. Se podría considerar lo descrito en ese caso como

una posibilidad de explicación a lo observado en *C. paspali* en este estudio, planteando la posibilidad de que la susceptibilidad de *P. notatum* sea la misma que la de las demás especies de esta forrajera, y que su infección no haya sido más que causa del hábitat donde se encuentra.

Los resultados observados parecerían coherentes con la hipótesis de subespeciación dentro de la especie *C. paspali*, planteada por Oberti *et al.* (2020). Además, la coincidencia con lo visto inicialmente en *RPB2* afirman aún más esta posibilidad, pudiendo significar incluso que esta diferenciación sería capaz de hacerse solamente con un gen.

4.2.2. Estudio de microsatélites

La técnica de análisis de microsatélites descrita por Gilmore *et al.* (2016) no mostró resultados alentadores.

Al correr las muestras en gel de agarosa 2% se observaron resultados distintos a los descritos por el autor, posiblemente amplificaciones inespecíficas. En los pocos casos en los que mostraban amplificaciones puntuales, éstas no se correspondían con el peso esperado descrito por Gilmore *et al.* (2016) (Figura 11, Figura 12).

Tabla 3: Nombre y secuencia de *primers* utilizados para amplificación de microsatélites en *C. paspali*, con tamaño esperado y cantidad de alelos según Gilmore *et al.* (2016).

Nombre primer	Secuencia	Tamaño esperado (pb)	Alelos
Cpur6	F: GACTGGCATCCGCATTTCC	317-375	103, 245, 442
	R: GTCGCGCGTGAATCTTGAG		
Cpur7	F: TCAACGCACAGAGCAATCC	371-395	156, 427
	R: CTGCACAAGCACTGGAAGG		
Cpur8	F: TTCTCCCGCCGTATAACCG	302-317	97, 136
	R: GTTCGCGATCTGACGTTCC		
Cpur12	F: CGGAGCAAATGTTCGTCCC	413-433	107, 247, 364, 371

	R: AGTACATCGGCCTGGAACC		
	F: GACACCCATTGGCAACCAG		
Cpur20	R: TCAGAGGCGCAGTATCGAC	318-321	203, 353, 502
	F: TGCCTTGCCTTCTTTCAGC		
Cpur23	R: GGCAACTTGGCAGAAGACC	350-365	151, 228, 341
	F: GGTCGTCTATGGCGTGGAG		
Cpur26	R: CTCCGAATCAATCCCGTGC	411-426	92, 301, 421
	F: CCACCGGGCATTGTTGAAG		
Cpur30	R: CATGTCTCAAGGCGGCAAG	225-305	166, 247, 396, 417
	F: ACTTGACGGCTGGGTATGG		
Cpur41	R: GCTGTTTCCAAGACGGCAG	431-454	220, 254, 379, 500
	F: TGAGTCGTGACCCAACCAG		
Cpur43	R: TCACCCGTAAGTGTGCTCC	250-280	122, 258, 510
	F: TCCATCCGACAACGAGCTG		
Cpur48	R: GGTATGCCGGAGGGTATGG	431-442	252, 358, 510
	F: AGGTTGGACTTGGTAGGCG		
Cpur58	R: GCTTCAGTACAGCATGGGC	437-458	106, 205, 319
	F: TTGTTAACGTCGCGAAGGC		
Cpur68	R: AAGTTGGCGTTGAATGGGC	97, 255-263	98, 146, 175, 240
	F: ATTCCTCGCCCTCTTTGGG		
Cpur69	R: CGTCAACTTCGCCGATTCC	104, 427-436	159, 176, 325
	F: CCCTCACGGTACGAGATCC		
Cpur177	R: CTGCCATCATCAAAGCCC	465-475	261, 317, 475

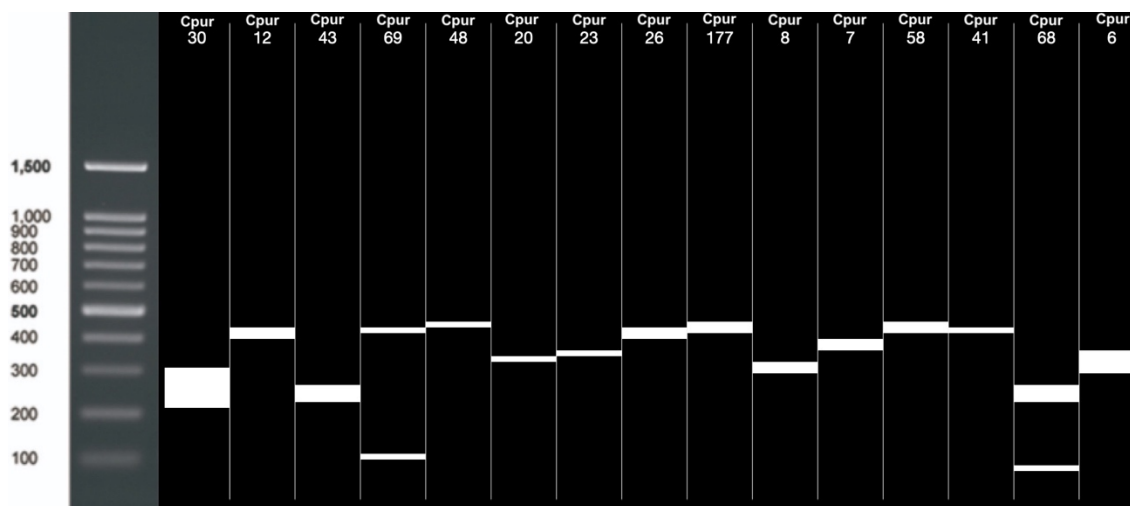


Figura 11: Bandas de amplificación de microsatélites esperadas con *primers* (Cpur30, 12, 43, 69, 48, 20, 23, 26, 177, 8, 7, 58, 41, 68 y 6, respectivamente), según lo descrito por Gilmore *et al.* (2016).

Dados estos resultados, se probó un nuevo protocolo de amplificación, basado en el *tag* M13, descrito por Schuelke (2000). Para este nuevo protocolo, se mantuvieron las condiciones de mezcla de reacción, y se varió el ciclado. Sin embargo, las amplificaciones continuaron sin arrojar los resultados esperados.

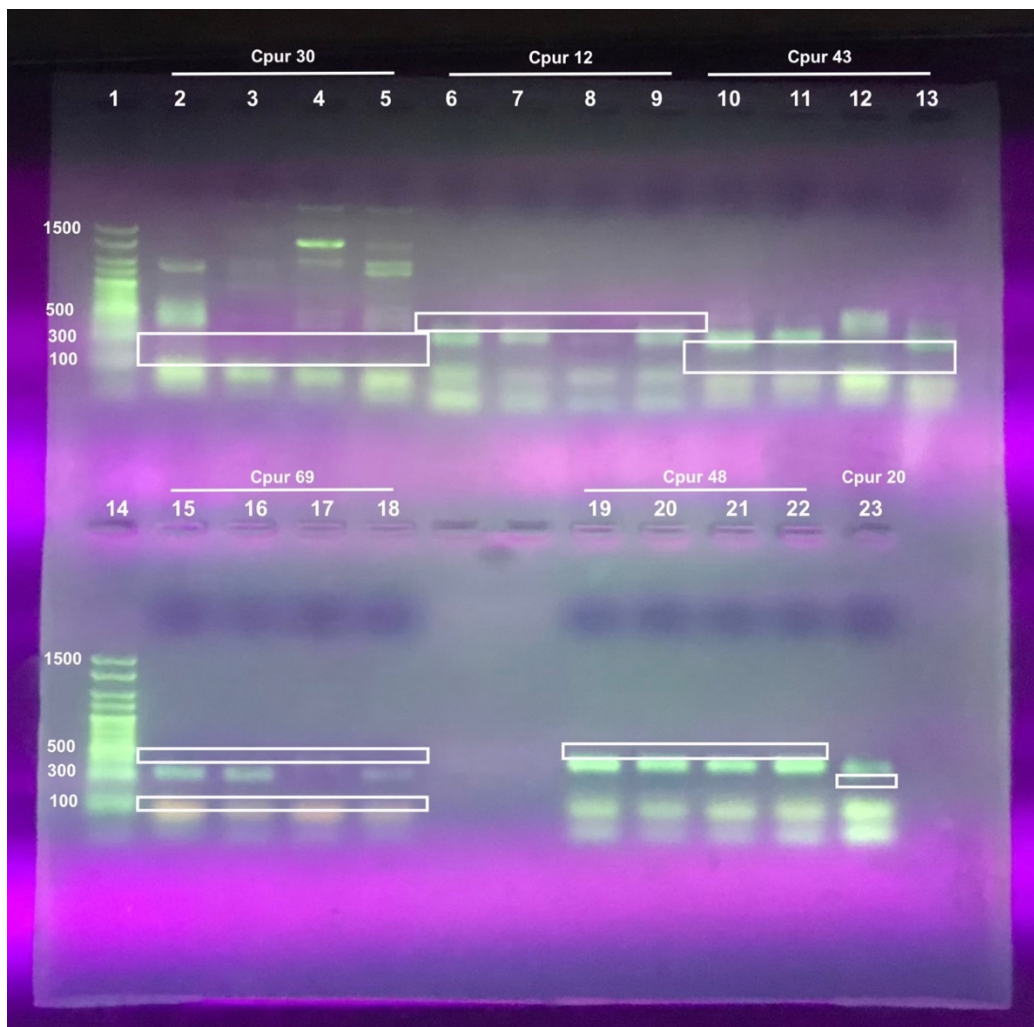


Figura 12: Amplificación de microsátélites utilizando las condiciones de reacción (*mix*) y ciclado descrito por Gilmore *et al* (2016). Carriles: 1: Marcador de peso molecular; 2-5: Cpur30 U73, 79, 68, 80; 6-9: Cpur12 U73, 79, 68, 80; 10-13: Cpur43 U73, 79, 68, 80; 14- Marcador de peso molecular; 15-18: Cpur69 U73, 79, 68, 80; 19-22: Cpur48 U73, 79, 68, 80; 19: Cpur20 U73. Se delimita zona donde se esperaría observar amplificación, según lo descrito por el autor.

Se analizó entonces, la posibilidad de que los resultados fueran consecuencia de un mal diseño de *mix*, y se procedió a realizar las amplificaciones nuevamente, utilizando el *Mastermix MyFi™ 2X* (Meridian Bioscience, Ohio, Estados Unidos), y el ciclado descrito por Gilmore *et al.* (2016). Para estas amplificaciones, se utilizaron aislamientos realizados a partir de diferentes especies de *Paspalum*, basado en la posibilidad de que las secuencias fueran variables entre especies. En estas condiciones, se observó una amplificación concordante entre muestras, de esta forma se podría descartar la posibilidad de que las complicaciones hayan sido causa de una amplificación diferencial entre aislados de distintos huéspedes. Sin embargo, los resultados son ampliamente inespecíficos, y en su gran mayoría no coinciden con lo descrito por el autor (Figura 13). Por lo tanto los resultados obtenidos previamente por Gilmore *et al.* (2016) no pudieron ser corroborados.

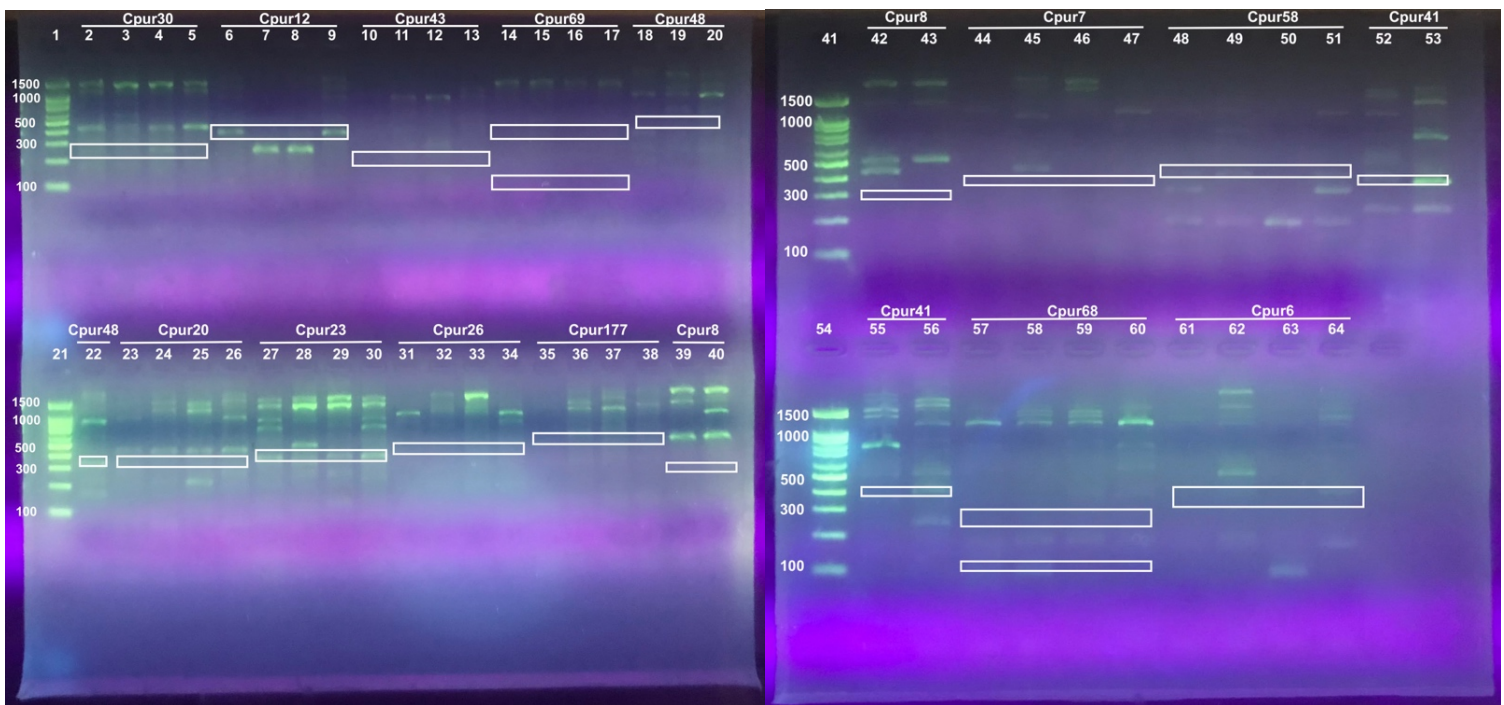


Figura 13: Amplificación de microsatélites utilizando *Mastermix MyFy*TM y ciclado descrito por Gilmore *et al.* (2016). Carriles: 1: Marcador de peso molecular; 2-5: Cpur30 U29, 72, 85, 102; 6-9: Cpur12 U29, 72, 85, 102, 10-13: Cpur43 U29, 72, 85, 102; 14-17: Cpur69 U29, 72, 85, 102; 18-20: Cpur48 U29, 72, 85; 21- Marcador de peso molecular; 22- Cpur48 U102; 23-26: Cpur20 U29, 72, 85, 102; 27-30: Cpur23 U29, 72, 85, 102; 31-34: Cpur26 U29, 72, 85, 102; 35-38: Cpur177 U29, 72, 85, 102; 39-40: Cpur8 U29, 72; 41: Marcador de peso molecular; 42-43: Cpur8 U8, 102; 44-47: Cpur7 U29, 72, 85, 102; 48-51: Cpur58 U29, 72, 85, 102; 52-53 Cpur41 U29, 72; 54: Marcador de peso molecular; 55-56: Cpur41 U85, 102; 57-60: Cpur6 U29, 72, 85, 102. Se señalan las zonas donde se esperaba observar amplificación según lo descrito por Gilmore *et al.* (2016).

Un punto a tener en cuenta es que ningún análisis de filogenia fue realizado con el aislado de *C. paspali* utilizado por Gilmore *et al.* (2016) para confirmar su especie. Aunque el autor especifica haber recibido el aislado por donación del Dr. Paul W. Tooley (USDA-ARS), quien lo realizó para un estudio previo⁸, no se conocen resultados que validen que se trate de *C. paspali* en ese trabajo. En los ensayos realizados con muestras de *C. paspali* de nuestro país, no fue posible lograr amplificación. De esta forma, se pone en duda que el aislado utilizado para el ensayo de Gilmore *et al.* (2016) sea efectivamente *C. paspali*, aunque el autor afirme estar trabajando con la especie. Al ser tan discordantes las amplificaciones de microsatélites en los aislados obtenidos para este

análisis, con los obtenidos por Gilmore *et al.* (2016) en el suyo, se plantea la posibilidad de que el aislado que se utilizó en el estudio mencionado haya sufrido alguna alteración y no se trate de la misma especie de *Claviceps*. Esta suposición se basa en la alta repetibilidad que tienen los ensayos con microsatélites, y su alta variación entre especies, que hace que resulte llamativa la discordancia entre amplificaciones.

Aunque el protocolo descrito por Gilmore *et al.* (2016) no haya podido ser reproducido en los aislados de *C. paspali* obtenidos en este estudio, se podrían plantear posibilidades para lograr la descripción de un nuevo protocolo. Basándose en la descripción del diseño de *primers* realizado por el autor, se podría realizar una búsqueda en MSATCOMMANDER utilizando como referencia el genoma de *C. paspali* del aislado ILB342⁴⁰, utilizado en este ensayo. Se plantea utilizar su secuencia para la búsqueda de nuevos microsatélites, o la confirmación de la presencia de aquellos descritos por Gilmore *et al.* (2016).

