

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



CARACTERES DEL SORGO *Sorghum bicolor* (L.)
Moench ASOCIADOS A LA RESISTENCIA A
ERGOT (*Claviceps africana*)

POR

EVELYN ORTIZ PEREZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
AGRICOLAS

JUNIO, 2001

TM

Z5071

FA

2001

.07



1020145421

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



**CARACTERE DEL SORGO *Sorghum bicolor* L.
Voench ASOCIADOS A LA RESISTENCIA A
ERGOT *Claviceps atricana***

POR

EVELYN ORTIZ PEREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
AGRICOLAS**

JUNIO 001

310849

T1
Z507
FA
2001
09



FONDO
TESIS

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido cumplir esta meta.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, en particular a la Facultad de Agronomía por la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

Al Ph D. Francisco Zavala García por su apoyo y guía fundamental , sin la cual no hubiera podido realizar esta tesis.

Al Ph. D. Gilberto E. Salinas García por su valiosa colaboración.

Al Dr Hazael Gutierrez Mauleón por su apoyo en la revisión de esta tesis.

A la Ing. Nora E. García Treviño por su enseñanza, su invaluable colaboración y sobre todo por brindarme su entrañable amistad.

A los Sres. Rogelio Meza Zúñiga y Javier Sánchez Marín por su ayuda incondicional y por hacer tan grata mi estancia.

CARACTERES DEL SORGO [*Sorghum bicolor* (L.)
Moench] ASOCIADOS A SU RESISTENCIA A
ERGOT (*Claviceps africana*)

Aprobación de la Tesis:

Ph D. Francisco Zavala Garcia.
Asesor principal

Ph. D. Gilberto E. Salinas García
co-Asesor

Dr. Hazael Gutierrez Mauleón
co-Asesor

Ph. D. Ciro G. Valdés Lozano
Subdirector de Estudios de Postgrado

DEDICATORIAS

A mis padres Esteban Ortiz Carvajal y María Teodomira Pérez, por darme la vida y apoyarme en todo momento.

A mi abuelita Alexandra por sus cuidados y el preferente cariño que siempre me ha demostrado.

A mi tía Alex por su paciencia y preocupación hacia mí.

A Yuli , por estar siempre a mi lado.

A todos mis amigos, en especial al Ing Mariano Molina Velázquez por su amistad de tanto tiempo.

A doña Teresita y don Arturo por apoyarme en momentos difíciles.

A mi novio, Jorge Esteban De Jesús, por el amor que me inspira y me hace seguir adelante.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
TABLA DE CONTENIDO.....	v
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FOTOGRAFIAS.....	xi
LISTA DE GRÁFICAS.....	xiii
LISTA DE CUADROS DEL APENDICE.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
SUMMARY.....	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Organismos causales del ergot del sorgo.....	4
2.1.1. Anamorfos.....	5
2.1.2. Teleomorfos.....	6
2.2. Distribución de las especies de <i>Claviceps</i>	6
2.3. Sintomatología de las especies de <i>Claviceps</i>	7
2.3.1. <i>Claviceps africana</i>	8
2.4. Clasificación taxonómica del ergot del sorgo.....	9
2.4.1. Criterios para clasificar especies de <i>ergot</i>	10
2.4.2. Dispersión de conidios de <i>Claviceps</i>	11
2.5. Factores relacionados con la incidencia del ergot.....	13

4.1. Experimento 1.....	54
4.2. Experimento 2.....	66
VI. CONCLUSIONES.....	92
VII. APÉNDICE.....	94
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	101

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Porcentaje promedio de daño por ergot en líneas hembra, sus combinaciones híbridas con 10 progenitores, y un híbrido comercial. Escobedo, N.L. México.....	34
2. Material genético utilizado en el experimento para conteo de granos de polen.....	44
3. Medio basal de cultivo líquido para polen, propuesto por Campbell y Scarth (Citados por Lansac <i>et al.</i> , 1994).....	48
4. Genotipos híbridos y progenitores que se evaluaron en el ciclo P-V 2000.....	50
5. Resultados de ANOVA para las variables días a floración, longitud de panoja y florecillas infectadas por panoja.....	54
6. Comparación de medias de la variable días a floración, línea ATX398 con los tipos de citoplasma A ₁ , A ₂ , A ₃ y A ₄	55
7. Comparación de medias de la variable longitud de panoja, la línea ATX398 con los tipos de citoplasma A ₁ , A ₂ , A ₃ y A ₄	56
8. Comparación de medias de la variable número de florecillas por panoja de la línea isogénica ATX398 con los tipos de citoplasma A ₁ , A ₂ , A ₃ y A ₄	57
9. Comparación de medias de la variable número de florecillas infectadas por panoja de la línea ATX398 con los tipos de citoplasma A ₁ , A ₂ , A ₃ y A ₄	62
10. Resultados de ANOVA para las variables días a floración, longitud de panoja, espiguillas por panoja y granos de polen por florecilla.....	67

11. Resultados de ANOVA para las variables días a floración, longitud de panoja, espiguillas por panoja y granos de polen por florecilla. Ciclo P-V 2000.....	67
12. Comparación de medias de la variable días a floración de progenitores masculinos ciclo P-V1999.....	68
13. Comparación de medias de la variable días a floración de progenitores masculinos ciclo P-V 2000.....	69
14. Comparación de medias de la variable longitud de panoja de progenitores masculinos ciclo P-V 1999.....	70
15. Comparación de medias de la variable longitud de panoja de progenitores masculinos ciclo P-V 2000.....	71
16. Comparación de medias de la variable número de espiguillas por panoja de progenitores masculinos ciclo P-V 1999.....	72
17. Comparación de medias de la variable número de espiguillas por panoja de progenitores masculinos ciclo P-V 2000.....	73
18. Comparación de medias de la variable número de granos de polen por florecilla de progenitores masculinos ciclo P-V 1999.....	74
19. Comparación de medias de la variable número de granos de polen por florecilla de progenitores ciclo P-V 2000.....	75
20. Porcentaje de germinación de polen en progenitores masculinos, Ciclo P-V 2000	77
21. Resultados de ANOVA para las variables días a floración, longitud de panoja, espiguillas por panoja y granos de polen por florecilla en híbridos.....	79
22. Comparación de medias de la variable días a floración de híbridos. Ciclo P-V 2000.....	80

23. Comparación de medias de la variable longitud de panoja híbridos. Ciclo P-V 2000.....	82
24. Comparación de medias de la variable número de espiguillas por panoja de híbridos Ciclo P-V 2000.....	83
25. Comparación de medias de la variable número de granos de polen por florecilla de híbridos. Ciclo P-V 2000.....	84
26. Porcentaje de germinación de polen en híbridos.....	86
27. ANOVA de regresión simple del progenitor 10251 y su progenie. Ciclo P-V 2000.....	87
28. Valores de t calculada y niveles de significancia observados. Regresión simple del progenitor 10251 y su progenie. Ciclo P-V 2000.....	87
29. ANOVA de regresión simple del progenitor FA170 y su progenie. Ciclo P-V 2000.....	88
30. Valores de t calculada y niveles de significancia observados. Regresión simple del progenitor FA170 y su progenie. Ciclo P-V 2000.....	88