4.3. Estudio fenotípico *in vitro* de aislados de *Claviceps paspali*

4.3.1. Crecimiento diametral de micelio

Para el estudio fenotípico, se decidió analizar una población representativa de los aislados de *C. paspali* según los resultados obtenidos en estudios filogenéticos. Por ese motivo se decidió estudiar la totalidad de los aislados obtenidos de *P. plicatulum*, por la diferenciación observada, y 4 aislados obtenidos de *P. dilatatum*, 3 obtenidos de *P. notatum* y *P. urvillei*, y 2 de *P. malacophyllum*.

Tabla 4: Tasa de crecimiento de los aislados de *C. paspali* en medios de cultivo PDA, MC y T2, y su desvío estándar. Todos los datos están expresados en milímetros por día.

Aislado	PDA	MC	T2
----------------	------------	-----------	-----------

	Tasa de crecimiento diario (mm/día)	Desvío estándar	Tasa de crecimiento diario (mm/día)	Desvío estándar	Tasa de crecimiento diario (mm/día)	Desvío estándar
U29	1,43	0,32	1,60	0,65	1,18	0,18
U30	0,23	0,18	0,64	0,16	0,35	0,46
U31	3,30	1,20	3,22	0,20	1,76	0,27
U59	0,43	0,05	0,54	0,06	0,33	0,13
U69	1,71	0,48	1,81	0,18	0,89	0,28
U70	1,45	0,03	1,04	0,15	1,59	0,29
U71	1,06	0,34	0,80	0,63	0,63	0,28
U72	1,80	0,28	0,26	0,13	0,75	0,44
U73	1,10	0,12	1,04	0,43	1,12	0,24
U74	2,29	0,36	3,04	0,41	2,00	0,42
U75	0,73	0,09	0,39	0,08	0,93	0,08
U77	2,09	0,62	1,25	0,16	0,64	0,44
U79	1,83	0,09	0,71	0,12	0,60	0,36
U80	0,99	0,10	0,77	0,35	1,81	0,27
U85	1,41	0,48	1,43	0,47	1,87	0,25
U90	1,51	0,12	0,61	0,46	0,75	0,24
U91	2,20	0,28	0,61	0,57	1,42	0,25
U93	1,11	0,14	0,71	0,17	1,77	0,21
U94	0,85	0,35	0,64	0,23	0,19	0,11
U95	1,45	0,35	2,58	0,65	1,08	1,19
U96	0,79	0,34	2,58	0,10	0,41	0,29
U97	1,11	0,42	1,38	0,17	2,88	0,28
U98	0,29	0,30	0,54	0,12	0,22	0,09
U99	1,85	0,42	2,17	0,24	1,82	0,44
U100	0,53	0,23	0,15	0,09	0,28	0,26

Se obtuvieron medidas por triplicado de cada placa a los días 0 y 7 de incubación (Anexo 6). Los resultados mostraron que, aunque algunos aislados mostraron llamativo crecimiento en un medio por sobre los demás (Tabla 4; U74, 95, 97; Anexo 7), la gran mayoría tuvo un crecimiento similar en todos los medios utilizados, no observando preferencia por ningún medio de cultivo en particular. Se realizó un análisis de variación (*two-way* ANOVA) utilizando el software *Graphpad Prism 9* (Graphpad Software, California, Estados Unidos) que confirmó que la variabilidad de crecimiento entre medios para cada aislado no es significativa ($P > 0,01$). Sin embargo, la variación de crecimiento entre aislados en los mismos medios si lo fue ($P < 0,01$) (Anexo 8). En PDA el promedio de crecimiento total fue $9,86 \pm 4,96$ mm, el máximo fue 23,12 mm (U31), y el mínimo fue 1,63 mm (U30). En MC el promedio fue $5,6 \pm 6,15$ mm, siendo el máximo 22,55 mm (U31) y el mínimo 1,08 mm (U100), y en T2 $6,49 \pm 4,9$ mm, con máximo 20,14 mm (U97) y mínimo 1,36 mm (U94). En algunos casos se vio mínimo crecimiento (Tabla 4; U30, 59, 98, 100) lo que resulta llamativo ya que las condiciones fueron idénticas para todos los aislados.

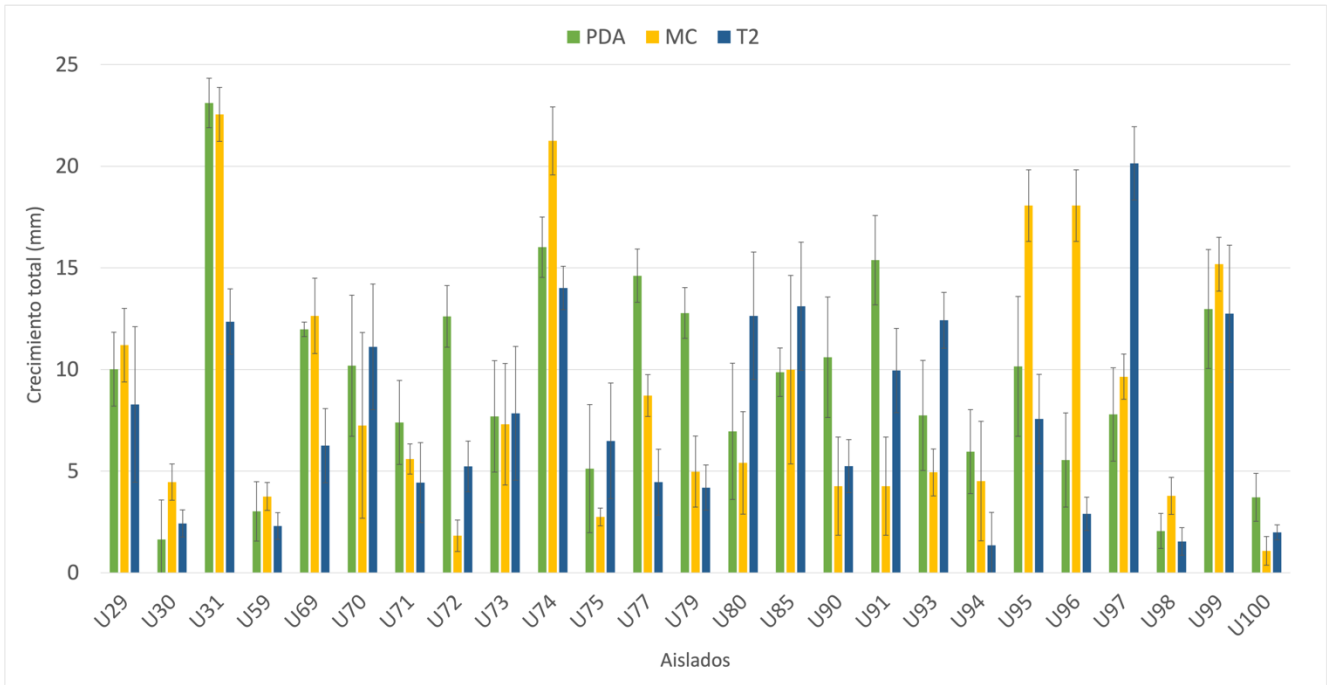


Figura 14: Comparación de crecimiento diametral total (milímetros) en distintos medios de cultivo, para cada aislado de *C. paspali* utilizado, luego de 7 días de incubación a 27°C.

En cuanto a crecimientos máximos, se observó muy ligeramente que mayor cantidad de aislados mostraron su mejor tasa de crecimiento en PDA (Figura 15).

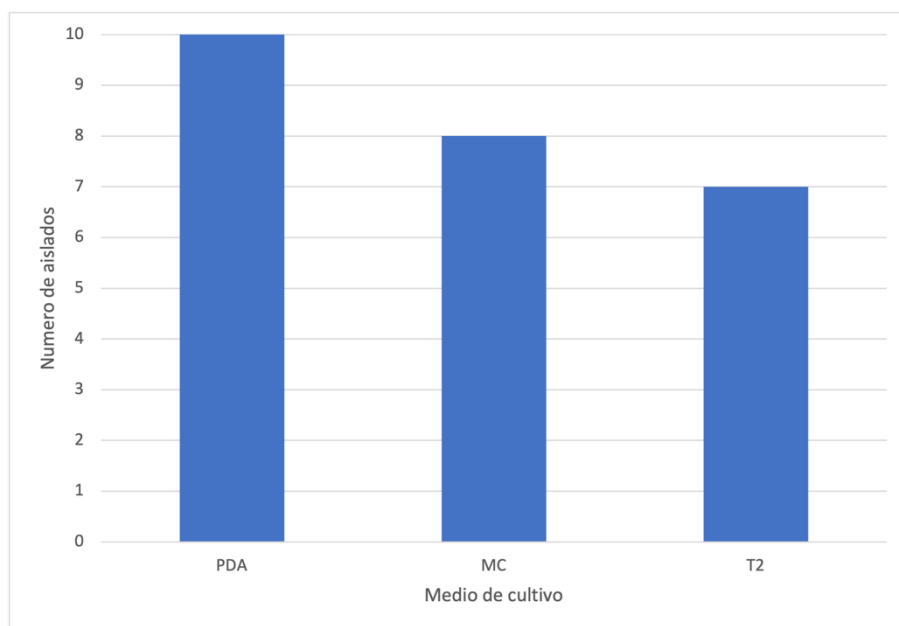


Figura 15: Cantidad de aislados de *C. paspali* según el medio en el que mostraron mayor crecimiento diametral.

Se observaron variaciones muy amplias en la tasa de crecimiento diario dentro de los distintos medios, variando entre 3,3-0,23 mm/día en PDA, 3,22-0,15 mm/día en MC y 2,88-0,19 mm/día en T2 (Figura 16). El promedio de crecimiento diario en PDA fue de 1,34 mm/día, en PDA 1,22 mm/día y en T2 1,09 mm/día. En comparación con los resultados obtenidos por Tsukiboshi *et al.* (1999), Muthusubramanian *et al.*, (2006) e Irzykowska *et al.* (2012), se podría decir que el crecimiento diario de *C. paspali* en PDA a 27°C iguala el crecimiento de *C. purpurea* en PDA a 20°C, siendo la mayor tasa de crecimiento descrita hasta el momento para un aislado de *Claviceps*. Además, el crecimiento de *C. paspali* en cualquiera de los tres medios supera ampliamente el descrito para *C. africana*⁷, *C. sorghicola* (1 mm/día, PDA 25°C) y *C. sorghi* (<0,1 mm/día, T2 25°C)⁸.

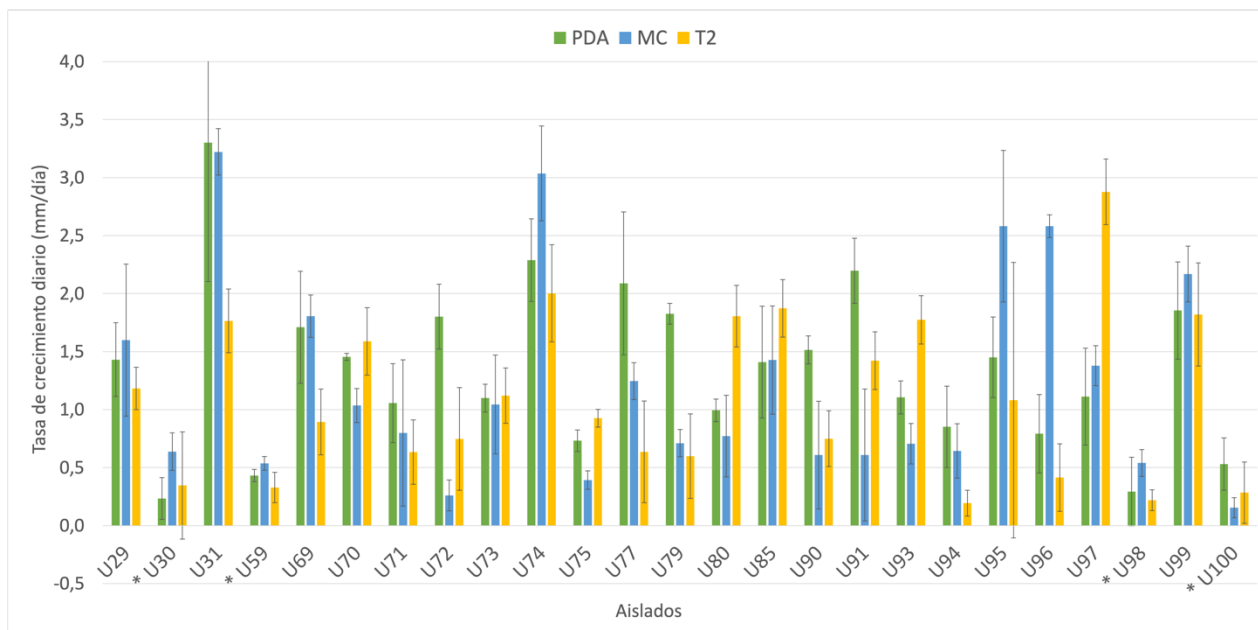


Figura 16: Tasa de crecimiento diario de aislados de *C. paspali* observada en medios de cultivo PDA, MC y T2, a 27°C.

Se pudo confirmar que los medios MC, PDA y T2 son aptos para el crecimiento *in vitro* de aislados, mostrando variación de crecimiento no significativa del mismo aislado en distintos medios ($P > 0,01$). Esto indicaría que tanto la sacarosa (T2), la dextrosa (PDA) o la combinación de ambas (MC) funcionan como fuente de carbono para el crecimiento de *C. paspali*. PDA, además de ser el medio de cultivo en el que mayor cantidad de aislados mostraron su mayor tasa de crecimiento, mostró ser el que exhibió mayor crecimiento total (U31).

La variabilidad significativa entre aislados para el mismo medio de cultivo podría indicar que diferentes aislados puedan tener requerimientos de crecimiento variados, ya sea por temperatura, condiciones o tiempo de aislamiento. Los aislados U59 (obtenido a partir de *P. urvillei*), U98, y U100 (obtenidos a partir de *P. plicatulum*) (* Figura 14) mostraron mínimo crecimiento en todos los medios, encontrándose siempre entre los 5 aislados con menor crecimiento. Por otro lado, U74

(aislado de *P. notatum*) y U99 (aislado de *P. plicatulum*) (** Figura 14) en todos los medios se encontraron entre los 5 con mayor crecimiento.

Tabla 5: Promedio de crecimiento diario total, considerando todos los medios de cultivo y todos los aislados de *C. paspali*, según hospedero.

Hospedero	Aislado	Medio de cultivo			Promedio crecimiento diario (mm/día)
		PDA	MC	T2	
<i>P. Plicatulum</i>	U30	0,23	0,64	0,35	0,98
	U71	1,06	0,80	0,63	
	U72	1,80	0,26	0,75	
	U73	1,10	1,04	1,12	
	U77	2,09	1,25	0,64	
	U79	1,83	0,71	0,60	
	U90	1,51	0,61	0,75	
	U94	0,85	0,64	0,19	
	U95	1,45	2,58	1,08	
	U96	0,79	2,58	0,41	
	U98	0,29	0,54	0,22	
<i>P. Dilatatatum</i>	U99	1,85	2,17	1,82	1,64
	U100	0,53	0,15	0,28	
	U31	3,30	3,22	1,76	
	U80	0,99	0,77	1,81	
	U93	1,11	0,71	1,77	
<i>P. Urvillei</i>	U29	1,43	1,60	1,18	1,03
	U59	0,43	0,54	0,89	
	U75	0,73	0,39	0,93	
<i>P. Malacophyllum</i>	U97	1,11	1,38	2,88	1,41
	U69	1,71	1,81	0,89	
<i>P. Notatum</i>	U70	1,45	1,04	1,59	1,81
	U74	2,29	3,04	2,00	
	U91	2,20	0,61	1,42	

U85	1,41	1,43	1,87
-----	------	------	------

Según los resultados obtenidos, y lo propuesto por Tsukiboshi *et al.* (1999), Muthusubramanian *et al.*, (2006) e Irzykowska *et al.* (2012), se podría hipotetizar que la temperatura óptima de aquellos aislados que mostraron menor crecimiento fuera menor a la utilizada. Se observa un promedio de crecimiento diario menor en los aislados obtenidos de *P. plicatum* (0,98 mm/día) y *P. urvillei* (1,03 mm/día), frente a los obtenidos de *P. dilatatum* (1,64 mm/día), *P. notatum* (1,81 mm/día) y *P. malacophyllum* (1,41 mm/día). Esto podría indicar que los aislados de estas especies se verían beneficiados de una temperatura de incubación menor, pudiendo lograr mayor crecimiento.

4.3.2. Esporulación *in vitro*

Culminado el estudio de crecimiento, los aislados fueron conservados en heladera, y pasados los días se comenzó a observar como -particularmente en medio PDA- múltiples aislados presentaban gotas de líquido en su superficie (Figura 12). Por este motivo, se seleccionó este medio para estudiar esporulación *in vitro*, y poder evaluar si la secreción se trataba de mielecilla.

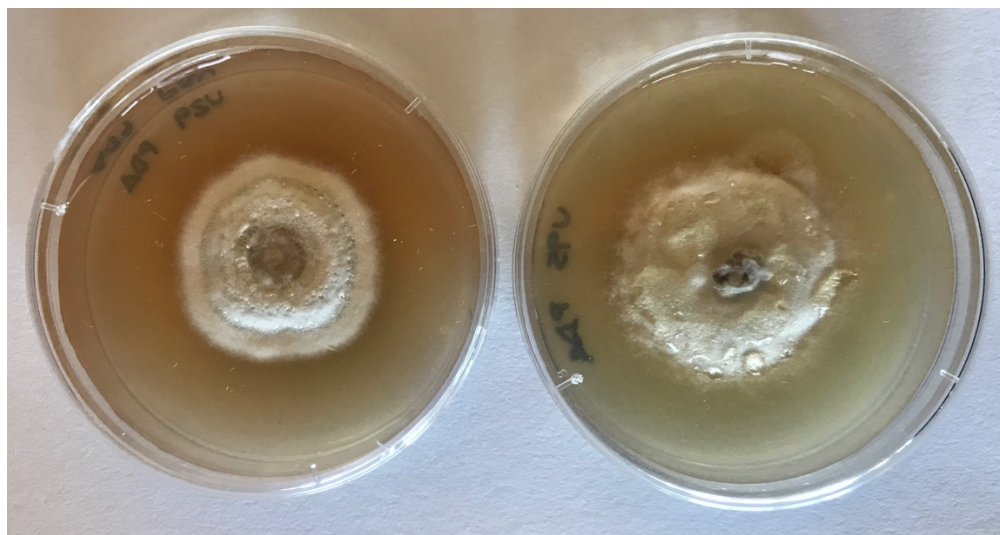


Figura 17: Aislados de *C. paspali* (U29, U95, de izquierda a derecha) exhibiendo secreción en la superficie del micelio.

Se observó la secreción en cámara de Neubauer, y se confirmó que en 4 de 9 casos contenía esporas (Figura 18), pero al no haber observado esporas en todos los aislados con secreción, no se podría confirmar que en todos los casos se tratara de mielecilla. Por ese motivo, se decidió también estudiar aquellas placas que no mostraron secreción, para evaluar si la esporulación podía ser independiente a la presencia de líquido. En esos casos, se agregó agua estéril a la placa, se raspó levemente la superficie del micelio y se observó en cámara de Neubauer. Se pudo apreciar que de 13 aislados sin secreción, 8 presentaban esporulación. Se calculó la concentración de esporas para cada placa en todos los aislados donde se observó esporulación (Tabla 6).

Tabla 6: Concentración de esporas (cel/ml) de aislados de *C. paspali* que mostraron esporulación *in vitro* en medio PDA.

Huésped	Aislado	Concentración (cel/ml)			Días de aislado
		Placa 1	Placa 2	Placa 3	
<i>P. plicatulum</i>	U73	5,25E+05	1,50E+07	-	39
	U79	2,14E+06	2,23E+05	1,38E+06	46
	U90	3,99E+06	9,16E+06	3,25E+06	46
	U94	1,38E+07	1,30E+06	5,50E+05	39
	U95	6,25E+05	8,17E+06	-	46
	U96	7,10E+05	-	-	46
	U98	9,50E+05	-	-	25
	U100	9,50E+05	-	-	25
<i>P. dilatatum</i>	U93	1,04E+06	5,00E+04	-	46
<i>P. urvillei</i>	U97	2,03E+05	2,89E+05	-	46
<i>P. malacophyllum</i>	U69	3,35E+06	6,89E+06	-	46
	U70	1,80E+06	1,60E+05	-	39

De los 12 aislados que presentaron esporulación, 9 no presentaron concordancia en las tres repeticiones con las que se realizó el estudio. Esto, sumado a la falta de esporulación en placas que presentaron líquido sobre el micelio, presentaría la posibilidad de que no en todos los casos se tratara de mielecilla, sino de condensación debido al cambio de temperatura. Por este motivo, no se tomaría en cuenta la presencia de líquido en la superficie del micelio como síntoma de esporulación *in vitro*.

De la totalidad de aislados realizados a partir de distintas especies de *Paspalum spp.*, *P. notatum* fue el único huésped en el que ninguno de los aislados estudiados mostró esporulación. En cuanto al resto de los huéspedes, es difícil realizar comparación en porcentaje de aislados con

esporulación, dado que no se estudió la misma cantidad para cada caso, resultando en observaciones condicionadas.

De las especies utilizadas aisladas por Oberti *et al.* (2020) que mostraron esporulación *in vitro* en medio MC, ninguna mostró esporulación en medio PDA. Esto podría deberse tanto al medio de cultivo, como a las condiciones en las cuales esporulan.

Al igual que lo hizo Muthusubramanian *et al.*, (2006) se intentó agrupar los aislados según las diferencias observadas. Unificando los resultados de filogenia obtenidos previamente, no se podría decir que las características de esporulación estén relacionadas con una posible separación de subespecies, ya que ambos grupos mostraron porcentaje de esporulación similar. Aquellos aislados agrupados con ILB374 y 375 mostraron un 44% de esporulación, mientras que aquellos agrupados con ILB388, 56%.

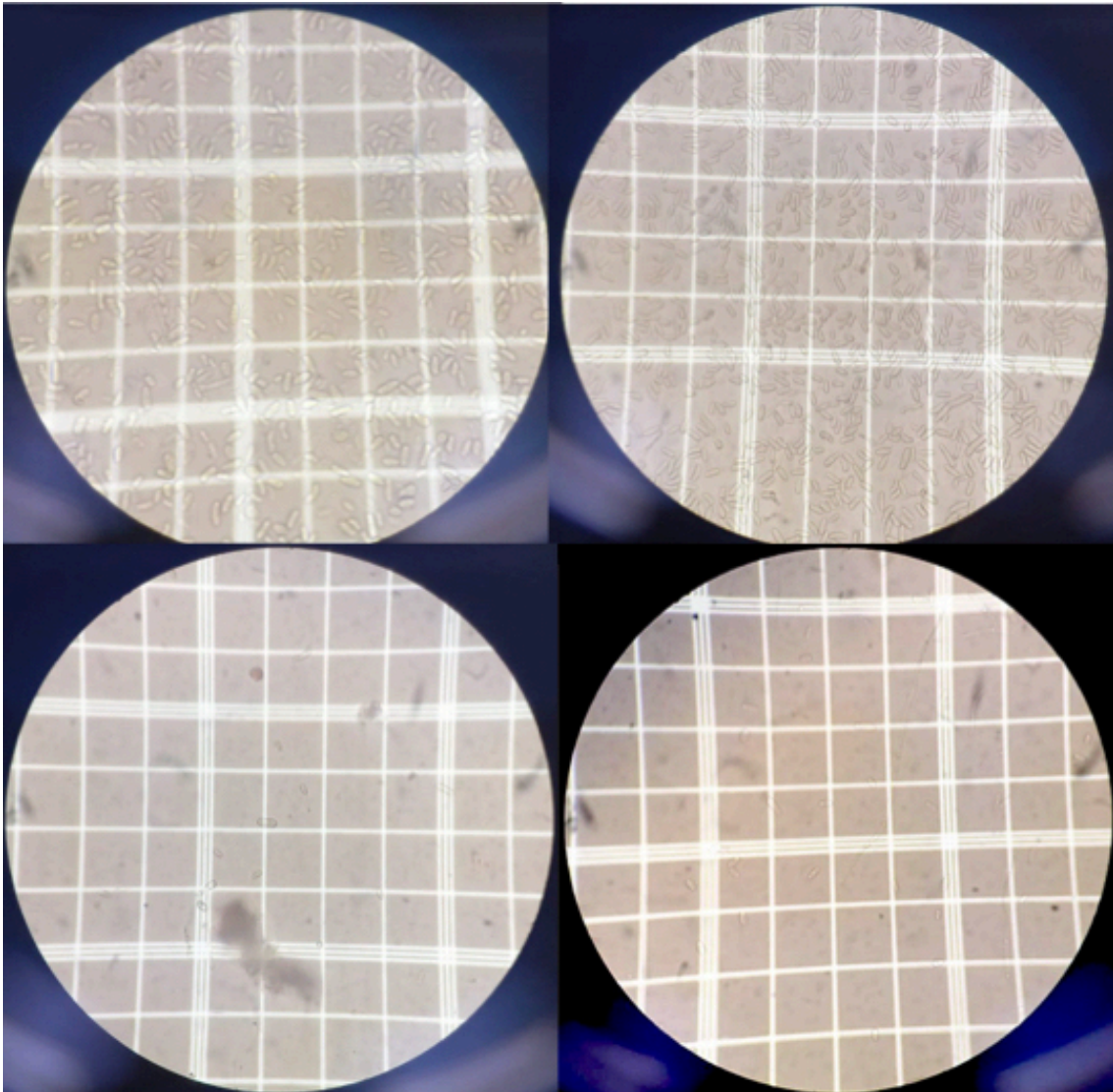


Figura 18: Esporas obtenidas a partir de aislados de *C. paspali* (U69, U100, U97, U93 -de izquierda a derecha, de arriba hacia abajo-) observadas en cámara de Neubauer en microscopio 10X.

Se podría plantear la posibilidad de que el desencadenamiento de esporulación se haya dado por estrés, por haber sometido los aislados a un *shock* de temperatura. Sin embargo, Muthusubramanian *et al.*, (2006) logró la esporulación de *C. sorghi* en medio T2 luego de ser incubado a 25°C por 30 días, condiciones completamente diferentes a las utilizadas en este estudio. Además, estas condiciones no coinciden con aquellas necesarias para generar esporulación *in vivo*

en *C. paspali*, donde el inicio del proceso se da con temperaturas templadas y aumentada humedad⁵. No se han realizados estudios que involucren esporulación *in vitro* en aislados de micelio de *C. paspali* a partir de escleroto, generando dificultad en la descripción del significado de los resultados obtenidos.

Los aislados no se realizaron todos al mismo tiempo, pero todos siguieron el mismo protocolo; 7 días a 30°C, conservación posterior en heladera de entre 11-39 días. Al ser variable el tiempo a 4°C, no se podría afirmar que todos hayan esporulado a la misma vez. En la Tabla 6 se puede observar que el rango de días de incubación de los aislados que mostraron esporulación varía entre 25-46 días, entre el tiempo en estufa y heladera. Sin embargo, del total de los aislados, algunos de los que estuvieron mayor cantidad de días en heladera (46 días de aislamiento total) no mostraron esporulación *in vitro* (Anexo 9). Esto podría dar la información de que, de ser desencadenado por estrés, el tiempo de *shock* térmico no se correlaciona con la esporulación.

Por todos los resultados descritos, se entiende que es necesario un estudio en profundidad acerca de la esporulación *in vitro* para poder realizar afirmaciones certeras. Sería interesante realizar controles tanto sin variación de temperatura, como con variaciones a distintas temperaturas, por distintos tiempos, para poder lograr un registro del tiempo en el que comienza la esporulación en cada condición.

4.3.3. Morfología

No se encontró correspondencia de morfología *in vitro* entre aislados obtenidos de las mismas especies de *Paspalum*, incluso muchas veces el mismo aislado presentó morfologías completamente distintas al variar el medio de cultivo (Figura 19).

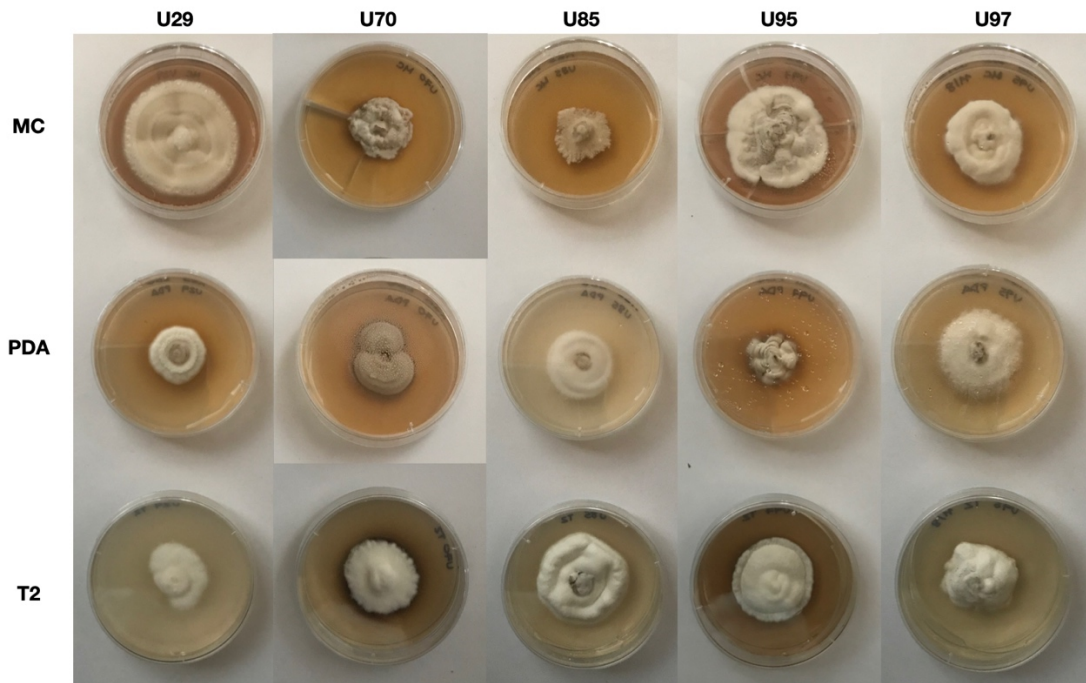


Figura 19: Aislados de *C. paspali* mostrando distintas morfologías en medios de cultivo MC, PDA y T2.

De los 75 aislados totales, 64 mostraron colonias compactas, y 11 algodonosas (Anexo 11). La textura y forma del aislado fue muy variable, resultando poco informativa. La gran mayoría (32) de los aislados presentaron textura rugosa, pero se vio una gran variabilidad incluyendo colonias umbonadas (forma de sombrero), plegadas, lisas y crateriformes (Anexo 11).

En cuanto a la coloración -descrita utilizando los códigos de la tabla de Munsell- los aislados mostraron gran variabilidad (Tabla 3). No solamente varió el pigmento de micelio entre aislados, sino también en el mismo aislado en diferentes medios tanto anverso como reverso (Figura 20). Para MC, el color de micelio varió entre blanco, rosa y marrón claro, y en PDA y T2 entre blanco, gris claro y rosa (Anexo 10). En general, los colores tendieron a ser cercanos al blanco.

Tabla 7: Descripción de color de micelio en anverso y reverso de aislados de *C. paspali* en medios PDA, MC y T2, según el código de colores de la tabla de Munsell ³⁶.

Huésped	Aislado	Color de micelio
---------	---------	------------------

		PDA		MC		T2	
		Anverso	Reverso	Anverso	Reverso	Anverso	Reverso
<i>P. Picatatum</i>	U30	8/1 7.5YR	2.5/4 2.5YR	7/2 10YR	2.5/3 2.5YR	8/1 7.5YR	2.5/2 7.5YR
	U71	8/1 7.5YR	2.5/3 7.5YR	8/1 5YR	3/6 10YR	8/1 5YR	5/3 7.5YR
	U72	71 7.5YR	4/6 7.5YR	8/2 7.5 YR	4/6 7.5YR	8/1 7.5 YR	2.5/2 7.5YR
	U73	8/2 10YR	4/6 7.5YR	8/1 7.5YR	3/3 7.5YR	8/1 5YR	4/4 10YR
	U77	8/2 7.5 YR	5/8 7.5YR	8/2 10YR	4/6 7.5YR	8/1 10YR	4/4 10YR
	U79	8/2 7.5 YR	4/4 10YR	8/2 10YR	3/4 7.5YR	8/1 10YR	3/3 10YR
	U90	8/2 10YR	3/6 10YR	8/1 10YR	3/4 7.5YR	7/2 10YR	3/2 2.5Y
	U94	8/2 10YR	2.5/3 7.5YR	8/2 7.5YR	3/4 7.5YR	8/1 7.5YR	2/2 10YR
	U95	8/1 7.5YR	3/6 10YR	8/2 7.5 YR	2.5/3 7.5YR	8/1 10YR	3/3 10YR
	U96	8/2 7.5 YR	3/4 10YR	8/2 10YR	2.5/3 7.5YR	8/1 7.5YR	3/3 10YR
	U98	8/2 7.5YR	3/4 10YR	8/2 7.5 YR	3/6 10YR	8/1 10YR	2/2 10YR
	U99	8/2 7.5YR	2.5/3 7.5YR	8/2 10YR	3/6 10YR	8/1 10YR	5/4 10YR
U100	8/3 10YR	3/2 7.5YR	8/1 7.5YR	3/4 7.5YR	8/1 10YR	3/3 10YR	
<i>P. Dilatatum</i>	U31	8/2 7.5 YR	5/6 7.5YR	7/3 10YR	3/4 5YR	7/2 10YR	4/4 10YR
	U80	6/3 7.5YR	2.5/3 7.5YR	7/2 10YR	2.5/3 7.5YR	8/1 10YR	2/2 10YR
	U93	8/2 7.5 YR	2.5/3 7.5YR	8/2 10YR	2.5/3 7.5YR	8/1 10YR	2.5/2 7.5YR
	U29	7/2 10YR	2.5/3 2.5YR	8/1 7.5YR	2.5/4 2.5YR	8/1 7.5YR	2.5/2 7.5YR
<i>P. Urvillei</i>	U59	7/3 7.5YR	3/3 7.5YR	6/4 7.5YR	2/2 10YR	8/1 5YR	2/1 10YR
	U75	7/3 7.5YR	2.5/2 7.5YR	6/4 7.5YR	2.5/2 5YR	8/1 10YR	3/3 10YR

<i>P. Malacophyllum</i>	U97	7/3 7.5YR	2.5/3 7.5YR	6/3 7.5YR	2.5/3 7.5YR	7/1 7.5YR	2/1 10YR
	U69	7/3 10YR	2/2 10YR	5/4 10YR	2/2 10YR	7/3 10YR	2/1 10YR
	U70	6/4 7.5YR	2/2 10YR	7/2 7.5YR	3/4 10YR	8/1 7.5YR	3/6 10YR
<i>P. Notatum</i>	U74	7/3 10YR	3/4 7.5YR	7/2 10YR	2.5/3 7.5YR	8/1 10YR	4/3 10YR
	U91	8/2 7.5 YR	4/4 10YR	8/2 7.5YR	4/6 7.5YR	6/3 7.5YR	2/2 10YR
	U85	7/3 10YR	3/4 5YR	7/3 7.5YR	4/4 10YR	8/1 7.5YR	3/3 10YR

El color del revés de los aislados mostro también gran variabilidad de pigmentación, tendiendo más a los marrones rojizos oscuros en MC y a marrón amarillento oscuro y negro en T2 y PDA (Figura 20, Anexo 4). El color del revés se pudo relacionar en gran medida con el medio de cultivo, por lo que no sería característico de los aislados.