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía	Página
1. Planta con la panoja cubierta por una bolsa de plástico Ciclo O-I 1999.....	39
2. Panojas de la línea androestéril ATX398 A ₁ después de haber sido inoculadas. Ciclo O-I1999.....	39
3. Panojas de la línea androestéril ATX398 A ₂ después de haber sido inoculadas Ciclo O-I 1999.....	40
4. Panojas de la línea androestéril ATX398 A ₃ después de haber sido inoculadas Ciclo O-I 1999.....	40
5. Panojas de la línea androestéril ATX398 A ₄ después de haber sido inoculadas. Ciclo O-I 1999.....	41
6. Momento en el que fueron tomadas las muestras de espiguillas de los progenitores masculinos para realizar el conteo de polen.....	45
7. Muestra de espiguilla correspondiente al primer tercio de la panoja.....	45
8. Tubo eppendorf conteniendo un volumen de 30 μ L de H ₂ SO ₄ al 99% en el que se depositaron las tres anteras pertenecientes a cada florecilla.....	46
9. Ovario de una flor de sorgo atacado por ergot después de tres días de la inoculación.....	58
10. Ovario de una flor de sorgo atacado por ergot después de cuatro días de la inoculación.....	59
11. Ovario de una flor de sorgo completamente afectado por ergot a los seis días después de la inoculación.....	60
12. Exudación de la mielecilla en las flores dañadas por ergot a los siete días de la inoculación.....	61
13. Panoja perteneciente al citoplasma A ₁ . infectada por el hongo.....	63

14. Panoja infectada por el hongo perteneciente al citoplasma A ₂	63
15. Panoja perteneciente al citoplasma A ₃ . infectada por el hongo.....	64
16. Panoja perteneciente al citoplasma A ₄ . infectada por el hongo.....	64
17. Granos de polen en la cuadrícula Neubauer observados al microscopio en dos genotipos contrastantes.....	76

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Pendiente de regresión de la línea 10251 y su progenie. Ciclo P-V 2000. Caracteres asociados a la resistencia a ergot.....	88
2. Pendiente de regresión de la línea FA170 y su progenie. Ciclo P-V 2000. Caracteres asociados a la resistencia a ergot.....	89

RESUMEN

En México, el sorgo es el primer insumo de la industria de alimentos balanceados. En 1999 se sembraron 2.142 millones de hectáreas con este cultivo, principalmente con materiales híbridos (INEGI, 2000). Entre los problemas de tipo biótico que limitan la producción, se le ha añadido de manera reciente el ergot, una enfermedad causada por el hongo *Claviceps africana*. Este hongo fue observado por primera vez en México en 1997. El problema que ocasiona es que impide la formación de semilla, ya que este patógeno destruye por completo el ovario de flores que no han sido polinizadas, de ahí la mayor sensibilidad de las líneas androestériles utilizadas en la formación de semilla híbrida. Considerando la importancia del polen en la presencia del ergot, así como la evaluación de líneas androestériles que pudieran resultar resistentes, se plantearon los siguientes objetivos: 1. Evaluar el citoplasma en la respuesta al ataque de ergot. 2. Caracterizar a un grupo de progenitores macho en relación a la producción de polen, y determinar la herencia de este carácter. La evaluación con respecto a los tipos de citoplasma se realizó en el ciclo primavera-verano 2000. Todas las variables observadas mostraron diferencias significativas. En cuanto a la respuesta a la infección del hongo, la línea A₄Tx398 mostró el menor número de florecillas infectadas por ergot (9 florecillas), mientras que la línea A₁Tx398, tuvo la mayor cantidad de florecillas infectadas (75 florecillas). Para el segundo objetivo, se utilizaron los progenitores 10331, FA90, 10330, 10251, Pioneer 8282*, 10333, FA163, 10106,

102490 y FA170, en dos ciclos, así como los híbridos producto del cruzamientos de las líneas isogénicas ATx398 con citoplasmas A₁, A₂, A₃, y A₄ con la línea FA170, y la línea 10251. Entre los resultados obtenidos, se encontraron diferencias significativas en todas las variables, observando diferencias en cuanto al orden de los valores en ambos ciclos. En invernadero, el progenitor que tuvo la mayor producción de polen por florecilla fue el progenitor FA163 (12,689); y la menor producción la línea 10251 (6,055) mientras que, en campo, el progenitor FA90 mostró la mayor producción (15,000), la menor producción se observó en el progenitor 10249 (5,400). En relación a la viabilidad del polen, el progenitor que presentó la más alta viabilidad fue el progenitor 10249 (89%), mientras que el progenitor FA170 presentó el menor valor (69%). En relación a los híbridos, el FA170/ A₃ (12400), presentó el valor más alto, mientras que la menor producción se observó en el híbrido FA170/ A₂ (9,101). Con respecto a la viabilidad del polen, el híbrido que presentó los mayores valores fue el FA170/A₁ (92%), y el que presentó la menor viabilidad fue el 10251/A₁ (58%). En relación a la heredabilidad del carácter producción de polen, se encontró una heredabilidad negativa posiblemente debido un efecto de dominancia del progenitor androestéril.

SUMMARY

In México, the sorghum is the first product for animal feed. In 1999 were sown 2.142 millions of hectares with hybrids (INEGI, 2000). Among the most important limiting factors for grain production are insect and disease such as midge fly (*Cantarina sorghicola*) and charcoal rot (*Macrophomonia phaseolina*), respectively. However, a new disease called ergot o sugary disease (*Claviceps spp*) has showed up in Mexico since 1997. The damage is on the ovary of flowers avoiding grain production . Female parents are particularly susceptible due to the lack of pollen production. We have considered the importance of pollen grain production and the evaluation of male sterile lines that could be resistance, therefore the objectives were to evaluate different types of cytoplasm for ergot resistance and characterize a group of male parents in relation to pollen production and to evaluate the heretability of this trait. To evaluate the resistance to ergot, one experiment was conducted during the spring of 2000, in a greenhouse. We tested a group of four isogenic females lines with diferent cytoplasms: A₁Tx398, A₂Tx398, A₃Tx398 y A₄Tx398. The response of the genotypes to the infection by ergot was different. The isogenic line A₄Tx398 had the lowest value of infected flowers (9); whereas, the isogenic line A₁Tx398, had the highest value of infected flowers. The male fertile lines used in the experiment for to second objective were: 10331, FA90, 10330, 10251, Pioneer 8282*,10333, FA163, 10106, 102490 and FA170. In Winter 1999, the isogenic

line ATx398 with four types of Cytoplasm (A_1 , A_2 , A_3 y A_4) were crossed with two of the male fertile parents, the line FA170 and the line 10251. In spring 2000, the group of male sterile parents was sown again with the hybrids. The results showed significant differences in all the variables. In greenhouse, the male fertile line FA163 had the highest pollen production (12,689), and the line 10251 had the lowest value ((6,055), whereas, in the field, the line FA90 had the highest production (15,000), and the lowest production was observed in the line 10249 (5,400). In relation to pollen viability in the spring 2000, the male fertile line 10249, had the highest viability percentage (89%); whereas the male fertile line FA170 had the lowest value. In relation to hybrids, were founded statistical differences in all the variables. The hybrid FA170/ A_3 had the highest pollen production per flower (12,400) and the hybrid FA170 / A_2 had the lowest value (9,100), in relation to viability, the hybrid FA170 A_1 shown the highest value (92%), and the hybrid 10251 A_1 had the lowest value (58%). The heretability values were negative.

INTRODUCCION

El sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] ocupa el quinto lugar a nivel mundial en importancia dentro de los cereales cultivados. En todo el mundo se cultivan alrededor de 45 millones de hectáreas (FAO, 1998). El cambio más significativo en la tecnología de su producción ocurrió a partir de la década de los 60's con el desarrollo y uso de semilla híbrida F₁, la cual incrementó de manera considerable la productividad del cultivo (Bandyopadhyay *et al.*, 1998).