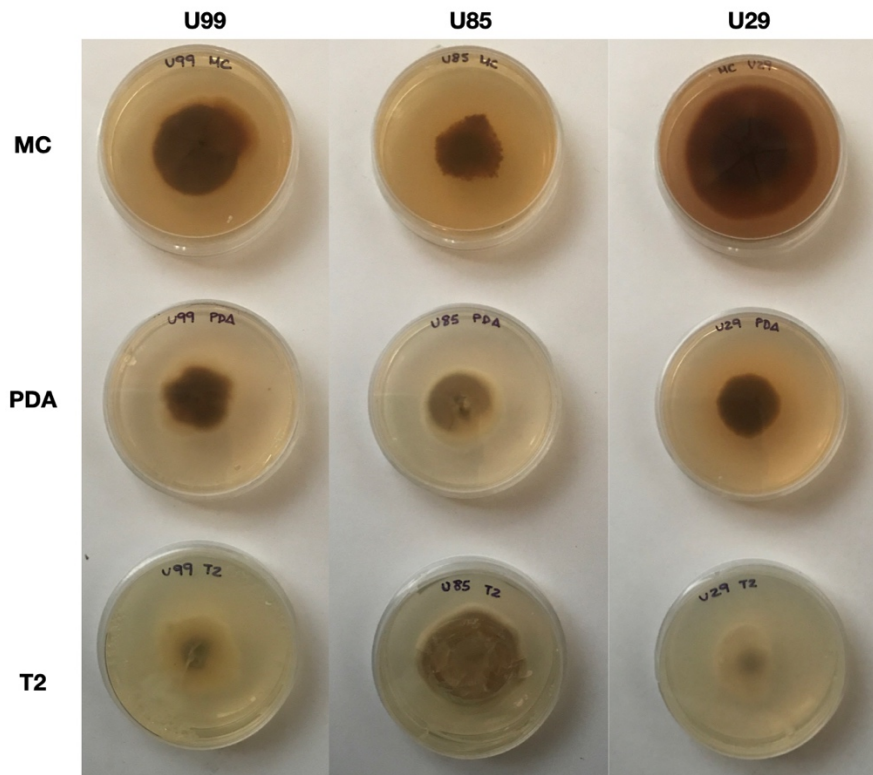


Figura 20: Diferencia de color observada en el revés de aislados de *C. paspali* (de izquierda a derecha; U99, U85 y U29) en medios de cultivo MC, PDA y T2 (de arriba hacia abajo). Pigmentos correspondientes a los códigos de Munsell 2.5/3 7.5YR, 3/6 10YR, 5/4 10YR, 4/4 10YR, 3/4 5YR, 3/3 10YR, 2.5/3 7.5YR, 2.5/3 7.5YR, 7/3 10YR (de arriba hacia abajo, de izquierda a derecha).

Al igual que en el estudio de esporulación, no se logró realizar agrupaciones de aislados según sus características morfológicas. Sin embargo, las formas y colores descritos son coincidentes tanto con las descripciones de *C. africana* como de *C. sorghi* realizadas por Muthusubramanian *et al.*, (2006).

5. Conclusiones

En este trabajo se logró contribuir por primera vez a la descripción molecular y fenotípica de *C. paspali*, aportando al conocimiento público sobre la especie y proveyendo información relevante a futuros investigadores del área.

Se agregó al Banco de germoplasma de INIA Las Brujas una colección de aislados de *C. paspali* obtenidos de hospederos presentes en el país, con secuenciación de genes de interés y descripción morfológica *in vitro* completa.. Entre estos aislados se encuentran dos realizados a partir de infección en *P. malacophyllum*, especie considerada inmune/resistente a la infección por *Claviceps*. Esta información significa una valiosa adición para ensayos de patogenicidad en planes de mejoramiento de *Paspalum*.

Se confirmó que *C. paspali* es el causante de infección en *P. dilatatum* y *P. plicatulum*, *P. urvillei*, *P. notatum* y *P. malacophyllum*.

Se establecieron las bases para verificar la subespeciación de aislados provenientes de *P. plicatulum* planteada por Oberti *et al.* (2020), observando elementos coincidentes con una diferenciación en todos los aislados. Además, se sumó evidencia involucrando tres aislados provenientes de *P. notatum*.

La técnica basada en microsatélites multialélicos planteada por Gilmore *et al.* (2016) para la caracterización molecular entre especies de *C. paspali* presenta limitaciones en cuanto a repetibilidad. Se especula que con la información genómica nacional existente es posible generar marcadores microsatélites para la caracterización molecular de aislamientos de *C. paspali*.

Se realizó una descripción morfológica detallada de 25 aislados de *C. paspali*, obtenidos de 5 especies de *Paspalum* (*P. plicatulum*, *P. dilatatum*, *P. notatum*, *P. urvillei*, *P. malacophyllum*). Las colonias *in vitro* mostraron morfologías variadas, principalmente rugosas y circulares, con colores de micelio en la gama de blanco/beige/gris/rosa y crecimientos variados en donde el medio de cultivo no tuvo un efecto significativo. Se detectaron aislados con esporulación *in vitro* que pueden ser de utilizados para futuras pruebas de patogenicidad en *Paspalum spp.* No se encontró relación entre las características morfológicas y el huésped de origen de los aislados, pudiendo significar que su fenotipo *in vitro* no presenta relación con la subespeciación planteada previamente.

Este proyecto aportó información relevante a muchas áreas del estudio de *C. paspali*, impulsando a continuar profundizando en el conocimiento de la especie. Es necesario un mayor desarrollo en el estudio de esporulación *in vitro* de aislados y la subespeciación lo cual sería un aporte para la búsqueda de mejoramiento de *Paspalum*. La información generada durante esta pasantía alienta la idea de poder realizar una comunicación de los avances de la misma en revista arbitrada, fuera del alcance de los plazos establecidos del trabajo.

6. Referencias bibliográficas

1. Tudzynski P, Scheffer J. *Claviceps purpurea*: Molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. *Molecular Plant Pathology*. 2004;5(5):377–388. doi:10.1111/J.1364-3703.2004.00237.X
2. Píchová K, Pažoutová S, Kostovčík M, Chudíčková M, Stodůlková E, Novák P, Flieger M, van der Linde E, Kolařík M. Evolutionary history of ergot with a new infrageneric classification (*Hypocreales*: *Clavicipitaceae*: *Claviceps*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2018;(February). <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055790317303494>. doi:10.1016/j.ympev.2018.02.013
3. Wyka SA, Mondo SJ, Liu M, Dettman J, Nalam V, Broders KD. Whole-Genome Comparisons of Ergot Fungi Reveals the Divergence and Evolution of Species within the Genus *Claviceps* Are the Result of Varying Mechanisms Driving Genome Evolution and Host Range Expansion. *Genome biology and evolution*. 2021;13(2). doi:10.1093/gbe/evaa267
4. White JF, Bacon CW, Hywel-Jones NL, Spatafora JW. *Clavicipitalean Fungi MYCOLOGY SERIES* Editor. 2005.
5. D Esposito RD, Lopez CR. Características biológicas de *Claviceps paspali* Stev. and Hall. *Boletín Micológico*. 2001;16:1–8.
6. Luttrell ES. The disease cycle and fungus-host relationships in Dallisgrass Ergot. *Cytology and Histology*. 1977;67:1461–1468.

7. Irzykowska L, Weber Z, Bocianowski J. Comparison of *Claviceps purpurea* populations originated from experimental plots or fields of rye. *Central European Journal of Biology*. 2012;7(5):839–849. doi:10.2478/s11535-012-0075-7
8. Muthusubramanian V, Bandyopadhyay R, Reddy DR, Tooley PW. Cultural characteristics, morphology, and variation within *Claviceps africana* and *C. sorghi* from India. *Mycological Research*. 2006;110(4):452–464. doi:10.1016/j.mycres.2005.12.005
9. Speranza P, Viega L, Gutierrez L, Astigarraga L, Picasso V, Saldanha S, Glison N, Gonzalez Barrios P, Sandro P, Tejera M, et al. Utilización y domesticación de gramíneas forrajeras del género *Paspalum* en Uruguay. 2017;(December):68.
<http://www.ainfo.inia.uy/consulta/busca?b=pc&id=58002&biblioteca=vazio&busca=fpta61&qFacets=fpta61&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>
10. Cuña M, Muguruza M, Rocha Fernando. Determinación del desarrollo fenológico de la panoja, curva de caída y calidad de semilla en *Paspalum dilatatum* cv. Chirú y *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens*. 2012:91.
11. Coll J. Serie Técnica N4- Producción de semilla de *Paspalum dilatatum*. Inia. 1991.
12. Bemhaja M. Alternativas para suelos arenosos. *Revista del Plan Agropecuario*. 2001;96:36–38. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/13673/1/Plan-Agropecuario-96-2001.pdf>
13. Ortiz-Díaz JJ, Arnelas I, Cerros-Tlatilpa R, Siqueiros-Delgado ME, Tun-Garrido J. The genus *Paspalum* L. (Paspaleae, Poaceae) of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Acta Botanica Mexicana*. 2015;2015(113):35–73. doi:10.21829/abm113.2015.1095

14. Aliscioni SS. Contribucion a la Filogenia Del Ginerio Paspalum (Poaceae : Panicoideae : Paniceae). 2002;89(4):504–523. <https://www.jstor.org/stable/3298593?origin=JSTOR-pdf>. doi:10.2307/3298593
15. Cidade FW, Vigna BBZ, de Souza FHD, Valls JFM, Dall’Agnol M, Zucchi MI, de Souza-Chies TT, Souza AP. Genetic variation in polyploid forage grass: Assessing the molecular genetic variability in the Paspalum genus. BMC Genetics. 2013;14. doi:10.1186/1471-2156-14-50
16. Pizarro E a. Potencial forrajero del género *Paspalum*. Pasturas tropicales. 2002;22(1):38–46.
17. Schrauf GE, Blanco MA, Cornaglia PS, Deregibus VA, Madia M, Pacheco MG, Padilla J, García AM, Quarín C. Ergot resistance in plants of *Paspalum dilatatum* incorporated by hybridisation with *Paspalum urvillei*. Tropical Grasslands. 2003;37(3):182–186.
18. Evers GW, Burson BL. Dallisgrass and other paspalum species. Warm-Season (C4) Grasses. 2016;(45):681–713. doi:10.2134/agronmonogr45.c20
19. Didek-Brumec M, Gaberc-Porekar V, Alačević M. Relationship between the Claviceps life cycle and productivity of ergot alkaloids. Critical Reviews in Biotechnology. 1996;16(3):257–299. doi:10.3109/07388559609147423
20. Oberti H, Dalla Rizza M, Reyno R, Murchio S, Altier N, Abreo E. Diversity of *Claviceps paspali* reveals unknown lineages and unique alkaloid genotypes. Mycologia. 2020;112(2):230–243. <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1694827>. doi:10.1080/00275514.2019.1694827

21. Kozák L, Szilágyi Z, Tóth L, Pócsi I, Molnár I. Tremorgenic and neurotoxic paspaline-derived indole-diterpenes: biosynthetic diversity, threats and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019;103(4):1599–1616. doi:10.1007/s00253-018-09594-x
22. Pažoutová S, Odvody GN, Frederickson DE, Chudíčková M, Olšovská J, Kolařík M. New *Claviceps* species from warm-season grasses. *Fungal Diversity*. 2011;49(July):145–165. doi:10.1007/s13225-011-0102-4
23. Tooley PW, Bandyopadhyay R, Carras MM, Pažoutová S. Analysis of *Claviceps africana* and *C. sorghi* from India using AFLPs, EF-1 α gene intron 4, and β -tubulin gene intron 3. *Mycological Research*. 2006;110(4):441–451. doi:10.1016/j.mycres.2005.12.006
24. Tooley PW, Goley ED, Carras MM, Frederick RD, Erin L, Tooley PW, Goley ED. Characterization of *Claviceps* Species Pathogenic on Sorghum by Sequence Analysis of the β -Tubulin Gene Intron 3 Region and EF-1 α Gene Intron 4 Published by : Mycological Society of America Stable URL : <http://www.jstor.org/s>. *Mycologia*. 2001;93(3):541–551.
25. Irzykowska L. Sequencing evidence for differentiation of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* isolates originated from wheat and rye. *Annals of Microbiology*. 2012;62(4):1819–1823. doi:10.1007/s13213-012-0440-9
26. Douhan GW, Smith ME, Huynh KL, Westbrook A, Beerli P, Fisher AJ. Multigene analysis suggests ecological speciation in the fungal pathogen *Claviceps purpurea*. *Molecular Ecology*. 2008;17(9):2276–2286. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03753.x

27. Longato S, Bonfante P. Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycological Research*. 1997;101(4):425–432.
doi:10.1017/S0953756296002766
28. Moon CD, Tapper BA, Scott B. Identification of epichloe endophytes in planta by a microsatellite- based PCR fingerprinting assay with automated analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999;65(3):1268–1279. doi:10.1128/aem.65.3.1268-1279.1999
29. Gilmore BS, Alderman SC, Knaus BJ, Bassil N v., Martin RC, Dombrowski JE, Dung JKS. Simple sequence repeat markers that identify claviceps species and strains. *Fungal Biology and Biotechnology*. 2016;3(1):1–13. doi:10.1186/s40694-016-0019-5
30. O’Donnell K, Cigelnik E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1997;7(1):103–116.
31. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995;61(4):1323–1330. doi:10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995
32. Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 1999;91(3):553–556.
doi:10.1080/00275514.1999.12061051
33. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*. 2016;33(7):1870–1874.
doi:10.1093/molbev/msw054

34. Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*. 2000;18(2):233–234. doi:10.1038/72708
35. Pažoutová S, Bandyopadhyay R, Frederickson DE, Mantle PG, Frederiksen RA. Relations among sorghum ergot isolates from the Americas, Africa, India, and Australia. *Plant Disease*. 2000;84(4):437–442. doi:10.1094/PDIS.2000.84.4.437
36. Kipfer BA. Munsell Soil Color Chart. *Encyclopedic Dictionary of Archaeology*. 2021:903–903. doi:10.1007/978-3-030-58292-0_130836
37. Bennett HW, Bashaw EC. An interspecific hybrid in *Paspalum*. *Journal of Heredity*. 1960;51(2):81–85. doi:10.1093/oxfordjournals.jhered.a106958
38. Burson BL, Hussey MA. Cytology of *Paspalum malacophyllum* and its relationship to *P. juergensii* and *P. dilatatum*. *International Journal of Plant Sciences*. 1998;159(1):153–159. doi:10.1086/297533
39. Pažoutová S, Pešicová K, Chudíčková M, Šrůtka P, Kolařík M. Delimitation of cryptic species inside *Claviceps purpurea*. *Fungal Biology*. 2015;119(1):7–26. doi:10.1016/j.funbio.2014.10.003
40. Oberti H, Abreo E, Reyno R, Feijoo M, Murchio S, Dalla-Rizza M. New Draft Genome Sequence of the Ergot Disease Fungus *Claviceps paspali*. *Microbiology Resource Announcements*. 2020;9(29):1–3. doi:10.1128/mra.00498-20
41. Tsukiboshi T, Shimanuki T, Uematsu T. *Claviceps sorghicola* sp. nov., a destructive ergot pathogen of sorghum in Japan. *Mycological Research*. 1999;103(11):1403–1408. doi:10.1017/S0953756299008539

7. Anexos

Anexo 1: Resultado de búsqueda de BLASTn en base de datos de NCBI para el gen *RPB2* del aislado U90

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Claviceps paspali partial RPB2 gene for RNA polymerase II large subunit 2_strain CCC.130	Claviceps paspali	1210	1210	95%	0.0	98.96%	1276	LT216594.1
✓	Claviceps paspali strain RRC1481 RNA polymerase II subunit 2 (rpbB) gene complete cds	Claviceps paspali	1210	1210	95%	0.0	98.96%	3960	KP689513.1
✓	Claviceps paspali strain ATCC 13892 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1210	1210	95%	0.0	98.96%	850	DQ522416.1
✓	Claviceps paspali strain ILB388 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1157	1157	89%	0.0	99.68%	632	MK833895.1
✓	Claviceps paspali strain DSM 833 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833913.1
✓	Claviceps paspali strain ILB389 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833911.1
✓	Claviceps paspali strain ILB393 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833909.1
✓	Claviceps paspali strain ILB369 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833907.1
✓	Claviceps paspali strain ILB382 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833906.1
✓	Claviceps paspali strain ILB383 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833905.1
✓	Claviceps paspali strain ILB386 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833904.1
✓	Claviceps paspali strain ILB373 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833903.1
✓	Claviceps paspali strain ILB385 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833902.1
✓	Claviceps paspali strain ILB380 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833901.1
✓	Claviceps paspali strain ILB387 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833900.1
✓	Claviceps paspali strain ILB360 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833899.1
✓	Claviceps paspali strain ILB377 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833898.1
✓	Claviceps paspali strain ILB359 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833897.1
✓	Claviceps paspali strain ILB375 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833896.1
✓	Claviceps paspali strain ILB374 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) gene partial cds	Claviceps paspali	1129	1129	89%	0.0	98.89%	632	MK833894.1

Figura 21: Primeros 20 resultados obtenidos por BLASTn de la base de datos de NCBI frente a la búsqueda de la secuencia de *RPB2* del aislado U90

Anexo 2: Secuencias del gen *LSU* de distintas especies de *Claviceps* para análisis topológico de aislados realizados en el estudio

Tabla 8: Códigos de Genbank de secuencias del gen *RPB2* de distintas especies de *Claviceps* utilizadas para verificar topología de aislados realizados en este estudio mediante filogenia.