Entre los principales problemas que afectan la producción de sorgo en México se encuentran: sequía (por baja e irregular distribución de lluvias), manejo inadecuado de suelo para la conservación de la humedad, altos costos de producción, precio bajo del grano, fertilidad del suelo baja y suelos salinos y mal drenados (SAGAR, 1997). Existen además factores bióticos como plagas y enfermedades, que también limitan la producción de grano; entre los primeros podemos mencionar a la mosca de la panoja (*Contarinia sorguícola* Coquillet) y la chinche café (*Oebalus pugnax* Fabricius). Las enfermedades más comunes son: carbón de la panoja (*Sporisorium reilianum* Fullerton), pudrición carbonosa del tallo [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid], moho del grano (*Curvularia spp.* y *Fusarium spp.*), roya (*Puccinia purpurea* Cooke), tizón de la panoja (*Fusarium moniliforme* Sheld), mancha zonada (*Gloeocercospora sorghi* D. Bain y Edg), tizón de la hoja (*Exserohilum torcicum* Pass) y recientemente ergot ó enfermedad azucarada (*Claviceps spp.*).

El ergot es una enfermedad de reciente aparición en México (Febrero, 1997) por lo que los estudios de la biología del patógeno así como de las posibles formas de limitar su ataque, se encuentran en etapas iniciales en nuestro país; no así en otras regiones del mundo, como en la India, donde es un patógeno que ha sido ampliamente estudiado. El ergot es una enfermedad fungosa que afecta el proceso de formación de semilla híbrida, principalmente cuando la coincidencia de floración entre los progenitores no es completa, siendo particularmente severo en líneas androestériles. En la India se reportaron pérdidas en la producción de grano del 10 al 80 % causadas por ergot. De manera similar, en Zimbawe, las pérdidas en la producción de grano fueron del 12 al 25 % y ocasionalmente pérdidas totales. La cantidad, vigor y viabilidad del polen, son de vital importancia en la presencia de ergot, ya que tanto en la producción de semilla, como de grano, se presenta un fenómeno de competencia entre el polen y el hongo para fertilizar e infectar el ovario (Bandyopadhyay *et al.*, 1998).

El ergot, además de reducir el rendimiento de semilla, incrementa los costos de producción a través de acciones tales como: La necesidad de aplicación extra de agroquímicos, modificaciones en el método de cosecha y manejo de semilla, además de problemas de comercialización; sin embargo, ninguna de estas prácticas incrementa la calidad de las semillas que normalmente se logra en ausencia de ergot, por lo que los trabajos de investigación que se realicen en

la búsqueda de opciones ante esta problemática, adquieren una especial relevancia.

La aparición reciente de ergot en México explica la escasez de trabajos en relación a los caracteres del sorgo que pueden estar influyendo en la susceptibilidad o resistencia a esta enfermedad. Por tal motivo se estableció el presente trabajo con el fin de cubrir los siguientes objetivos:

1. Evaluar el tipo de plasmagenes en la respuesta del sorgo al ataque de ergot.
2. Caracterizar a un grupo de progenitores macho en relación a la producción de polen, y determinar su heredabilidad.

1.1. Hipótesis.

Entre los genotipos y aún entre líneas isogénicas, se ha observado un comportamiento distinto ante la presencia de ergot; y considerando que el polen juega un papel muy importante en la incidencia de la enfermedad, se plantean las siguientes hipótesis :

1. La Constitución citoplasmática de los genotipos determina su respuesta a la infección de ergot.
2. La producción de polen es variable entre los genotipos androfértiles e híbridos debido a su diferente constitución genética.

II. REVISION DE LITERATURA.

En México, el área de siembra con el cultivo del sorgo fue de 2.142 millones de hectáreas con una producción de 6.043 millones de toneladas en 1999 (INEGI, 2000). El sorgo constituye el principal insumo de la industria de alimentos balanceados cuyo destino principal es la ganadería de bovinos, cerdos y aves. Considerando que el 90% de la semilla que se utiliza en siembras comerciales es híbrida, y que el ergot afecta el proceso de formación de semilla F_1 , el conocimiento de la biología de este patógeno es de especial importancia, esto sin considerar otros aspectos en los que el ergot afecta tales como reducción en la calidad del grano, hace difícil la trilla, la germinación y la emergencia, predispone a las plantas a otras enfermedades y obstruye la comercialización del grano que frecuentemente es rechazado por el agricultor,

2.1 Organismos causales del ergot del sorgo.

El sorgo es únicamente hospedero de tres especies de ergot: *Claviceps sorghi* (Kulkarni, 1976), *C. africana* (Frederickson *et al.*, 1991) y *C. species*. *C. sorghi* ha sido únicamente encontrado en Asia, *C. africana* es el típico patógeno de Africa, así como en Tailandia y Japón (Mantle y Hassan, 1994), y más recientemente en Brasil y Australia (Reis *et al.*, citados por Bandyopadhyay *et al.*, 1998). El tercer patógeno, aún sin denominar, parece estar presente solamente en Japón. La forma asexual de *C. africana* y *C. sorghi* ha sido

comparada en un gran número de investigaciones, las cuales consideraron composición de mielecilla, alcaloides, formas teleomórficas y otras características concluyendo que son dos especies distintas (Frederickson *et al.*, 1991).

2.1.1 Anamorfos

La forma asexual de las tres especies de *Claviceps* que infectan al sorgo es *Sphacelia sorghi*, produce tres tipos de células sencillas o esporas hialinas: macroconidios de oblongos a ovals, microconidios esféricos y conidios secundarios en forma de pera. La formación de conidios secundarios es única por la rapidez y la manera en que ocurre (Frederickson *et al.*, 1989).

La formación de conidios es el resultado de una germinación repetitiva (germinación de una espora que directamente produce otra espora) de macroconidios en la superficie de la mielecilla cuando la humedad relativa es alta. Los macroconidios dentro de la mielecilla, no germinan por la alta presión osmótica de la propia mielecilla o por la naturaleza inhibitoria de los azúcares; sin embargo, el agua absorbida de la lluvia o el rocío bajan la presión osmótica diluyendo los azúcares inhibitorios y volviéndola más delgada; como resultado, los macroconidios en la superficie de la mielecilla germinan repetitivamente formando tubos germinativos fuera de la superficie de la mielecilla. Estos tubos

germinativos terminan en un conidio secundario apical que es fácilmente desprendido y diseminado (Bandyopadhyay *et al.*, 1992).

2.1.2 Teleomorfos

En sus inicios, el estroma peritecial de las especies de *Claviceps* parecen una pálida y globosa proliferación de esclerocios. Estas fructificaciones en principio son amarillentas, posteriormente se tornan púrpuras hasta que finalmente se observan negras. En el estroma se forman los peritecios en forma de “balón” con una abertura hacia el exterior. Dentro de los peritecios se encuentran los ascos, cada uno conteniendo ocho ascosporas filiformes (Frederickson *et al.*, 1991).

2.2 Distribucion de las especies de *Claviceps*

El ergot del sorgo fue observado por primera vez en la India en 1915 y fue descrito por McRae en 1917 (Bandyopadhyay *et al.*, 1996). Se fue extendiendo en ese país y fue confirmado en 1948 cuando Ramakrishinann lo encontró en el estado Andhra Pradesh, India. Todos los reportes obtenidos representan al patógeno *Claviceps sorghi* (Chen *et al.*, citados por Bandyopadhyay *et al.*, 1996).

En Africa, el hongo fue reconocido primeramente en la región Oriental, encontrándose en Kenia en 1924, Uganda en 1926, Tanzania en 1949. En 1986 fue confirmado en Zimbabwe. Todos los reportes de Africa correspondieron al patógeno *Claviceps africana* (Frederickson *et al.*, 1991).

Hasta 1995 la enfermedad estuvo limitada en su distribución a Asia y Africa, pero en ese año los agricultores de Brasil se vieron seriamente afectados por la repentina aparición y diseminación de este patógeno (Reis *et al.*, citados por Bandyopadhyay *et al.*, 1998).