Especie	Código Genbank
<i>C. monticola</i> CCC 1483	LT216592
<i>C. monticola</i> CCC 1222	LT216591
<i>C. zizinaiae</i> CCC 429	LT216617
<i>C. nigricans</i> CCC 802	LT216593
<i>C. sorghi</i> CCC 632	LT216608
<i>C. sorghi</i> CCC 627	LT216607
<i>C. africana</i> CCC 554	LT216561
<i>C. africana</i> CCC 632	LT216608
<i>C. clavispota</i> CCC 606	LT216566
<i>C. clavispota</i> CCC 610	LT216567
<i>C. paspali</i> CCC 130	LT216594
<i>Epichloë typhina</i> ATCC 56429	DQ522440

Anexo 3: Secuencias utilizadas para alineamiento de genes de identificación

Tabla 9: Códigos de Genbank de secuencias utilizadas para alineamiento de genes de identificación. Se detalla también código correspondiente a la Colección de germoplasma de INIA Las Brujas (ILB), especie a la que pertenece cada aislado, y huésped de donde fue obtenido inicialmente.

Código ILB	Especie <i>Claviceps</i>	Huésped	Código GenBank			
			<i>LSU</i>	<i>TUB2</i>	<i>TEF1</i>	<i>RPB2</i>
ILB357	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795789	MK575074	MK575107	MK833884
ILB358	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795791	MK575076	MK575109	MK833886
ILB359	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795802	MK575087	MK575120	MK833897
ILB360	<i>C. paspali</i>	<i>P. plicatulum</i>	MK795804	MK575089	MK575122	MK833899
ILB361	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795790	MK575075	MK575108	MK833885
ILB363	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795798	MK575083	MK575116	MK833893
ILB364	<i>C. paspali</i>	<i>P. plicatulum</i>	MK795797	MK575082	MK575115	MK833892
ILB365	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795788	MK575073	MK575106	MK833883
ILB366	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795793	MK575078	MK575111	MK833888
ILB367	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795795	MK575080	MK575113	MK833890
ILB368	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795815	MK575100	MK575133	MK833910
ILB369	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795812	MK575097	MK575130	MK833907
ILB370	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795796	MK575081	MK575114	MK833891
ILB371	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795813	MK575098	MK575131	MK833908
ILB373	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795808	MK575093	MK575126	MK833903
ILB374	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795799	MK575084	MK575117	MK833894
ILB375	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795801	MK575086	MK575119	MK833896
ILB376	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795787	MK575072	MK575105	MK833882
ILB377	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795803	MK575088	MK575121	MK833898
ILB378	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795794	MK575079	MK575112	MK833889
ILB380	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795806	MK575091	MK575124	MK833901
ILB381	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795792	MK575077	MK575110	MK833887
ILB382	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795811	MK575096	MK575129	MK833906
ILB383	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795810	MK575095	MK575128	MK833905
ILB384	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795786	MK575071	MK575104	MK833881
ILB385	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795805	MK575090	MK575123	MK833900

ILB386	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795807	MK575092	MK575125	MK833902
ILB387	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795809	MK575094	MK575127	MK833904
ILB388	<i>C. paspali</i>	<i>P. plicatulum</i>	MK795800	MK575085	MK575118	MK833895
ILB389	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795816	MK575101	MK575134	MK833911
ILB391	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795817	MK575102	MK575135	MK833912
ILB393	<i>C. paspali</i>	<i>P. dilatatum</i>	MK795814	MK575099	MK575132	MK833909
ILB432	<i>C. paspali</i>	<i>P. urvillei</i>	MT345111	-	-	MT348393
	<i>C. africana</i>		LT216447	AF263599	AF255899	LT216562

Anexo 4: Árboles filogenéticos con mayor parsimonia de aislados de *Claviceps paspali*, para los genes *TEF1*, *TUB2*, *RPB2* y *LSU*

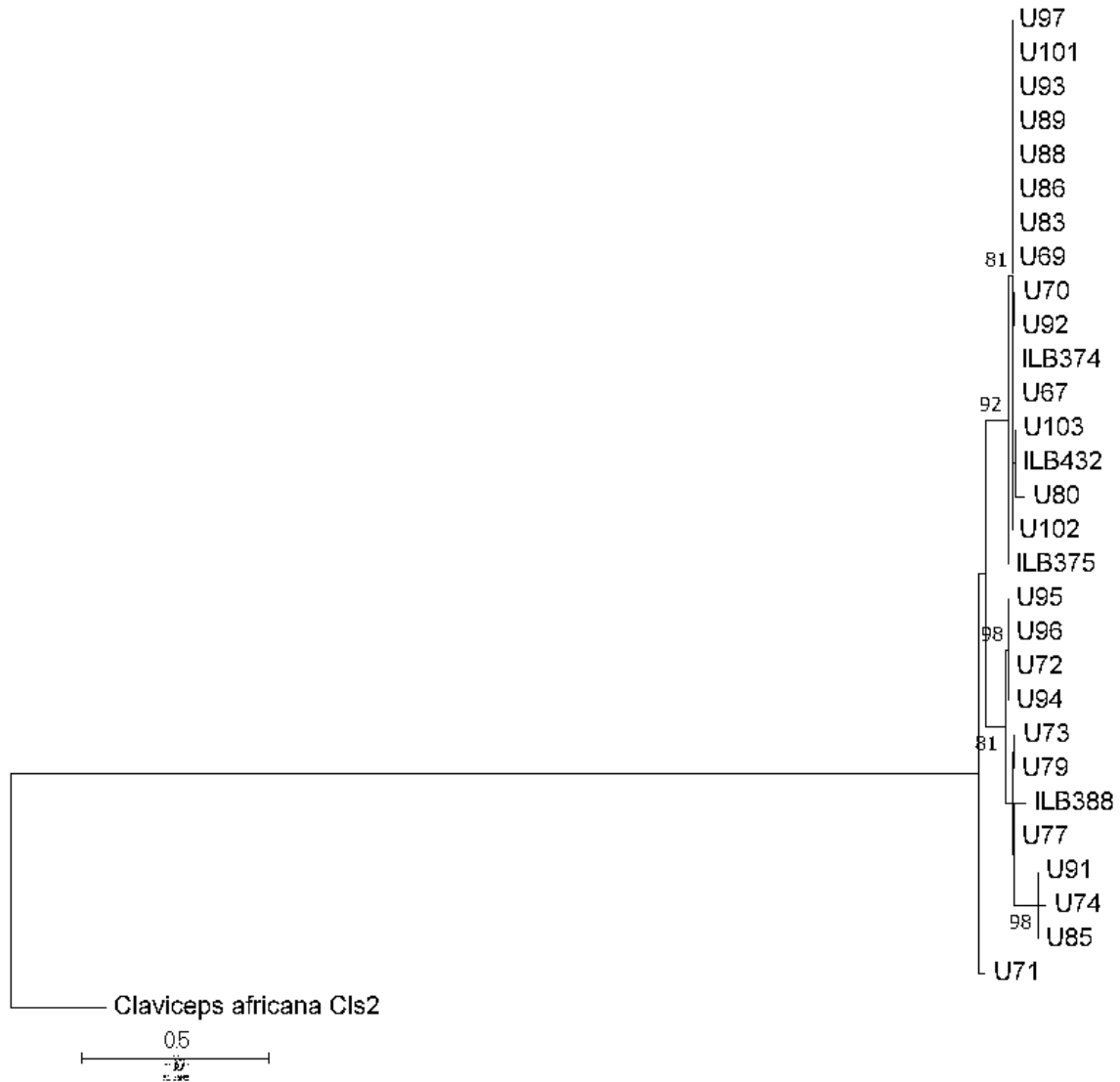


Figura 22: Árbol de mayor parsimonia obtenido por análisis filogenético a partir de alineamiento de secuencias para el gen *TEF1* de aislados de *C. paspali* realizados en este estudio, ubicando a *C. africana* como grupo externo. Se consideró *bootstrap* en base a 1000 réplicas. Realizado en software MEGA7.

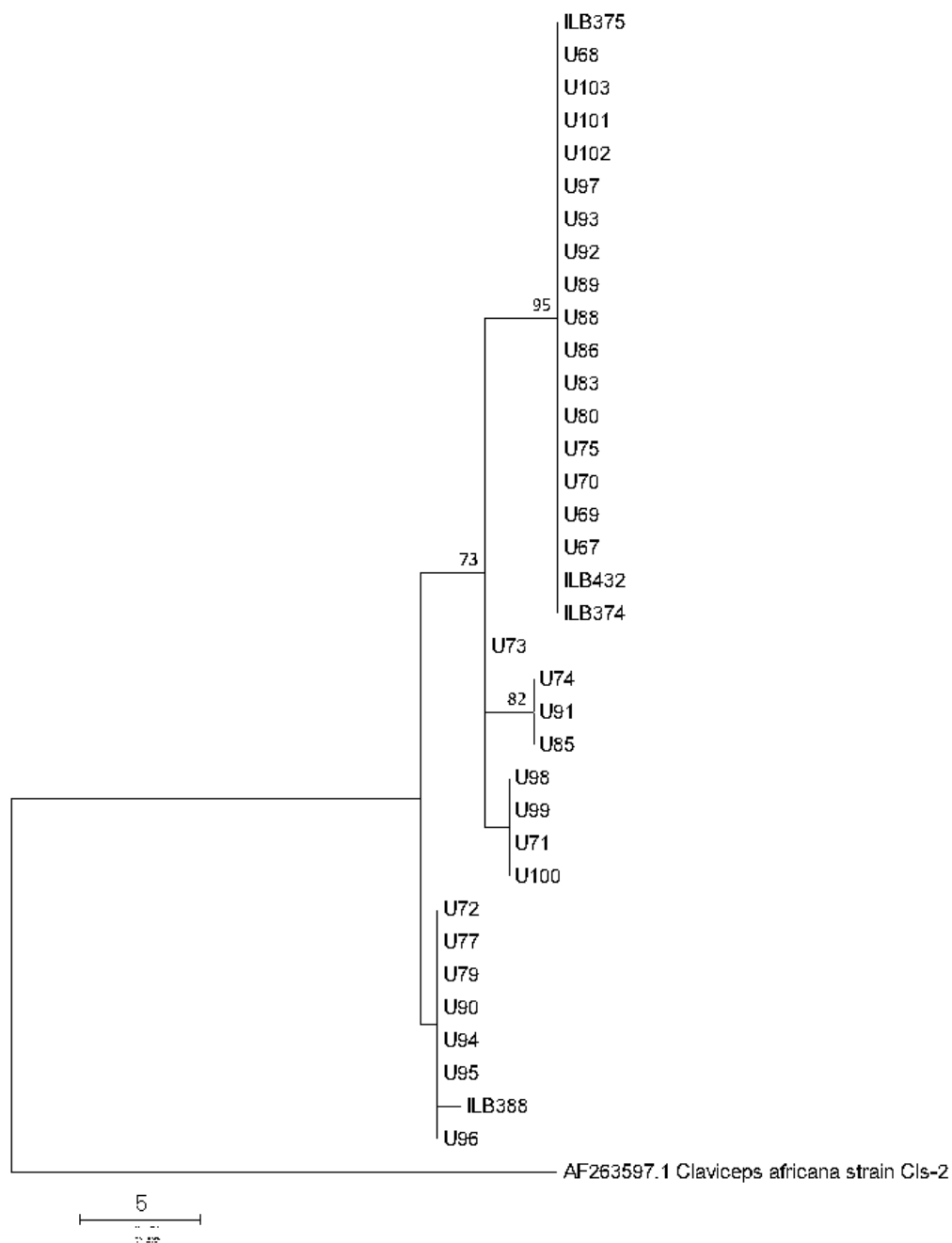


Figura 23: Árbol de mayor parsimonia obtenido por análisis filogenético a partir de alineamiento de secuencias para el gen *TUB2* de aislados de *C. paspali* realizados en este estudio, ubicando a *C. africana* como grupo externo. Se consideró *bootstrap* en base a 1000 réplicas. Realizado en software MEGA7.

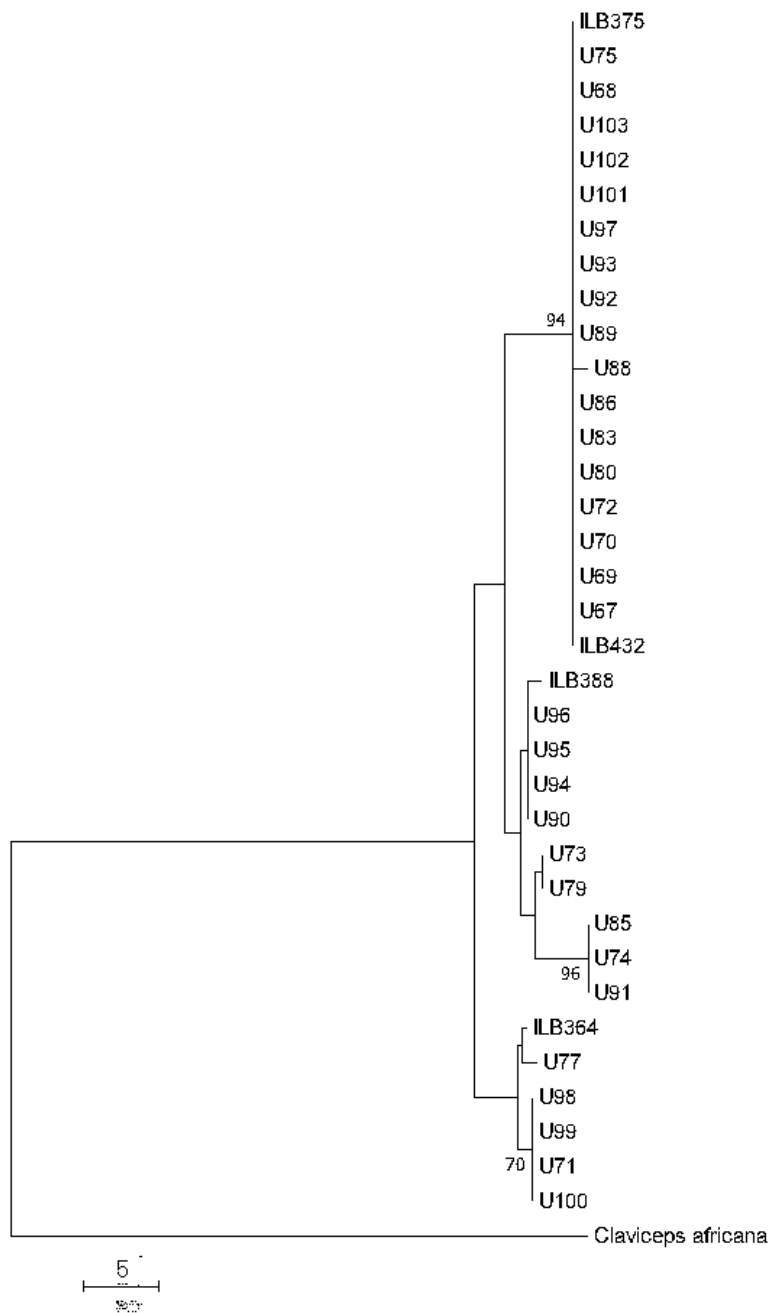


Figura 24: Árbol de mayor parsimonia obtenido por análisis filogenético a partir de alineamiento de secuencias para el gen *RPB2* de aislados de *C. paspali* realizados en este estudio, ubicando a *C. africana* como grupo externo. Se consideró *bootstrap* en base a 1000 réplicas. Realizado en software MEGA7.