En México, los primeros reportes de la aparición del ergot se dieron en 1997, en San Fernando, Tamaulipas. Posteriormente se encontró en Mante y Altamira, Tamaulipas; Ebano, San Luis Potosí y Pánuco, Veracruz. En México, la distribución es amplia, encontrándose la enfermedad en 11 Estados en donde están las principales zonas productoras de sorgo (Aguirre *et al.*, 1997).

2.3 Sintomatología de las especies de *Claviceps*

El ergot solamente ataca ovarios de flores de sorgo sin fertilizar, los ovarios dentro de una panoja de sorgo son individualmente infectados. Hay dos signos evidentes de la enfermedad en el campo: el primero es la presencia de un micelio algodonoso entre las glumas de las flores infectadas; el segundo signo de ergot es la formación de mielecilla en las flores infectadas. La mielecilla es

un delgado y viscoso fluido que contiene conidios. Las gotas de la mielecilla formada son incoloras y transparentes, pero progresivamente comienzan a hacerse opacas (Bandyopadhyay *et al.*, 1998). Con el paso del tiempo, la mielecilla comienza a cambiar uniformemente de amarillo marrón a rosa con una superficie blanca. Las gotas pueden permanecer intactas o escurrir hasta flores sin infectar, semillas, hojas y suelo. Cuando la humedad relativa es alta, se tornan blanco-opacas con una cubierta espumosa donde los conidios secundarios son producidos. Las panojas así infectadas son bastante visibles; éstas también pueden ser atacadas por el crecimiento de *Cerebella spp* que es un hongo de hábitos saprófitos que forma una cubierta negra sobre las flores infectadas (Bandyopadhyay *et al.*, 1996).

2.3.1. *Claviceps africana*

De acuerdo con Frederickson *et al.* (1991), cuando los tejidos del ovario han sido completamente colonizados por el hongo, lo cual ocurre en un período de seis a ocho días, la infección individual de *Claviceps africana* comienza a ser visible como un micelio fungoso abultado, suave, de forma esférica a oval, color blanco proyectándose entre las glumas.

La exudación de mielecilla comienza un día después en forma de gotas transparentes. En los días sucesivos, las gotas se ensanchan apareciendo superficialmente de color blanco mate, no viscosas y transparentes en la parte

baja. La capa de la superficie contiene macroconidios germinando, soportados por conidios secundarios. Las gotas de la mielecilla pueden derramarse en cascada sobre las panojas volviéndolas macroscópicamente blancas, siendo éste un signo característico de la enfermedad. Después de un período de lluvia, porciones pequeñas de mielecilla pueden colectarse en el suelo en la base de una planta infectada.

Bajo condiciones secas, la mielecilla de las flores infectadas forma gotas viscosas de color naranja-café. Después de varias semanas, el suave tejido del micelio es reemplazado por un tejido duro y compacto. La mielecilla seca puede encostrarse en las panículas (Frederickson *et al.*, 1989).

2.4. Clasificación taxonómica del ergot del sorgo.

La clasificación taxonómica tiene como objetivo unificar criterios respecto a la ubicación de un individuo dentro de la escala biológica considerando las características que lo relacionan o lo distinguen de otros. En el caso de las especies que causan el ergot del sorgo, los patógenos caracterizados son tres: *Claviceps africana*, *Claviceps sorghi* y *Claviceps species*. Su clasificación taxonómica se da a continuación (Alexopoulos, 1961).

Reino	Fungi.
División	Mycota.
Subdivisión	Ascomycotina.
Clase	Ascomycete.
Subclase	Euascomycetidae.
Orden	Hipocreales.
Familia	Clavicipitaceae .
Género	<i>Claviceps</i> .
Especie	<i>spp.</i>

2.4.1. Criterios para clasificar especies de *Claviceps*

Las tres especies de *Claviceps* se distinguen principalmente por la morfología de sus ascas y esclerocios y por la producción de alcaloides. El esclerocio de *Claviceps africana* es esférico y está confinado dentro de las glumas del hospedero. El esclerocio de *Claviceps sorghi* es delgado y elongado proyectándose entre las glumas, el de *Claviceps spp.* es cónico elongado y negro púrpura. El alcaloide dihidroergocina es sintetizado por los esclerocios de *Claviceps africana*, mientras que en *Claviceps spp.* los esclerocios pueden contener pequeñas cantidades del alcaloide paliclavina. *C. sorghi* no sintetiza alcaloides (Mantle, 1968). Bajo condiciones normales es común la formación de

conidios secundarios en *C. sorghi* y *C. africana*, pero nunca se ha visto en *Claviceps* spp (Mantle, 1968).

2.4.2. Dispersión de conidios de las especies de *Claviceps*

Como se mencionó antes, las espiguillas exudan gotas suaves y compactas de fluido meloso conteniendo conidios y macroconidios. Futrell y Webster (1965) sugirieron que los conidios son dispersados por la lluvia que disuelve la mielecilla y por los insectos que se alimentan de ella. Bandyopadhyay *et al.* (1991) confirmaron la dispersión por lluvia en detallados experimentos de campo. También demostraron que insectos tales como trips (*Orius spp*), visitan panículas infectadas transportando de esta manera conidios en su cuerpo. Sin embargo, cuando tales insectos fueron colocados en jaulas junto con panículas susceptibles, no fueron eficaces para transmitir el patógeno, sugiriendo que los insectos no juegan un papel importante en la dispersión. La ecología de los insectos es tal, que normalmente la composición de las especies de insectos encontradas en panículas en floración es diferente a la de estados posteriores a la exudación de la mielecilla, por lo que los insectos que portan el inóculo deben visitar espiguillas antes o durante la floración para poder diseminar el patógeno.

La diseminación por viento de conidios secundarios es la forma más importante de dispersión en el ámbito local y a largas distancias (Frederickson *et al.*, 1989). En experimentos de trapeo de esporas, un patrón diurno de concentración de conidios secundarios fue evidente. La formación de conidios

secundarios no ocurrió cuando hubo una sucesión de días cálidos y secos (Frederickson *et al.*, 1989).

La adaptación del patógeno a las condiciones ambientales es única. Bajo condiciones secas, el patógeno permanece en su forma original de espora (macroconidios y conidios) la cual va a depender de la lluvia para tener condiciones favorables para su dispersión e infección. Sin embargo, si existen las condiciones favorables de temperatura y humedad, los patógenos rápidamente producen abundantes conidios secundarios. Los conidios secundarios germinados en el suelo pueden tener implicaciones como una fuente de inóculo primario para el inicio de la enfermedad en el campo (Bandyopadhyay *et al.*, 1991).

La introducción del ergot en Brasil y Australia en 1995 y su diseminación en 1996 en países como Argentina, Bolivia, Paraguay y Uruguay, hasta llegar en 1997 a Puerto Rico, República Dominicana, México y Estados Unidos, así como su dispersión dentro de estos países, ofrece buen ejemplo del potencial de diseminación a largas distancias. Es también ejemplar la rapidez con la cual la epifitía puede extenderse a lo largo de grandes áreas geográficas (Ryley *et al.*, 1996).

2.5. factores asociados con la incidencia del ergot

2.5.1 Interacción polen-patógeno

Desde el momento en que el patógeno infecta y coloniza solamente el gineceo, el conocimiento de la inflorescencia es esencial para entender la enfermedad. La panícula de sorgo es un racimo; durante la floración, las glumas normalmente abren en la mañana y el estigma y las anteras emergen; las anteras desprenden el polen y después las glumas cierran; sin embargo, el proceso de floración puede variar significativamente en diferentes ambientes y genotipos. Por ejemplo, en algunos genotipos los estigmas emergen de las glumas y permanecen expuestos por lo menos 72 horas antes de la apertura floral. El momento de la apertura floral, su duración, la viabilidad del polen, la duración de la receptividad del estigma van a depender del genotipo y de las condiciones ambientales (Stephens y Quinby, 1934).

En las panículas, las partes más críticas en el proceso de infección y colonización de este hongo son el estigma y las anteras. Normalmente un estigma es polinizado tan pronto es expuesto. El polen germina dentro de los 30 minutos siguientes y la fertilización ocurre en las próximas 2-12 hr (Stephens y Quinby, 1934).

Por otra parte, los conidios del hongo requieren de 8-12 hr para la germinación en el estigma y de 36-48 hr para alcanzar la base del ovario. Las

conidias germinan en el estigma produciendo de 1 a 4 tubos germinales. Después de penetrar la papila estigmática, la infección hifal crece intercelularmente progresando a través de las células del estilo arriba del ovario y en los tejidos de la pared interna del ovario adyacentes al óvulo hasta finalmente alcanzar los tejidos vasculares. Solamente hasta el contacto con los haces vasculares, el hongo puede rápidamente colonizar de forma acropétala el ovario, alcanzando este desarrollo hifal los tejidos del óvulo. Finalmente el ovario es reemplazado con una suave masa hifal, llamada sphacelia. Aún cuando se sigue el mismo esquema, los tiempos de éstos eventos fluctúan de flores a flores y están fuertemente influenciados por las condiciones ambientales (Bandyopadhyay *et al.*, 1991).

2.5.2 Humedad y temperatura.

La relación entre la incidencia de ergot con la temperatura y la humedad ha sido manifiesta en diversos experimentos. Frederickson (1993) registró un porcentaje de incidencia de ergot de 26% a 25°C y de 0.9% a 30°C. De manera similar, el periodo de infección fue más corto a temperaturas más bajas. Este rango de temperatura es parecido al definido por McLaren y Wenher (1990), quienes determinaron como temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad 19.5°C y el límite máximo a 28° C, por arriba de la cual, la incidencia es menor.

Anahousur y Patil (1982) concluyeron que temperaturas de 19 – 21°C con 67 - 84% de humedad relativa después de la emergencia de la panícula, son suficientes para la infección en líneas androestériles. Este valor fue similar al 75% de humedad relativa a 20°C, determinado por Gupta *et al.* (1983) para la infección en mijo perla por *Claviceps fusiformis*.

Bandhyopadhyay *et al.* (1990) mostraron que la temperatura y la humedad relativa afectan la formación de mielecilla y la producción de esporas, pero no así el desarrollo estromático. Temperaturas de 14–28°C combinada con una humedad relativa de 90% durante 12-16 hr diarias, condujeron a la producción de conidios, pero no de esclerocios. En contraste, a los 28–35°C y humedad relativa debajo de 90% por 22 hr, el estroma desarrolló esclerocios; mientras que la producción de mielecilla y conidios fue suprimida.

2.5.3 Genética y mecanismos de resistencia

2.5.3.1. Androesterilidad

La esterilidad es la incapacidad de las plantas para producir gametos o cigotos viables; en este caso no es posible ni la autofecundación ni el cruzamiento utilizándolo como macho. Se pueden presentar diversos grados de esterilidad y varias son las causas, siendo las de mayor importancia las

siguientes: Aberraciones cromosómicas como fenómeno de poliploidía, heteroploidía, inversiones, traslocaciones, falta de homología entre los genomas, genes que afectan a los órganos reproductores, esterilidad que afecta únicamente al polen (Lacadena, 1970; Allard, 1978). La esterilidad que afecta únicamente la capacidad de producir polen o que éste sea viable se denomina androesterilidad. Allard (1978) dividió la androesterilidad en tres categorías: La androesterilidad genética, la androesterilidad citoplásmica y la androesterilidad genética-citoplásmica.

2.5.3.1.1 Androesterilidad genética.

Se han encontrado ejemplos de androesterilidad genética controlada por un solo gen en muchas especies cultivadas. Lacadena (1970) mencionó que normalmente, la regulación génica de la androesterilidad está determinada por uno o pocos genes recesivos que suelen representarse por "ms" (male sterile) y un subíndice cuando hay varios de ellos, pero también puede estar controlado por genes dominantes o por la interacción de genes dominantes-recesivos. Erichsen y Ross (citados por Chang, 1992) encontraron que la androesterilidad genética es controlada por par de genes simples recesivos en algunas especies y más de un par de genes recesivos en otras.

Márquez (1973) señaló que cuando se utiliza la androesterilidad de origen genético para la hibridación, deben tenerse en cuenta dos cosas si el producto que va a aprovecharse es el grano: 1) como las plantas estériles no producen

polen, debe buscarse alguna forma en que se mantenga y perpetúe el progenitor estéril sin menoscabo de su contenido genotípico, diferente al causante de tal esterilidad y 2) que la semilla híbrida que se entregue debe producir plantas que sean fértiles para asegurar la fecundación por polinización libre y así la producción de grano. Dogget *et al.* (citados por House, 1982) mencionaron que el gen ms_3 es el más extensamente usado, porque la expresión de la esterilidad masculina es buena y estable en diferentes ambientes. Ha sido de gran utilidad la esterilidad masculina causada por la condición recesiva del gen ms_7 . También ha sido útil la esterilidad sin antera (al). Este carácter fue encontrado en Texas en 1928 y reportado por Harper y Stephens (citados por Webster, 1964). Ellos le atribuyeron que es heredado como un gen recesivo simple. Webster (1964) condujo un experimento con 40 F_1 en 40 bloques y encontró el carácter sin antera en 16 bloques y concluyó que el carácter sin antera es heredado independientemente del gen ms_3 .

2.5.3.1.2 Androesterilidad citoplásmica.

La característica esencial de la androesterilidad determinada por genes citoplásmicos es que se transmite de forma continua de generación en generación vía materna siempre que se disponga de un individuo que actúe como polinizador. Toda la descendencia de las plantas androestériles es también androestéril, cualquiera que sea el polen utilizado como progenitor masculino, ya que su citoplasma se deriva por completo del gameto femenino (Allard, 1978).

2.5.3.1.3 Androesterilidad genética-citoplásmica.

Hasta 1950 se encontró la androesterilidad masculina parcial en la progenie de cruces en la que se utilizó el Milo como progenitor femenino. Por medio del retrocruzamiento con Kafir, se aumentó la esterilidad y en la segunda retrocruza se obtuvo más del 99% de esterilidad masculina. Este fue el resultado de la interacción entre el citoplasma del Milo y el genoma nuclear de Kafir. Cuando se utilizó el tipo milo como progenitor masculino se restauró la fertilidad en las plantas androestériles (Stephens y Holland, 1954).

En general, Milo y derivados de Milo confieren fertilidad mientras que Kafir y derivados de Kafir producen androesterilidad en la F_1 (Stephens y Holland, 1954). El grado de esterilidad aumenta cuando se incrementa la proporción de cromosomas de Kafir en el citoplasma de Milo. La androesterilidad completa puede ser posible reemplazando todos los cromosomas de milo por los de Kafir (Stephens y Holland, 1954).