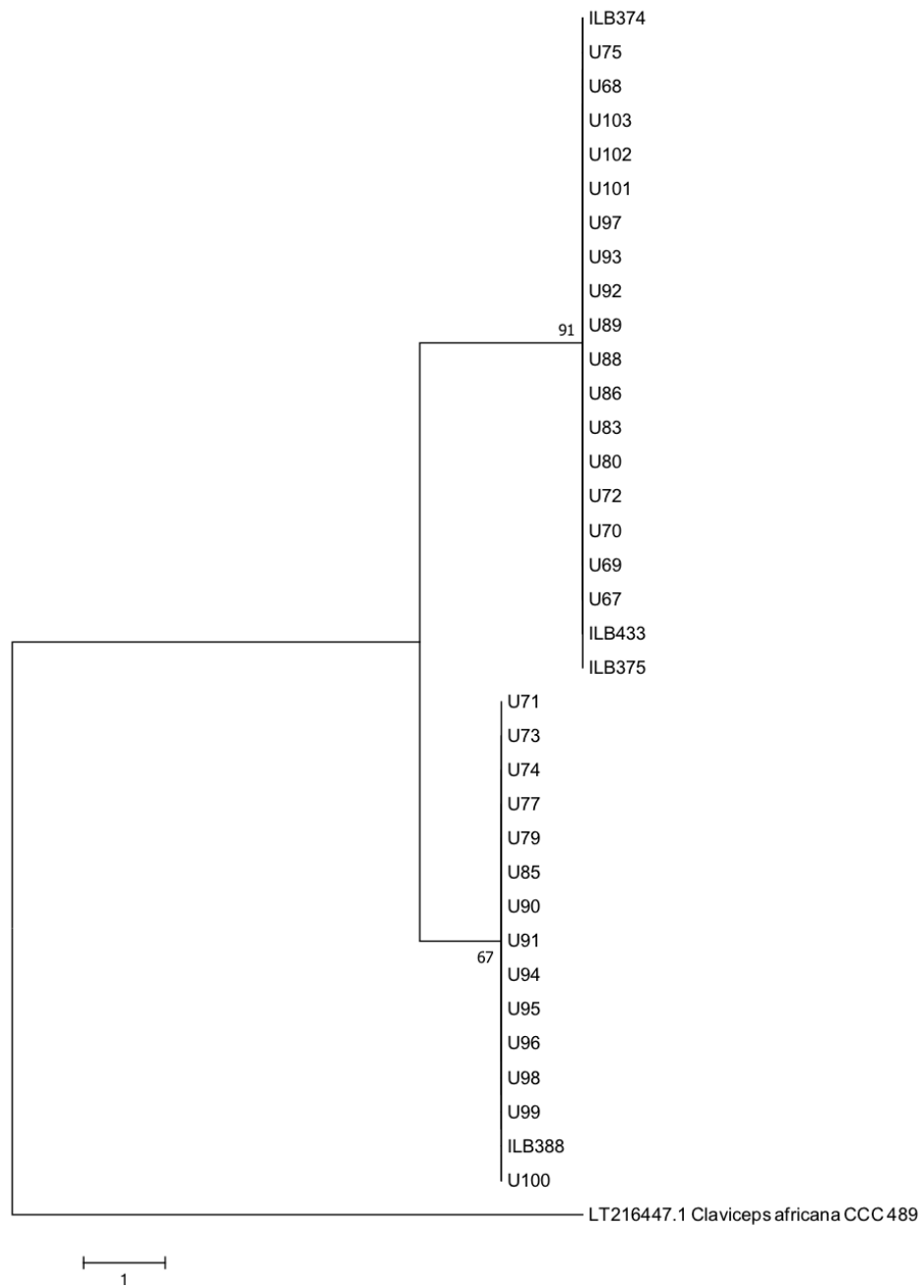


Figura 25: Árbol de mayor parsimonia obtenido por análisis filogenético a partir de alineamiento de secuencias para el gen *LSU* de aislados de *C. paspali* realizados en este estudio, ubicando a *C. africana* como grupo externo. Se consideró *bootstrap* en base a 1000 réplicas. Realizado en software MEGA7.

Anexo 5: Árboles filogenéticos de máxima parsimonia y máxima verosimilitud de aislados de *Claviceps paspali* a partir de genes *TEF1*, *TUB2*, *RPB2*, y *LSU* concatenados



Figura 26: Árbol filogenético por máxima verosimilitud según modelo K2 + G generado a partir de concatenación de genes *TUB2*, *TEF1*, *RPB2* y *LSU* de aislados de *C. paspali*, ubicando a *C. africana* como grupo externo. Se consideró *bootstrap* en base a 1000 réplicas. Realizado en software MEGA7.

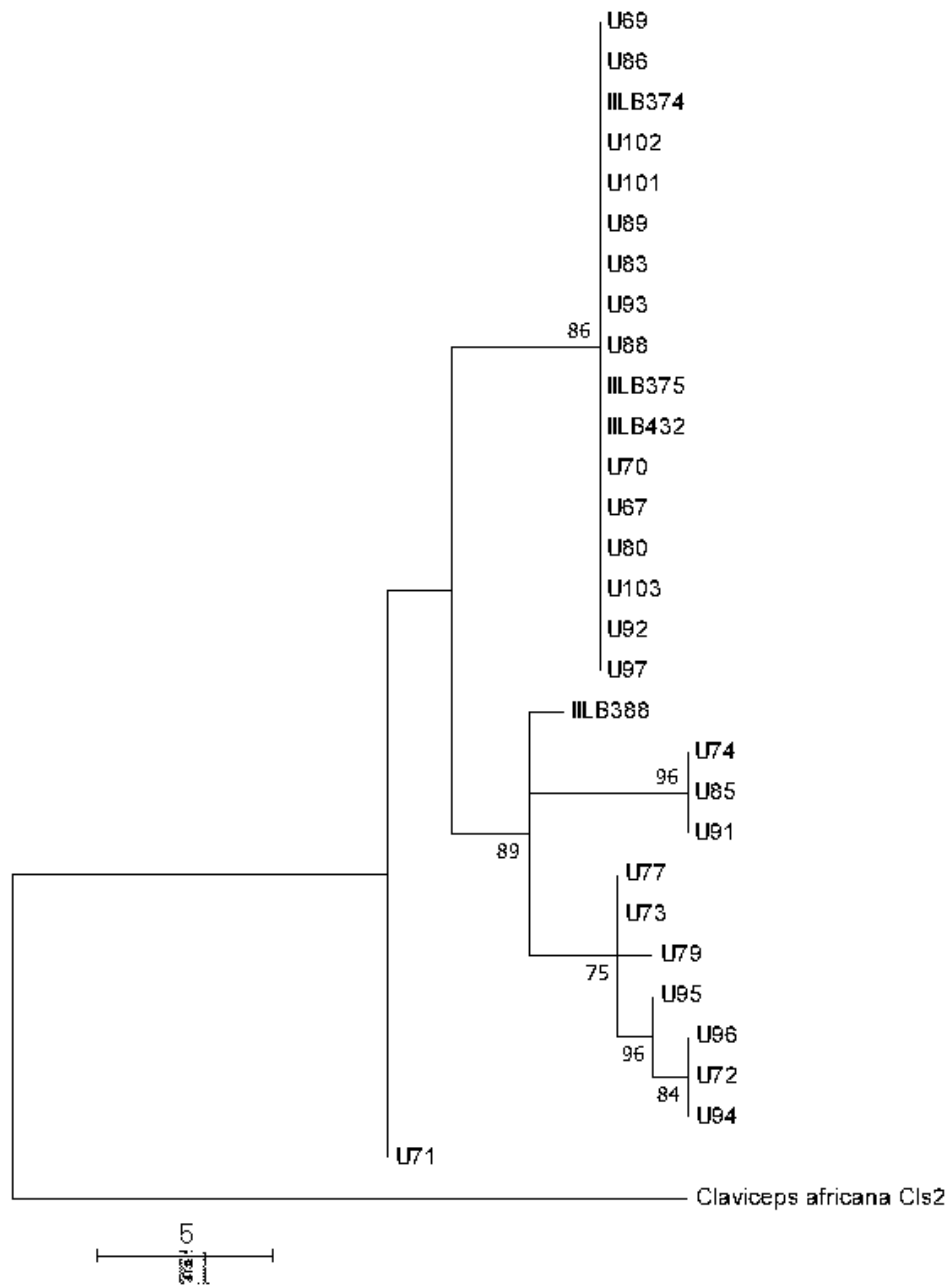


Figura 26: Árbol filogenético de mayor parsimonia obtenido a partir del alineamiento de la concatenación de los genes *TUB2*, *TEF1*, *RPB2* y *LSU* de aislados de *C. paspali* utilizados en este estudio, ubicando a *C. africana* como grupo externo. Se consideró *bootstrap* en base a 1000 réplicas. Realizado en software MEGA7.

Anexo 6: Medidas diametrales de aislados de *Claviceps paspali* en medios de cultivo PDA, MC y T2, tomadas al día 0 y 7 de incubación.

Tabla 10: Medidas diametrales para cada aislado de *C. paspali* realizado por triplicado, en días 0 y 7 de luego de incubación a 27°C, en medios de cultivo PDA, MC y T2. Tomadas mediante ImageJ. Todas las medidas se expresan en milímetros.

Aislado	Medida diámetro (mm)									
	Día	PDA			MC			T2		
U100	0	5,92	5,788	5,382	5,145	4,904	4,55	5,266	5,307	5,832
		3,866	4,087	4,174	4,167	3,841	3,914	5,065	5,254	5,331
		4,087	3,965	3,375	5,039	4,755	4,295	5,204	4,747	4,678
	7	7,663	7,092	7,239	5,798	5,143	5,065	7,041	6,464	6,919
		7,702	7,809	7,27	4,909	5,301	5,92	7,793	7,098	7,121
		9,139	9,39	10,75	7,363	5,168	5,663	7,334	7,609	7,2
U29	0	5,443	5,725	5,273	5,094	4,586	4,153	5,995	4,796	5,107
		5,817	5,117	5,179	4,375	3,919	3,913	5,826	4,601	5,399
		5,422	5,944	5,989	4,668	4,586	3,991	5,196	5,246	5,095
	7	15,011	14,242	14,27	19,265	20,218	20,481	20,365	15,415	13,767
		20,366	16,363	14,36	20,042	19,163	20,589	17,5	15,98	9,392
		15,252	14,828	15,349	20,023	20,71	19,586	9,311	9,825	10,194
U30	0	5,017	5,158	5,043	4,808	3,8	4,6	5,442	4,04	4,228
		5,48	6,074	6,127	4,335	4,006	3,998	5,733	4,616	5,011
		5,926	5,504	5,606	5,109	5,215	5,632	4,498	4,424	4,503
	7	11	8,656	4,351	9,03	7,622	9,75	8,03	7,462	7,066
		8,182	8,654	6,193	8,008	10,36	10,088	7,614	7,338	6,704
		5,974	6,136	5,47	9,413	8,235	9,13	7,775	6,559	5,765
U31	0	4,604	3,8	4,252	4,751	4,045	4,473	5,549	4,549	4,69
		4,123	4,561	4,386	4,588	4,569	4,167	4,762	4,908	4,39
		4,276	4,441	4,441	3,98	4,135	4,295	3,905	4,048	4,312
	7	28,319	27,261	27,013	29,173	28,027	27,368	18,816	17,005	18,001
		26,957	26,96	26,391	27,865	25,942	27,215	14,311	16,947	14,05
		29,247	29,315	25,453	25,239	24,896	26,237	18,358	18,12	16,689
U59	0	5,656	6,54	5,347	2,626	3,548	3,437	3,942	4,701	5,048
		4,586	4,482	4,153	3,536	4,121	4,152	3,942	4,31	4,31
		5,504	4,434	3,539	4,121	4,152	3,536	5,315	5,624	5,74
	7	9,424	9,1	5,75	7,511	6,847	6,869	7,33	7,47	7,095
		7,786	6,718	5,927	8,666	8,092	7,511	7,269	6,157	5,77
		10,05	8,807	7,85	6,246	7,361	7,89	7,363	8,044	7,149
U69	0	4,366	3,717	4,25	4,58	4,286	4,096	4,091	4,663	4,545
		4,757	4,301	3,536	4,473	3,941	4,076	4,794	3,783	4,191

	7	4,528	3,953	4,161	5,222	4,856	3,839	4,097	4,27	4,046
		15,998	16,494	15,84	19,5	17,088	18,562	9,249	9,957	7,471
		16,285	16,313	16,285	14,866	17,493	15,502	13,302	8,301	11,163
		16,41	15,304	16,401	19,561	14,142	16,388	12,408	11,07	11,845
U70	0	5,378	4,288	4,199	4,353	5,094	4,773	4,904	4,295	3,638
		4,647	4,402	4,524	4,57	4,288	4,476	4,38	4,796	4,574
		4,153	4,348	4,102	5,094	4,905	5,042	4,792	4,881	4,002
	7	16,627	16,375	14,778	19,969	12,502	16,327	16,82	14,146	15,273
		20,445	17,262	15,217	14,175	13,111	12,921	21,506	9,204	17,493
		11,441	8,608	10,948	6,684	6,241	5,9	16,441	14,32	15,106
U71	0	5,227	5,077	5,073	4,581	4,721	4,893	5,218	5,568	5,109
		4,62	4,804	4,804	5,383	5,109	5,244	5,031	4,986	4,585
		4,804	4,773	4,899	5,894	6,164	4,829	5,228	4,6	4,574
	7	10,485	10,585	8,343	10,835	10,056	11,556	11,739	7,203	8,323
		14,418	14,238	14,458	11,281	10,805	9,959	12,241	12,166	9,235
		14,061	11,57	12,426	11,49	11,685	9,511	8,944	7,211	7,779
U72	0	4,783	5,369	5,347	3,965	3,286	3,817	5,397	5,3	5,3
		5,042	4,622	5,64	4,057	4,002	3,402	5,942	4,912	4,912
		4,57	4,962	5,235	4,679	4,124	3,965	6,13	4,541	5,177
	7	19,041	20,3	18,582	6,036	5,47	5,015	11,388	11,134	11,146
		15,99	16,034	15,75	6,926	7,092	4,761	11,721	11,721	11,215
		18,076	16,756	18,582	5,178	5,281	5,937	9,084	8,522	8,77
U73	0	5,275	4,569	6,36	4,494	5	4,919	3,962	4,838	4,704
		5,004	5,61	4,952	4,948	4,817	5,016	4,996	3,802	5,23
		4,602	5,086	4,574	4,968	4,494	5,036	5,157	4,323	4,996
	7	17,694	13,867	17,156	11,455	13,405	9,56	9,305	8,953	11,719
		11,437	11,14	10,312	11,624	7,973	8,575	10,491	8,149	17,113
		12,767	9,568	11,348	17,363	15,169	14,358	15,343	15,676	15,871
U74	0	5,281	4,489	5,333	5,952	5,112	4,696	4,646	4,805	3,933
		5	4,3	4,777	4,549	5,151	5,287	4,591	4,293	4,233
		5,033	4,854	4,571	5,734	5,553	4,623	3,933	4,301	4,41
	7	20,833	20,208	21,555	26,638	27,349	27,628	19,023	20,098	18,789
		20,481	18,167	20,213	26,858	24,621	22,624	16,972	17,183	17,759
		24,142	20,676	21,495	26,638	27,013	28,561	19,849	17,518	18,075
U75	0	6,319	5,934	6,091	5	4,821	5,682	6,245	4,391	5,12
		6,338	5,504	5,739	4,027	4,685	4,794	5,798	5,891	4,873
		5,289	5,719	5,075	4,596	5,046	4,477	4,756	4,678	4,042
	7	13,928	15,16	12,889	7,178	6,942	7,667	13,732	10,282	9,643
		13,793	2,869	12,259	7,857	7,035	7,623	16,284	15,832	7,359
		8,602	7,637	6,381	7,241	8,193	8,095	10,599	10,069	10,37
U77	0	5,215	4,821	5,215	6,894	5,58	6,133	5,284	5,188	4,441
		5	5,179	4,825	6,02	5,718	5,167	5,517	5,215	5,036
		5,539	4,359	4,714	6,609	5,388	6,584	6,251	8,56	7,497
	7	19,734	20,734	21,088	16	14,959	14,753	10,251	9,167	9,209
		22,044	18,254	19,174	14,935	14,469	13,416	8,851	9,476	10,002
		18,463	18,734	18,181	16,575	13,208	14,239	13,926	12,502	9,712
U79	0	5,118	7,04	4,239	5,682	5,785	5,107	5,196	5,962	5,118

		5,321	5,684	5,487	6,12	6,241	5,247	6,078	4,862	5,276
		4,12	5,487	5,095	6,46	5,613	5,53	5,932	6,472	5,527
	7	19,661	18,564	18,191	12,42	9,226	12,404	8,255	8,544	8,633
		16,931	16,464	17,584	12,683	11,875	11,917	9,188	9,827	10,755
		20,52	17,303	17,382	9,076	8,844	8,125	11,18	10,442	11,281
U80	0	5,266	4,681	4,472	5,469	4,796	4,904	6,919	6,013	4,57
		5,607	4,093	5,382	5,48	4,588	5,043	7,011	5,874	4,353
		5,222	5,295	4,816	5,246	4,569	5,086	5,719	5,075	5,652
	7	10,684	9,927	5,193	9,775	10,23	9,173	16	13,101	14,773
		15,563	14,18	17,466	10,003	10,728	6,004	23,255	18,562	17,41
		10,711	11,931	11,792	15,754	12,826	9,329	20,538	21,633	19,698
U85	0	5,769	6,427	5,772	6,929	6,637	6,152	5,617	5,167	5,092
		5,937	5,196	5,849	4,62	4,996	4,215	5,281	4,854	4,038
		6,55	4,351	5,656	5,586	5,733	5,844	5,196	4,761	4,016
	7	17,316	15,88	16,308	19,27	18,846	18,062	14,555	13,149	14,681
		14,808	17,181	14,886	19,32	19,105	18,648	21,75	19,576	16,359
		15,212	13,28	15,412	10,166	8,046	9,152	20,478	19,686	21,811
U90	0	6,468	5,208	6,152	5,412	6,178	5,965	7,974	6,298	6,067
		6,056	5,892	5,896	6,483	6,182	6,069	6,418	5,667	6,267
		5,208	5,433	6,802	5,082	5,204	4,792	5,969	6,067	6,346
	7	22,203	15,828	14,435	11,862	13,379	6,369	10,525	11,18	10,859
		12,832	14,986	12,986	7,885	6,805	8,69	14,202	10,783	10,3
		17,11	19,426	18,748	11,994	10,827	11,894	13,607	11,728	11,096
U91	0	6,441	5,896	5,83	7,817	6,806	6,928	5,151	4,926	4,851
		6,082	5,536	5,547	6,275	6,208	7,017	5,536	5,501	5,44
		4,755	4,646	4,678	5,61	5,942	5,008	5,003	5,054	4,286
	7	21,749	18,852	18,439	17,772	15,14	15,689	13,983	14,057	12,383
		19,409	19,604	18,687	16,1	15,394	17,032	17,994	17,511	17,928
		23,638	24,101	23,335	20,86	19,612	18,752	14,377	12,708	14,333
U93	0	5,16	4,506	3,467	4,928	4,075	5,793	6,739	5,893	6,703
		6,369	5,861	4,631	5,241	4,071	4,175	4,464	4,507	3,355
		5,772	5,174	4,489	5,443	5,01	4,685	4,18	4,418	4,153
	7	15,913	15,058	15,853	8,161	10,472	9,039	19,515	18,966	16,518
		11,373	12,543	9,133	11,616	8,262	9,838	18,307	17,857	17,64
		13,45	13,902	7,828	11,29	10,009	9,188	16,296	15,849	15,246
U94	0	6,054	5,475	4,043	4,694	5,161	4,162	7,336	6,312	6,393
		6,096	6,17	6,243	5,368	4	5	5,994	6,308	6,176
		6,421	5,806	5,09	5,314	5,111	5,016	5,837	6,28	5,182
	7	15,523	14,378	12,011	6,909	5,387	4,908	10,591	6,812	6,888
		8,667	10,599	12,286	12,164	7,774	11,254	10,44	6	7,094
		11,618	9,941	10,037	12,68	12,291	11,03	6,791	6,888	6,512
U95	0	5,788	5,529	5,788	5,632	5,561	3,65	6,648	5,415	5,8
		5,487	6,263	5,524	5,099	4,123	4,391	4,682	3,8	4,162
		5,894	6,011	5,137	4,534	5,374	5,814	5	4,669	4,386
	7	18,276	16,125	15,405	21,831	22,009	22,635	11,042	10,623	10,419
		23,438	12,288	11,034	22,379	22,088	21,526	15,001	12,134	13,722
		17,049	15,668	13,53	24,626	27,365	22,294	17,18	11,882	10,672