Lacadena (1970) y Allard (1978) reportaron que la diferencia de este tipo de androesterilidad y la citoplásmica estriba en que la descendencia obtenida por el cruzamiento de una planta androestéril, como hembra y una fértil no tiene que ser necesariamente androestéril, sino que depende del genotipo de la planta que actúe como macho polinizador. Los progenitores que dan una

descendencia F_1 androfértil, llevan genes que tienen la facultad de restaurar la aptitud de producir polen en el citoplasma androestéril, de esta forma, los casos de androesterilidad citoplásmica se transforman en este tipo de androesterilidad simplemente gracias al descubrimiento de los genes restauradores. Así mismo, el gen dominante R determina la fertilidad sea cual fuese el citoplasma y tanto si se presenta en homocigosis como en heterocigosis, a este gen se le llamó restaurador. Por lo tanto los factores potenciales de la androesterilidad (E) sólo se manifiestan como tales en ausencia del gen dominante restaurador "R".

La androesterilidad genético-citoplásmica en sorgo para grano está controlada por un gen nuclear recesivo que interacciona con el citoplasma estéril, a este gen se le ha designado ms_c (Maunder y Pickett, 1959).

Doggett (1988) señaló que la androesterilidad citoplásmica es importante en la producción de híbridos. El gen ms_c de Kafir produce la androesterilidad genético-citoplásmica cuando funciona en el citoplasma de Milo. Solamente se necesita un gen recesivo ms_c . Una vez que el gen se transfiere al citoplasma Milo, la línea progenitora estéril se puede mantener polinizándola continuamente con el mismo genotipo en el citoplasma de Kafir. El gen ms_c en el citoplasma de Kafir da plantas completamente fértiles teniendo polen normal. Una línea restauradora lleva el gen dominante Ms_c (R) y restaura la fertilidad en la F_1 . En generaciones subsecuentes, las plantas que segregan ms_c son nuevamente estériles, ya que el citoplasma que proviene de la madre proviene del tipo Milo. La genética de esta esterilidad no está bien definida, pero la

producen dos genes (ms_{c1} y ms_{c2} cuando son recesivos en presencia del citoplasma Milo).

2.5.3.2 Herencia citoplásmica

La herencia de algunos caracteres, incluyendo los concernientes al desarrollo de cloroplastos, siguen un patrón distinto del considerado en la herencia mendeliana. Este tipo de herencia es conocido como herencia materna o citoplasmática, donde los genes de un determinado carácter, son sólo transmitidos a través de la madre. La explicación para ésta herencia materna, es que la madre contribuye con una mayor proporción del citoplasma a la progenie, mientras que el padre, contribuye principalmente con material nuclear; consecuentemente, los genes que se encuentran en los plastidios y mitocondrias, son transmitidos a través de la línea materna (Grierson, 1984).

Se sabe que los cloroplastos contienen el aparato bioquímico completo requerido para la replicación y expresión del plastoma, incluyendo DNA, RNA, ribosomas, mRNA y tRNA; sin embargo, el tamaño del plastoma es insuficiente para codificar todas las proteínas localizadas en el cloroplasto. Un aspecto interesante en la colaboración entre el genoma nuclear y el plastoma, es que los dos centros genéticos, algunas veces codifican para diferentes polipéptidos, los cuales forman parte de una misma enzima ó complejo polipéptico. Ris y Plaut (citados por Grierson, 1984) demostraron la presencia de DNA en los

cloroplastos.

En muchas plantas, la inhabilidad de producir polen viable es controlado genéticamente, dando como resultado, un aborto del polen en algún estadio entre la meiosis y la mitosis de la microspora. La androesterilidad se determina por genes localizados en las mitocondrias y puede ser modificada por genes restauradores nucleares (Grierson, 1984). La androesterilidad citoplásmica ha sido extensamente estudiada en maíz, donde se han encontrado cuatro tipos de citoplasma: N (normal), T (Texas), S (USDA) y C (Charrua). El citoplasma N es androfértil, mientras que el T, S y C son androestériles. Las evidencias sugieren una asociación entre androesterilidad y DNA mitocondrial (Grierson, 1984).

Un buen ejemplo de una alteración en un polipéptido mitocondrial asociado con androesterilidad fue mostrada en sorgo por Bailey-Serres *et al.* (1987). Las líneas androfértiles y androestériles de sorgo sintetizan una forma aberrante del citocromo oxidasa c subunidad1. Un análisis de secuencia del DNA muestra que el citocromo normal sintetizado en el citoplasma de sorgo Milo tiene un peso molecular de 58 000 unidades; mientras que, en las plantas androestériles y androfértiles es de 70 000 unidades. La diferencia en tamaño de los polipéptidos es debido a eventos de recombinación que hacen que se codifiquen 101 aminoácidos extra en la forma aberrante (Barber, 1986).

No solamente la expresión de la androesterilidad es controlada por el tipo de citoplasma. En maíz, las plantas que tienen el citoplasma T son susceptibles al

hongo *Helminthosporium (Bipolaris) maydis* raza T, el cual causa el tizón sureño de la hoja del maíz. Los síntomas observados en las plantas con el citoplasma T son ocasionados por las toxinas producidas por el hongo. Las toxinas pueden afectar la actividad mitocondrial, como se observó en organelos aislados del citoplasma T, los cuales mostraron un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa cuando se trataron con la toxina del hongo. La presencia de genes restauradores redujo la sensibilidad de la planta al hongo (Grierson, 1984). Esto sugiere que caracteres tales como la resistencia-susceptibilidad a un determinado patógeno, pudieran estar asociados con el genoma citoplásmico.

En experimentos preliminares con sorgo, se compararon líneas isogénicas de sorgo Martin con cuatro tipos de citoplasma: A₁ A₂, A₃ y A₄, encontrando que el citoplasma A₄ mostraba una tendencia a ser menos susceptible a ergot, por lo que evaluar diferentes tipos de citoplasmas de sorgo con relación a su resistencia a ergot puede ser un mecanismo viable (McLaren, citado por Bandyopadhyay et al., 1998).

2.5.3.3 Biología del polen

El polen es liberado generalmente en condiciones secas y su nivel de humedad es menor al 20% al momento de la dehiscencia. Los granos de polen contienen dos núcleos uno grande vegetativo y uno generativo, o tres núcleos, uno vegetativo y dos generativos. Hay una considerable variación en el tamaño

y forma de los granos de polen. Aunque la mayoría son esféricos, en algunas angiospermas marinas tales como *Amphibolis* y *Zostera* son filiformes (Ducker *et al.*, 1978). Las paredes de los granos de polen están formadas por dos capas, una externa, la exina que es resistente a la acetólisis, y una interna, la intina, que es pectocelulósica.

Una de las estructuras más evidentes de los granos de polen son las ornamentaciones de la pared, formadas por la parte más externa de la exina (Cresti *et al.*, 1992). La función principal del polen es la descarga de los gametos masculinos en el saco embrionario, para la fertilización y el posterior desarrollo de la semilla y el fruto. Esta función depende del éxito completo de una serie de eventos secuenciales tales como desarrollo del polen, fase de dispersión polinización, interacción polen-pistilo y fertilización.

Los granos de polen se desarrollan dentro de la antera. Una antera joven consiste de una serie de células homogéneas rodeadas por la epidermis. Conforme se va desarrollando, se forman cuatro lóbulos, cuatro grupos de células arquesporales (una en cada lóbulo, correspondiente a cada microsporangio). Las células arquesporales se dividen periclinalmente para formar una capa parietal primaria externa y una capa interna esporogénica. La capa parietal primaria sufre divisiones periclinales y anticlinales y da lugar a tres o cinco capas concéntricas. La capa esporogénica primaria da lugar a la célula madre de la microspora, lo cual ocurre directamente o después de algunas divisiones mitóticas. Una vez que los granos de polen se han desarrollado en la

antera, éstos son dispersados en la dehiscencia de las mismas. Después de que ha ocurrido la dispersión, los granos de polen permanecen como unidades funcionales independientes y son expuestos a las condiciones ambientales prevalecientes por periodos variables. Dependiendo del periodo y la severidad del ambiente, la calidad del grano de polen, particularmente su viabilidad y vigor pueden ser afectados durante la fase de prepolinización (Shivanna y Juhri, 1989).

Estudios comparativos de la morfología y fisiología del polen, han mostrado que los granos de polen binucleados y trinucleados muestran diferencias en sus características fisiológicas y estructurales al momento de su dispersión. Bajo condiciones naturales, los granos binucleados tienen un periodo de vida mayor debido a su estructura protectora, bajo contenido de agua en el plasma y reducida actividad metabólica; mientras que, el polen trinucleado tiene un periodo de vida menor debido a que su pared es menos resistente, además de tener un mayor contenido de humedad, el cual puede perder fácilmente por desecación. En el caso de los granos trinucleados, la tasa de actividad metabólica es mayor (Singh y Sawghney, 1992).

La viabilidad del polen después de su dispersión varía significativamente entre las especies. Factores ambientales, particularmente temperatura y humedad afectan de manera importante la viabilidad. Se ha demostrado que el polen de la mayoría de las especies mantiene su viabilidad con baja humedad relativa (0-30%). En contraste con la relativa larga vida del polen de algunas

especies, la viabilidad del polen de las gramíneas parece ser corta bajo cualquier condición, la humedad relativa baja es una condición dañina y el polen almacenado de 0-10 °C permanece viable sólo por algunos días. Excepto bajo humedad relativa alta (80-100 %), la viabilidad del polen puede prolongarse de 1-3 semanas. El contenido de agua de los granos de polen también varía considerablemente entre familias, estando la mayoría entre un 15 % y un 35 % (Linkens, 1974).

Por lo general, el número de granos de polen depositado en el estigma bajo condiciones adecuadas de polinización, es mayor que el número de óvulos disponibles para fertilizar, por lo que los granos de polen están además sujetos a una competencia (Mulcahy, 1979). Solamente los granos más vigorosos (refiriéndose a aquellos que germinan más tempranamente y muestran un rápido crecimiento del tubo polínico) llevan a cabo la fertilización. Esta competencia entre los granos de polen da como resultado un incremento en el vigor de la progenie. La competencia del polen puede ser manipulada experimentalmente alterando la densidad del polen en el estigma, o la distancia a la cual el tubo polínico debe crecer en el estilo. La progenie derivada de una fuerte competencia ha mostrado ser más vigorosa y uniforme cuando se compara con la progenie derivada de una menor competencia (Schlichting *et al.*, 1987).

Para el cultivo de polen *in vitro*, varios métodos y medios de cultivo han sido utilizados. En general, un medio que contenga calcio y boro combinado con un

10-20% de sacarosa como una fuente nutricional es suficiente (Brewbester y Kwack, 1963). Un medio que utiliza 200 mg de $MnSO_4$, 200 mg de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 15g de sucrosa y 30 g de polietilenglicol (PEG) 20 000, todos los reactivos disueltos en 100 ml de agua destilada, ha sido exitosamente utilizado para la germinación en polen de trigo (Adhicari *et al.*, citados por Lasac, *et al.*, 1994). Los granos de polen pueden ser cultivados en la superficie de un medio sólido, en cajas de Petri. Los tubos crecen bajo la superficie del medio y son fácilmente observables y medidos en el microscopio. La elongación que tiene el tubo de polen *in vitro*, a menudo, no es igual a la obtenida *in vivo*. El polen trinucleado, en especial el de cereales (con raras excepciones como el mijo) es de difícil crecimiento *in vitro* y la longitud del tubo polínico no es comparable con la longitud que alcanza *in vivo*. En maíz, por ejemplo, la máxima elongación *in vitro* es de 2 mm, mientras que *in vivo* alcanza 20 cm o más (Vasil, 1987).

Las líneas androestériles (Líneas A) en cultivares de sorgo son altamente susceptibles a ergot, mientras que las líneas B y otras líneas androfértiles tienen baja susceptibilidad. Una de las razones de esa susceptibilidad es la tardanza o falla de la polinización; así que, aún las líneas androfértiles, pueden empezar a ser susceptibles durante ó siguiendo las condiciones ambientales que reducen la fertilidad del polen o retardan la polinización. Los progenitores femeninos de híbridos son particularmente susceptibles porque no producen polen, por lo que es importante cuidar que durante la época de floración los progenitores femeninos dispongan de abundante polen proveniente del

progenitor masculino, ya que esto aumenta la posibilidad de que el polen pueda fertilizar al ovario; por lo que la selección de progenitores masculinos con buena producción de polen, puede ser un mecanismo para reducir la infección por ergot (Bandyopadhyay *et al.*, 1996). Normalmente, siguiendo a la polinización en el estigma, la postfertilización y los cambios estructurales en el gineceo, previenen la subsecuente invasión del ovario por el patógeno. El fenómeno de la constricción del extremo del estigma, después del paso de los tubos polínicos hacia la parte baja del estilo, excluyen la entrada del patógeno (Willingale y Mantle, 1985).

McLaren (1997) encontró que bajo condiciones controladas de inoculación, el período de susceptibilidad a ergot (apertura de estigmas) en la línea SA858 fue de cinco días, mientras que en CK60B fue de ocho días, esto significa que el periodo de susceptibilidad fue 37% más corto, por lo que la selección de genotipos con períodos susceptibles más cortos, pueden contribuir a reducir el riesgo. Por otro lado, se ha observado que la temperatura afecta la viabilidad del polen, ya que puede esterilizarse debido a una alta o baja temperatura, fluctuaciones bruscas en la misma y bajo condiciones de sequía severa. Dicha esterilidad puede presentarse desde que el polen empieza a formarse a partir de la diferenciación de las anteras, hasta la floración (Brooking, 1976). La selección por tolerancia a la esterilidad por frío en el polen puede ser un mecanismo que intervenga en crear resistencia. El híbrido PAN 8564, el cual es más tolerante a bajas temperaturas que otros híbridos, es menos susceptible a la esterilidad en prefloración y más eficiente en la autopolinización y resistencia

a ergot (McLaren, 1992).

Otro factor importante puede ser la compatibilidad entre el macho y la hembra. McLaren (1992) y Juster (1985) observaron diferentes tasas de desarrollo de tubo polínico usando diferentes líneas R con una línea A, notaron una reducida germinación y tasa de crecimiento del polen en los estigmas en algunas de las cruzas. Esto puede explicar que el ergot sea más severo en algunas cruzas que en otras, bajo condiciones ambientales similares.

Chinnadurai *et al.* (1970) sugirieron que las reacciones de las variedades de sorgo a ergot fueron debidas a la naturaleza de las secreciones que se producen en el estigma. Los cultivares susceptibles segregan grandes cantidades de sustancias las cuales estimulan la germinación de las esporas. Estas sustancias incluyen el ácido málico, succínico, argínico y aspártico; mientras que en los cultivares resistentes estas sustancias son ácido tartárico y tirosina, los cuales inhiben la germinación de las esporas. La identificación de sustancias inhibitoras y la selección de genotipos con altos niveles de estas sustancias puede contribuir a crear genotipos más resistentes.

Debido a la relación inversa entre polinización e infección, numerosas pruebas de resistencia a ergot han fracasado en encontrar una línea androestéril de sorgo que muestre resistencia. Llevar a cabo tales pruebas para encontrar líneas resistentes es un proceso complejo por las diferencias en sensibilidad de los genotipos a las condiciones ambientales (Musabyimana *et*

al., 1995).

2.6. Antecedentes de la línea androestéril Tx398 con los citoplasmas A₁, A₂, A₃, y A₄

Karper (1949) reportó que la línea Tx398 (Martin) es una variedad enana de cosecha mecánica. Los tallos son delgados y raras veces producen hijuelos, las semillas son relativamente pequeñas y es consistente en la producción de granos. Así mismo, señaló que el principal valor de esta variedad es la facilidad del trillado y su precocidad en la madurez, comparado con otras variedades.