U96	0	4,503	4,375	3,877	6,36	5,966	6,253	6,183	4,957	4,967
		4,859	4,337	5,459	5,69	4,29	5,311	6,183	5,258	5,089
		4,868	4,82	5,077	6,9	6,512	5,721	5,042	4,783	3,505
	7	8,633	7,315	7,126	19,176	18,772	15,28	8,784	8,418	7,385
		12,378	14,377	12,43	14,708	16,144	15,632	9,286	7,476	6,855
		10,462	10,063	9,291	20,192	18,362	19,945	8,925	7,143	7,81
U97	0	5,017	5,629	5,221	4,728	4,546	4,08	4,643	3,817	3,788
		5,225	5,017	5,686	4,464	5,252	4,874	4,657	3,796	3,933
		5,124	4,375	4,682	4,479	4,26	4,072	3,953	3,75	4,184
	7	14,889	13,363	13,997	15,872	15,457	13,038	26,485	25,757	25,27
		15,275	11,254	10,29	14,144	15,406	13,798	25,952	22,382	25,354
		13,997	14,816	8,182	13,915	12,382	13,551	22,118	22,798	21,647
U98	0	5,021	4,832	5,107	5,042	4,861	4,788	5,695	5,016	5,215
		5,53	5,548	5,865	5,005	3,715	3,565	4,968	5,492	5,557
		5,421	5,459	5,107	4,788	3,846	4,282	5,284	4,317	5,188
	7	6,639	7,154	7,849	9,141	9,213	7,078	6,465	6,121	6,261
		7,962	9,358	7,421	8,658	6,771	8,467	6,229	6,081	6,564
		6,709	6,799	6,487	8,307	7,174	9,133	8,052	7,714	7,061
U99	0	3,985	3,672	2,8	5,364	5	4,685	5,303	4,167	5,324
		5,2	4,686	4,604	4,091	4,413	4,178	4,583	4,939	4,588
		5,532	5,099	5,72	5,107	4,551	4,5	4,792	5,175	4,751
	7	18,205	16,143	16,791	22,179	19,525	19,431	12,418	14,831	13,095
		20,355	20,486	21,059	21,382	17,396	19,043	19,832	20,482	19,156
		18,748	14,816	11,501	20,154	20,405	19,019	23,194	18,028	17,276

Anexo 7: Cálculo de crecimiento y tasa de crecimiento diaria de aislados de *Claviceps paspali*

Tabla 11: Cálculo de promedio de crecimiento, y tasa de crecimiento diaria para aislados de *C. paspali* en medio PDA, partiendo del promedio de medidas de día 0 y medidas individuales del día 7 de incubación a 27°C (Anexo 3). Todas las medidas se expresan en milímetros.

Aislado	Promedio (mm)	Desvío	Crecimiento (mm)			Promedio crecimiento total (mm)	Desvío	Tasa de crecimiento diario (mm/día)	Desvío
U100	4,52	0,87	3,15	2,58	2,72	3,71	1,18	0,530	0,317
			3,19	3,29	2,75				
			4,62	4,87	6,23				
U29	5,55	0,31	9,47	8,70	8,72	10,01	1,81	1,431	0,181
			14,82	10,82	8,81				
			9,71	9,28	9,80				
U30	5,55	0,40	5,45	3,11	-1,20	1,63	1,95	0,233	1,198
			2,63	3,11	0,64				
			0,43	0,59	-0,08				
U31	4,32	0,23	24,00	22,94	22,69	23,11	1,21	3,302	0,053
			22,64	22,64	22,07				
			24,93	24,99	21,13				
U59	4,92	0,86	4,51	4,18	0,83	3,02	1,46	0,431	0,483
			2,87	1,80	1,01				
			5,13	3,89	2,93				
U69	4,17	0,36	11,82	12,32	11,67	11,97	0,36	1,710	0,030
			12,11	12,14	12,11				
			12,24	11,13	12,23				
U70	4,45	0,37	12,18	11,93	10,33	10,18	3,47	1,455	0,340
			16,00	12,81	10,77				
			6,99	4,16	6,50				
U71	4,90	0,18	5,59	5,69	3,45	7,39	2,07	1,056	0,280

			9,52	9,34	9,56				
			9,16	6,67	7,53				
U72	5,06	0,34	13,98	15,24	13,52	12,62	1,51	1,802	0,120
			10,93	10,97	10,69				
			13,01	11,69	13,52				
U73	5,11	0,55	12,58	8,75	12,04	7,70	2,74	1,099	0,356
			6,32	6,03	5,20				
			7,65	4,45	6,23				
U74	4,85	0,33	15,98	15,36	16,71	16,01	1,49	2,288	0,093
			15,63	13,32	15,36				
			19,29	15,83	16,65				
U75	5,78	0,41	8,15	9,38	7,11	5,12	3,16	0,732	0,616
			8,01	1,68	6,48				
			2,82	1,86	0,60				
U77	4,99	0,33	14,75	15,75	16,10	14,62	1,31	2,088	0,090
			17,06	13,27	14,19				
			13,48	13,75	13,20				
U79	5,29	0,81	14,37	13,28	12,90	12,78	1,25	1,826	0,097
			11,64	11,18	12,30				
			15,23	12,02	12,09				
U80	4,98	0,47	5,70	4,95	0,21	6,96	3,36	0,994	0,482
			10,58	9,20	12,48				
			5,73	6,95	6,81				
U85	5,72	0,62	11,59	10,16	10,59	9,86	1,19	1,409	0,121
			9,09	11,46	9,16				
			9,49	7,56	9,69				
U90	5,90	0,52	16,30	9,93	8,53	10,60	2,97	1,515	0,280
			6,93	9,08	7,08				
			11,21	13,52	12,85				
U91	5,49	0,62	16,26	13,36	12,95	15,38	2,20	2,197	0,143
			13,92	14,11	13,20				
			18,15	18,61	17,84				

U93	5,05	0,83	10,87	10,01	10,81	7,74	2,71	1,105	0,350
			6,33	7,50	4,09				
			8,40	8,85	2,78				
U94	5,71	0,71	9,81	8,67	6,30	5,96	2,07	0,852	0,347
			2,96	4,89	6,58				
			5,91	4,23	4,33				
U95	5,71	0,31	12,56	10,41	9,69	10,15	3,44	1,451	0,339
			17,72	6,57	5,32				
			11,34	9,95	7,82				
U96	4,69	0,44	3,95	2,63	2,44	5,54	2,32	0,792	0,418
			7,69	9,69	7,74				
			5,78	5,38	4,60				
U97	5,11	0,39	9,78	8,25	8,89	7,79	2,30	1,112	0,296
			10,17	6,15	5,18				
			8,89	9,71	3,07				
U98	5,32	0,31	1,32	1,83	2,53	2,05	0,86	0,293	0,419
			2,64	4,04	2,10				
			1,39	1,48	1,17				
U99	4,59	0,90	13,62	11,55	12,20	12,98	2,93	1,854	0,226
			15,77	15,90	16,47				
			14,16	10,23	6,91				

Tabla 12: Cálculo de promedio de crecimiento, y tasa de crecimiento diaria para aislados de *C. paspali* en medio MC, partiendo del promedio de medidas de día 0 y medidas individuales del día 7 de incubación a 27°C (Anexo 3). Todas las medidas se expresan en milímetros.

Aislado	Promedio (mm)	Desvío	Crecimiento (mm)			Promedio crecimiento total (mm)	Desvío	Tasa de crecimiento diario (mm/día)	Desvío
U100	4,52	0,87	3,15	2,58	2,72	3,71	1,18	0,530	0,655
			3,19	3,29	2,75				
			4,62	4,87	6,23				
U29	5,55	0,31	9,47	8,70	8,72	10,01	1,81	1,431	0,162

			14,82	10,82	8,81				
			9,71	9,28	9,80				
U30	5,55	0,40	5,45	3,11	-1,20	1,63	1,95	0,233	0,201
			2,63	3,11	0,64				
			0,43	0,59	-0,08				
U31	4,32	0,23	24,00	22,94	22,69	23,11	1,21	3,302	0,059
			22,64	22,64	22,07				
			24,93	24,99	21,13				
U59	4,92	0,86	4,51	4,18	0,83	3,02	1,46	0,431	0,183
			2,87	1,80	1,01				
			5,13	3,89	2,93				
U69	4,17	0,36	11,82	12,32	11,67	11,97	0,36	1,710	0,146
			12,11	12,14	12,11				
			12,24	11,13	12,23				
U70	4,45	0,37	12,18	11,93	10,33	10,18	3,47	1,455	0,630
			16,00	12,81	10,77				
			6,99	4,16	6,50				
U71	4,90	0,18	5,59	5,69	3,45	7,39	2,07	1,056	0,133
			9,52	9,34	9,56				
			9,16	6,67	7,53				
U72	5,06	0,34	13,98	15,24	13,52	12,62	1,51	1,802	0,427
			10,93	10,97	10,69				
			13,01	11,69	13,52				
U73	5,11	0,55	12,58	8,75	12,04	7,70	2,74	1,099	0,409
			6,32	6,03	5,20				
			7,65	4,45	6,23				
U74	4,85	0,33	15,98	15,36	16,71	16,01	1,49	2,288	0,079
			15,63	13,32	15,36				
			19,29	15,83	16,65				
U75	5,78	0,41	8,15	9,38	7,11	5,12	3,16	0,732	0,158
			8,01	1,68	6,48				
			2,82	1,86	0,60				

U77	4,99	0,33	14,75	15,75	16,10	14,62	1,31	2,088	0,118
			17,06	13,27	14,19				
			13,48	13,75	13,20				
U79	5,29	0,81	14,37	13,28	12,90	12,78	1,25	1,826	0,351
			11,64	11,18	12,30				
			15,23	12,02	12,09				
U80	4,98	0,47	5,70	4,95	0,21	6,96	3,36	0,994	0,466
			10,58	9,20	12,48				
			5,73	6,95	6,81				
U85	5,72	0,62	11,59	10,16	10,59	9,86	1,19	1,409	0,464
			9,09	11,46	9,16				
			9,49	7,56	9,69				
U90	5,90	0,52	16,30	9,93	8,53	10,60	2,97	1,515	0,568
			6,93	9,08	7,08				
			11,21	13,52	12,85				
U91	5,49	0,62	16,26	13,36	12,95	15,38	2,20	2,197	0,174
			13,92	14,11	13,20				
			18,15	18,61	17,84				
U93	5,05	0,83	10,87	10,01	10,81	7,74	2,71	1,105	0,234
			6,33	7,50	4,09				
			8,40	8,85	2,78				
U94	5,71	0,71	9,81	8,67	6,30	5,96	2,07	0,852	0,653
			2,96	4,89	6,58				
			5,91	4,23	4,33				
U95	5,71	0,31	12,56	10,41	9,69	10,15	3,44	1,451	0,098
			17,72	6,57	5,32				
			11,34	9,95	7,82				
U96	4,69	0,44	3,95	2,63	2,44	5,54	2,32	0,792	0,172
			7,69	9,69	7,74				
			5,78	5,38	4,60				
U97	5,11	0,39	9,78	8,25	8,89	7,79	2,30	1,112	0,115
			10,17	6,15	5,18				

			8,89	9,71	3,07				
U98	5,32	0,31	1,32	1,83	2,53	2,05	0,86	0,293	0,240
			2,64	4,04	2,10				
			1,39	1,48	1,17				
U99	4,59	0,90	13,62	11,55	12,20	12,98	2,93	1,854	0,087
			15,77	15,90	16,47				
			14,16	10,23	6,91				

Tabla 13: Cálculo de promedio de crecimiento, y tasa de crecimiento diaria para aislados de *C. paspali* en medio T2, partiendo del promedio de medidas de día 0 y medidas individuales del día 7 de incubación a 27°C (Anexo 3). Todas las medidas se expresan en milímetros.

Aislado	Promedio (mm)	Desvío	Crecimiento (mm)			Promedio crecimiento total (mm)	Desvío	Tasa de crecimiento diario (mm/día)	Desvío
U100	5,19	0,32	1,85	1,28	1,73	1,99	0,36	0,284	0,183
			2,61	1,91	1,93				
			2,15	2,42	2,01				
U29	5,25	0,42	15,11	10,16	8,52	8,28	3,83	1,182	0,462
			12,25	10,73	4,14				
			4,06	4,57	4,94				
U30	4,72	0,53	3,31	2,74	2,34	2,42	0,67	0,346	0,275
			2,89	2,62	1,98				
			3,05	1,84	1,04				
U31	4,57	0,46	14,25	12,44	13,43	12,35	1,61	1,765	0,130
			9,74	12,38	9,48				
			13,79	13,55	12,12				
U59	4,77	0,65	2,56	2,70	2,32	2,30	0,65	0,329	0,284
			2,50	1,39	1,00				
			2,59	3,27	2,38				
U69	4,28	0,31	4,97	5,68	3,20	6,25	1,82	0,893	0,292
			9,03	4,03	6,89				
			8,13	6,79	7,57				

U70	4,47	0,41	12,35	9,67	10,80	11,12	3,09	1,588	0,278
			17,03	4,73	13,02				
			11,97	9,85	10,63				
U71	4,99	0,32	6,75	2,21	3,33	4,44	1,97	0,634	0,443
			7,25	7,18	4,25				
			3,96	2,22	2,79				
U72	5,29	0,47	6,10	5,84	5,86	5,23	1,25	0,747	0,238
			6,43	6,43	5,92				
			3,79	3,23	3,48				
U73	4,67	0,49	4,64	4,29	7,05	7,85	3,29	1,121	0,419
			5,82	3,48	12,45				
			10,68	11,01	11,20				
U74	4,35	0,28	14,67	15,75	14,44	14,01	1,07	2,002	0,076
			12,62	12,83	13,41				
			15,50	13,17	13,73				
U75	5,09	0,70	8,64	5,19	4,55	6,49	2,84	0,927	0,438
			11,20	10,74	2,27				
			5,51	4,98	5,28				
U77	5,89	1,25	4,36	3,28	3,32	4,46	1,62	0,637	0,364
			2,96	3,59	4,11				
			8,04	6,61	3,82				
U79	5,60	0,50	2,65	2,94	3,03	4,19	1,11	0,598	0,266
			3,59	4,22	5,15				
			5,58	4,84	5,68				
U80	5,69	0,87	10,31	7,41	9,09	12,64	3,13	1,806	0,248
			17,57	12,87	11,72				
			14,85	15,95	14,01				
U85	4,89	0,52	9,66	8,26	9,79	13,11	3,15	1,873	0,240
			16,86	14,68	11,47				
			15,59	14,79	16,92				
U90	6,34	0,62	4,18	4,84	4,52	5,25	1,30	0,749	0,249
			7,86	4,44	3,96				

			7,27	5,39	4,75				
U91	5,08	0,37	8,90	8,97	7,30	9,95	2,07	1,421	0,208
			12,91	12,43	12,84				
			9,29	7,62	9,25				
U93	4,93	1,14	14,58	14,03	11,58	12,42	1,38	1,774	0,111
			13,37	12,92	12,71				
			11,36	10,91	10,31				
U94	6,20	0,53	4,39	0,61	0,69	1,36	1,61	0,194	1,187
			4,24	-0,20	0,89				
			0,59	0,69	0,31				
U95	4,95	0,83	6,09	5,67	5,47	7,57	2,20	1,081	0,290
			10,05	7,18	8,77				
			12,23	6,93	5,72				
U96	5,11	0,75	3,68	3,31	2,28	2,90	0,82	0,415	0,282
			4,18	2,37	1,75				
			3,82	2,04	2,70				
U97	4,06	0,34	22,43	21,70	21,21	20,14	1,80	2,877	0,090
			21,89	18,32	21,30				
			18,06	18,74	17,59				
U98	5,19	0,38	1,27	0,93	1,07	1,54	0,68	0,219	0,444
			1,04	0,89	1,37				
			2,86	2,52	1,87				
U99	4,85	0,36	7,57	9,98	8,25	12,74	3,37	1,820	0,264
			14,99	15,64	14,31				
			18,35	13,18	12,43				

Anexo 8: Análisis de similitud *two-way* ANOVA para crecimiento de aislados de *Claviceps paspali* en medios PDA, MC y T2.

Tabla 14: Resultado de *test two-way* ANOVA para crecimientos de aislados de *Claviceps* en distintos medios de cultivo, realizado en *Graphpad Prism 9* (Graphpad Software, California, Estados Unidos).

Two-way ANOVA				
Source of Variation	% of total variation	P value		
Medios de crecimiento	1,83	0,2885		
Aislados	63,81	< 0,0001		
Source of Variation	P value summary	Significant?		
Medios de crecimiento	ns	No		
Aislados	***	Yes		
Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Medios de crecimiento	2	38,55	19,27	1,276
Aislados	24	1347	56,11	3,714
Residual	48	725,1	15,11	

Anexo 9: Esporulación *in vitro* en medio PDA de aislados de *Claviceps paspali*

Tabla 15: Cálculo de concentración de esporulación *in vitro* de aislados de *C. paspali* realizados en medio PDA, mediante promedio de recuento en cámara de Neubauer. Se detallan días de aislamiento totales (incubación 27°C y 4°C) tanto para aislados que exhibieron esporulación como no.

Aislado	Promedio recuento	Cel/ml	Promedio recuento	Cel/ml	Promedio recuento	Cel/ml	Días de aislado
U30	-	-	-	-	-	-	18
U71	-	-	-	-	-	-	18
U72	-	-	-	-	-	-	25
U73	2,1	5,25E+05	59,9	1,50E+07	-	-	39
U77	-	-	-	-	-	-	18
U79	8,56	2,14E+06	0,89	2,23E+05	5,5	1,38E+06	46
U90	15,96	3,99E+06	36,65	9,16E+06	13	3,25E+06	46
U94	55,2	1,38E+07	5,2	1,30E+06	2,2	5,50E+05	39
U95	2,5	6,25E+05	32,68	8,17E+06	-	-	46
U96	2,84	7,10E+05	-	-	-	-	46
U98	3,8	9,50E+05	-	-	-	-	25
U99	-	-	-	-	-	-	46
U100	3,8	9,50E+05	-	-	-	-	25
U31	-	-	-	-	-	-	46
U80	-	-	-	-	-	-	39
U93	4,14	1,04E+06	0,2	5,00E+04	-	-	46
U29	-	-	-	-	-	-	25

U59	-	-	-	-	-	-	39
U75	-	-	-	-	-	-	39
U97	0,812	2,03E+05	1,156	2,89E+05	-	-	46
U69	13,4	3,35E+06	27,56	6,89E+06	-	-	46
U70	7,2	1,80E+06	0,64	1,60E+05	-	-	39
U74	-	-	-	-	-	-	39
U91	-	-	-	-	-	-	25
U85	-	-	-	-	-	-	46

Anexo 10: Códigos de pigmentación de micelio de aislados de

Claviceps paspali según tabla de Munsell ³⁶

Tabla 16: Códigos de Munsell y nomenclatura de color correspondiente para pigmento anverso y reverso de aislados de *C. paspali* en medio PDA.

Huésped	Aislado	Color Anverso	Código Munsell	Color Reverso	Código Munsell
<i>P. Plicatulum</i>	U30	Blanco	8/1 7.5YR	Marrón rojizo oscuro	2.5/4 2.5YR
	U71	Blanco	8/1 7.5YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR
	U72	Blanco rosáceo	8/2 7.5 YR	Marrón fuerte	4/6 7.5YR
	U73	Marrón muy pálido	8/2 10YR	Marrón fuerte	4/6 7.5YR
	U77	Blanco	8/2 7.5 YR	Marrón fuerte	5/8 7.5YR
	U79	Blanco	8/2 7.5 YR	Marrón amarillento oscuro	4/4 10YR
	U90	Marrón muy pálido	8/2 10YR	Marrón amarillento oscuro	3/6 10YR
	U94	Marrón muy pálido	8/2 10YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR
	U95	Blanco rosáceo	8/2 7.5 YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR
	U96	Blanco rosáceo	8/2 7.5 YR	Marrón amarillento oscuro	3/4 10YR
	U98	Blanco rosáceo	8/2 7.5 YR	Marrón amarillento oscuro	3/6 10YR
	U99	Marrón muy pálido	8/2 10YR	Marrón amarillento oscuro	3/6 10YR
U100	Blanco	8/1 7.5YR	Marrón oscuro	3/4 7.5YR	
<i>P. Dilatatum</i>	U31	Blanco rosáceo	8/2 7.5 YR	Marrón fuerte	5/6 7.5YR
	U80	Marrón claro	6/3 7.5YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR
	U93	Blanco rosáceo	8/2 7.5 YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR
	U29	Marrón muy pálido	7/3 10YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR
<i>P. Urvillei</i>	U59	Rosa	7/3 7.5YR	Marrón oscuro	3/3 7.5YR

	U75	Marrón claro	6/4 7.5YR	Marrón rojizo oscuro	2.5/2 5YR
	U97	Rosa	7/3 7.5YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR
<i>P. Malacophyllum</i>	U69	Marrón muy pálido	7/3 10YR	Marrón muy oscuro	2/2 10YR
	U70	Marrón claro	6/4 7.5YR	Marrón muy oscuro	2/2 10YR
<i>P. Notatum</i>	U74	Marrón muy pálido	7/3 10YR	Marrón oscuro	3/4 7.5YR
	U91	Blanco rosáceo	8/2 7.5 YR	Marrón amarillento oscuro	4/4 10YR
	U85	Marrón muy pálido	7/3 10YR	Marrón rojizo oscuro	3/4 5YR

Tabla 17: Códigos de Munsell y nomenclatura de color correspondiente para pigmento anverso y reverso de aislados de *C. paspali* en medio MC.

Huésped	Aislado	Medio MC			
		Anverso	Munsell	Reverso	Munsell
<i>P. Plicatulum</i>	U30	Gris claro	7/2 10YR	Marrón rojizo oscuro	2.5/3 2.5YR
	U71	Blanco	8/1 5YR	Marrón amarillento oscuro	3/6 10YR
	U72	Gris claro	7/1 7.5YR	Marrón fuerte	4/6 7.5YR
	U73	Blanco	8/1 7.5YR	Marrón oscuro	3/3 7.5YR
	U77	Marrón muy pálido	8/2 10YR	Marrón fuerte	4/6 7.5YR
	U79	Marrón muy pálido	8/2 10YR	Marrón oscuro	3/4 7.5YR
	U90	Blanco	8/1 10YR	Marrón oscuro	3/4 7.5YR
	U94	Blanco	8/2 7.5YR	Marrón oscuro	3/4 7.5YR
	U95	Blanco	8/1 7.5YR	Marrón amarillento oscuro	3/6 10YR
	U96	Marrón muy pálido	8/2 10YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR
	U98	Blanco	8/2 7.5YR	Marrón amarillento oscuro	3/4 10YR
	U99	Blanco	8/2 7.5YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR

	U100	Marrón muy pálido	8/3 10YR	Marrón oscuro	3/2 7.5YR
<i>P. Dilatatum</i>	U31	Marrón muy pálido	7/3 10YR	Marrón rojizo oscuro	3/4 5YR
	U80	Gris claro	7/2 10YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR
	U93	Marrón muy pálido	8/2 10YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR
	U29	Blanco	8/1 7.5YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR
	U59	Marrón claro	6/4 7.5YR	Marrón muy oscuro	2/2 10YR
<i>P. Urvillei</i>	U75	Rosa	7/3 7.5YR	Marrón muy oscuro	2.5/2 7.5YR
	U97	Marrón claro	6/3 7.5YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR
	U69	Marrón amarillento	5/4 10YR	Marrón muy oscuro	2/2 10YR
<i>P. Malacophyllum</i>	U70	Gris rosáceo	7/2 7.5YR	Marrón amarillento oscuro	3/4 10YR
	U74	Gris claro	7/2 10YR	Marrón muy oscuro	2.5/3 7.5YR
<i>P. Notatum</i>	U91	Blanco rosáceo	8/2 7.5YR	Marrón fuerte	4/6 7.5YR
	U85	Rosa	7/3 7.5YR	Marrón amarillento oscuro	4/4 10YR

Tabla 18: Códigos de Munsell y nomenclatura de color correspondiente para pigmento anverso y reverso de aislados de *C. paspali* en medio T2.

Huésped	Aislado	Medio T2			
		Anverso	Munsell	Reverso	Munsell
<i>P. Plicatulum</i>	U30	Blanco	8/1 7.5YR	Marrón muy oscuro	2.5/2 7.5YR
	U71	Blanco	8/1 5YR	Marrón	5/3 7.5YR
	U72	Blanco	8/1 7.5 YR	Marrón muy oscuro	2.5/2 7.5YR
	U73	Blanco	8/1 5YR	Marrón amarillento oscuro	4/4 10YR
	U77	Blanco	8/1 10YR	Marrón amarillento oscuro	4/4 10YR

	U79	Blanco	8/1 10YR	Marrón oscuro	3/3 10YR
	U90	Gris claro	7/2 10YR	Marrón grisáceo muy oscuro	3/2 2.5Y
	U94	Blanco	8/1 7.5YR	Marrón muy oscuro	2/2 10YR
	U95	Blanco	8/1 10YR	Marrón oscuro	3/3 10YR
	U96	Blanco	8/1 7.5YR	Marrón oscuro	3/3 10YR
	U98	Blanco	8/1 10YR	Marrón muy oscuro	2/2 10YR
	U99	Blanco	8/1 10YR	Marrón amarillento	5/4 10YR
	U100	Blanco	8/1 10YR	Marrón oscuro	3/3 10YR
<i>P. Dilatatum</i>	U31	Gris claro	7/2 10YR	Marrón amarillento oscuro	4/4 10YR
	U80	Blanco	8/1 10YR	Marrón muy oscuro	2/2 10YR
	U93	Blanco	8/1 10YR	Marrón muy oscuro	2.5/2 7.5YR
	U29	Blanco	8/1 10YR	Marrón muy pálido	7/3 10YR
<i>P. Urvillei</i>	U59	Blanco	8/1 5YR	Negro	2/1 10YR
	U75	Blanco	8/1 10YR	Marrón oscuro	3/3 10YR
	U97	Gris claro	7/1 7.5YR	Negro	2/1 10YR
<i>P. Malacophyllum</i>	U69	Marrón muy pálido	7/3 10YR	Negro	2/1 10YR
	U70	Blanco	8/1 7.5YR	Marrón amarillento oscuro	3/6 10YR
<i>P. Notatum</i>	U74	Blanco	8/1 10YR	Marrón	4/3 10YR
	U91	Marrón claro	6/3 7.5YR	Marrón muy oscuro	2/2 10YR
	U85	Blanco	8/1 7.5YR	Marrón oscuro	3/3 10YR

Anexo 11: Características morfológicas de aislados de *Claviceps paspali*

Tabla 19: Descripción morfológica de aislados de *C. paspali* en medio PDA.

Huésped	Aislado	Medio PDA				
		Textura	Elevación	Forma	Margen	Presencia de pigmento en el medio
<i>P. Plicatulum</i>	U30	Compacta	Rugosa	Irregular	Liso	Si
	U71	Compacta	Rugosa	Irregular	Lobular	No
	U72	Compacta	Rugosa	Circular	Ondulado	No
	U73	Compacta	Umbonada	Irregular	Liso	No
	U77	Compacta	Umbonada	Circular	Espiral	No
	U79	Algodonosa	Rugosa	Irregular	Filamentoso	No
	U90	Compacta	Rugosa	Irregular	Ondulado	No
	U94	Compacta	Rugosa	Irregular	Liso	Si
	U95	Compacta	Crateriforme	Circular	Ondulado	No
	U96	Compacta	Plegada	Irregular	Liso	No
	U98	Compacta	Umbonada	Irregular	Liso	No
	U99	Algodonosa	Rugosa	Circular	Ondulado	No
	U100	Compacta	Umbonada	Circular	Ondulado	No
<i>P. Dilatatum</i>	U31	Algodonosa	Umbonada	Circular	Liso	No
	U80	Compacta	Rugosa	Irregular	Liso	Si
	U93	Compacta	Rugosa	Irregular	Liso	Si
	U29	Compacta	Umbonada	Circular	Ondulado	Si
<i>P. Urvil lei</i>	U59	Compacta	Liso	Irregular	Lobular	Si

	U75	Compacta	Umbonada	Irregular	Ondulado	Si
	U97	Compacta	Radiada/Ondulada	Circular	Ondulado	Si
<i>P. Malacophyllum</i>	U69	Compacta	Crateriforme	Circular	Ondulado	Si
	U70	Compacta	Lisa	Irregular	Liso	SI
<i>P. Notatum</i>	U74	Compacta	Plegada	Circular	Ondulado	No
	U91	Compacta	Umbonada	Circular	Ondulado	No
	U85	Compacta	Umbonada	Irregular	Lobular	No

Tabla 20: Descripción morfológica de aislados de *C. paspali* en medio MC.

Huésped	Aislado	Medio MC				
		Textura	Elevación	Forma	Margen	Presencia de pigmento en el medio
<i>P. Plicatum</i>	U30	Compacta	Rugosa	Irregular	Liso	No
	U71	Compacta	Umbonada	Circular	Liso	Si
	U72	Compacta	Rugosa	Irregular	Liso	No
	U73	Compacta	Umbonada	Irregular	Liso	Si
	U77	Compacta	Rugosa	Circular	Liso	No
	U79	Compacta	Rugosa	Irregular	Lobulado	Si
	U90	Compacta	Rugosa	Irregular	Liso	Si
	U94	Compacta	Rugosa	Irregular	Ondulado	Si
	U95	Compacta	Crateriforme	Circular	Lobulado	No
	U96	Compacta	Lisa	Irregular	Ondulado	Si
	U98	Compacta	Rugosa	Irregular	Ondulado	No
	U99	Compacta	Rugosa	Irregular	Ondulado	Si

	U100	Compacta	Cerebriforme	Irregular	Ondulado	No
<i>P. Dilatatum</i>	U31	Algodonosa	Lisa	Circular	Filamentoso	No
	U80	Compacta	Cerebriforme	Irregular	Lobulado	Si
	U93	Algodonosa	Radiada	Circular	Filamentoso	No
	U29	Algodonosa	Umbonada	Circular	Espiral	No
	U59	Compacta	Rugosa	Irregular	Liso	Si
<i>P. Urvillei</i>	U75	Compacta	Rugosa	Irregular	Lobulado	Si
	U97	Compacta	Rugosa	Circular	Filamentoso	No
	U69	Compacta	Radiada/Ondulada	Irregular	Ondulado	Si
<i>P. Malacophyllum</i>	U70	Compacta	Rugosa	Circular	Irregular	Si
	U74	Compacta	Radiada/Ondulada	Circular	Espiral	No
<i>P. Notatum</i>	U91	Compacta	Crateriforme	Circular	Lobulado	Si
	U85	Compacta	Lisa	Circular	Liso	No

Tabla 21: Descripción morfológica de aislados de *C. paspali* en medio T2.

Huésped	Aislado	Medio T2				
		Textura	Elevación	Forma	Margen	Presencia de pigmento en el medio
<i>P. Plicatulum</i>	U30	Compacta	Rugosa	Irregular	Liso	Si
	U71	Compacta	Rugosa	Circular	Liso	Si
	U72	Compacta	Lisa	Circular	Ondulado	Si
	U73	Algodonosa	Umbonada	Irregular	Ondulado	No
	U77	Compacta	Lisa	Circular	Liso	No
	U79	Compacta	Rugosa	Irregular	Ondulado	No

	U90	Compacta	Rugosa	Irregular	Ondulado	No
	U94	Compacta	Rugosa	Irregular	Ondulado	No
	U95	Compacta	Rugosa	Circular	Ondulado	No
	U96	Compacta	Rugosa	Irregular	Ondulado	No
	U98	Compacta	Umbonada	Circular	Ondulado	Si
	U99	Compacta	Umbonada	Circular	Lobulado	No
	U100	Compacta	Rugosa	Irregular	Liso	No
P. Dilatatum	U31	Compacta	Umbonada	Circular	Ondulado	No
	U80	Compacta	Umbonada	Circular	Ondulado	No
	U93	Compacta	Rugosa	Circular	Lobulado	No
	U29	Algodonosa	Lisa	Irregular	Ondulado	No
P. Urvillei	U59	Algodonosa	Rugosa	Irregular	Filamentoso	Si
	U75	Compacta	Lisa	Circular	Liso	Si
	U97	Compacta	Umbonada	Circular	Ondulado	No
P. Malacophyllum	U69	Algodonosa	Umbonada	Circular	Filamentoso	Si
	U70	Algodonosa	Lisa	Circular	Ondulado	Si
P. Notatum	U74	Compacta	Ondulada	Irregular	Ondulado	No
	U91	Compacta	Crateriforme	Circular	Liso	No
	U85	Compacta	Rugosa	Circular	Liso	No