Schertz y Ritchey (1979) señalaron que el citoplasma A₂ es originario de Etiopía y pertenece al grupo Caudatum-Nigricans y raza caudatum provenientes del ISI2662C. También indicaron que las anteras son moderadamente pequeñas, que no contienen polen viable y raras veces contienen exinas vacías. En el caso de la línea androestéril A₂Tx398 se formó utilizando el citoplasma de la línea ISI2662C. Schertz y Ritchey (1979) citaron que la línea A₃Tx398 fue liberada en 1983 por el USDA-ARS y la Estación Agrícola Experimental de Texas. La línea A₃Tx398 tiene un citoplasma que expresa características diferentes a las de las líneas que contienen los citoplasmas A₁ (milo) y A₂ (ISI2662C) y brinda la oportunidad de diversificar citoplasmas y el linaje de los progenitores hembra de los híbridos.

La línea A₃Tx398 fue desarrollada cruzando ISC1112C, un grupo de Durra-Subglabrescens (Grupo no. 41-50) raza Durra (Durra-bicolor) una línea de la India como progenitor hembra con IS2266C como macho. Las plantas estériles fueron retrocruzadas con IS2266C y las estériles subsiguientes fueron cruzados con B Martin por cinco generaciones (Schertz, 1979).

Atkins (1990) citó que la fuente del citoplasma A₄Tx398, originalmente fue la línea IS7920C. Murty (1986) reportó que esta línea tiene su origen en Nigeria, pertenece al grupo Conspicum y es de la raza Guinea. Las anteras de esta línea son largas, amarillas e indehiscentes. La restauración de la fertilidad en cruza utilizando líneas con los citoplasmas A₄ difiere de las cruza con los citoplasmas androestériles A₁, A₂, A₃

2.7 Métodos para inoculación de hongos

La inoculación puede llevarse a cabo de varias maneras. Las más utilizadas son las siguientes:

2.7.1 Por suspensión de esporas

La inoculación utilizando una suspensión de esporas o micelio finamente triturado en una licuadora, se realiza mediante el empleo de un pulverizador. Posteriormente se procede a inocular a los ejemplares u órganos seleccionados para tal fin. El inóculo se suspende en agua destilada estéril, empapando

perfectamente los órganos que pueden o no ser heridos superficialmente; de no ser así, puede frotarse suavemente con los dedos para facilitar la adherencia de las pequeñas gotas del pulverizador. Cuando la tensión superficial dificulta la adherencia de las gotas sobre los tejidos, puede agregarse 0.25 g de gelatina y 0.05 g de oleato de sodio a la suspensión del inóculo. Las manos del operador deben estar desinfectadas. Posteriormente, los órganos tratados se cubren con bolsas sujetas en un extremo con una ligadura que, cuando ejerzan presión en una rama, deberán intercalarse trozos de algodón que amortigüen la presión. Esta condición debe mantenerse durante no menos de 48 hr. Cuando las plantas inoculadas estén en macetas, se les puede cubrir con campanas de vidrio, cuidando de colocar en el interior un envase con agua para mantener un ambiente saturado de humedad (Gaviño y Juárez, 1977).

2.7.2 Por depósito directo

Otra forma de inoculación aconsejada es la de depositar directamente sobre los tejidos el micelio vegetativo y reproductivo del agente infeccioso. Las partes tratadas se cubren con algodón humedecido en agua. Para evitar la evaporación se cubre con polietileno sujetándolo suavemente en ambos extremos (Gaviño y Juárez, 1977).

2.7.3 Por espolvoreo

Aunque no es lo más aconsejado, en algunos casos se llevan a cabo inoculaciones con espolvoreo y no con pulverizaciones. Esto suele ocurrir en los trabajos destinados al estudio de las royas y sus razas fisiológicas. En tal caso y cuando se dispone de una buena cantidad de inóculo, se le puede distribuir por intermedio de un espolvoreador sobre los tejidos del hospedante. Inmediatamente se ubican en cámaras húmedas durante períodos de dos a cuatro días. Cuando la cantidad de inóculo es pequeña, se le aplica suavemente con una espátula ó implemento similar (Gaviño y Juárez , 1977).

2.8. Procedimientos de evaluación

Los investigadores emplean diferentes procedimientos para medir el ergot en sorgo en experimentos de evaluación. Esta enfermedad se mide cualitativamente haciendo una estimación visual del área infectada de la panícula (McLaren, 1992) o con el porcentaje de flores infectadas (Musabyimana *et al.*, 1995). Frederickson *et al.* (1994) midieron la enfermedad cuantitativamente a través del conteo de flores infectadas por panícula.

El método visual cualitativo puede ser utilizado para rechazar líneas susceptibles en experimentos muy grandes. La evaluación cuantitativa es tediosa y consume mucho tiempo pero es la apropiada en experimentos que

requieren datos exactos. Tegegne *et al.* (1994) sugirieron que el método cualitativo puede ser utilizado en campo para hacer una rápida evaluación de un gran número de ensayos. Después de rechazar panículas susceptibles, las demás panículas pueden ser evaluadas a través del método cuantitativo.

2.9. Control químico.

McLaren (citado por Bandyopahyay, 1998) controló *C. africana* en Sudafrica usando varios fungicidas sistémicos (benomyl, carbendazil, propiconazol, triadimenol, terbuconazol y CG16937); no obstante, este mismo autor calculó que el rendimiento obtenido bajo condiciones específicas de esa región, no fue suficiente para justificar el gasto económico de la aplicación de los fungicidas.

La investigación en el control de ergot por medio de fungicidas ha progresado en Brasil y Australia, encontrando que el triadimenol ha sido efectivo para reducir la enfermedad en campo, realizando las aspersiones desde antes de floración y hasta que termina (Ferreira *et al.*, 1996). La aplicación de fungicidas se ha tomado como una medida preventiva, observando que el control es bueno si el inóculo presente se encuentra en cantidades relativamente bajas y en ausencia de lluvia. La clave para que el fungicida lleve a cabo su control, es logrando una buena cobertura de la panoja (McLaren, citado por Bandyopahyay, 1998).

2.10 Experimentos preliminares

Con semilla híbrida obtenida de cruzamientos realizados en el ciclo primavera 1998 en Marín, Nuevo León, México, se estableció un experimento en el Campo Experimental El Canadá, de Escobedo N.L, el 1 de septiembre de 1998, en el cual se incluyeron los cruzamientos de 10 progenitores machos con cuatro tipos de citoplasma. Los cruzamientos se agruparon formando bloques que incluían cada uno 10 genotipos: cuatro híbridos resultantes de cruzar un macho con las hembras con los cuatro tipos de citoplasma A₁, A₂, A₃, y A₄, las mismas cuatro hembras, el macho y un híbrido comercial (Cuadro 1).

Cuadro 1. Daño por ergot en líneas hembra con distinto citoplasma, sus combinaciones híbridas con 10 progenitores, y un híbrido comercial. Escobedo, N.L. México.

Genotipo	% de Daño	Genotipo	% de Daño *
A ₁ Tx 398	69.4 *	90 / A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄	53.5 **
A ₂ Tx 398	50.0	10106 / A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄	64.1
A ₃ Tx 398	57.6	10250 / A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄	52.1
A ₄ Tx 398	58.2	10251 / A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄	60.0
		10266 / A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄	51.5
		10330-1 / A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄	50.2
		10331 / A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄	58.3
		10333 / A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄	52.4
		FA 163 / A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄	38.0
		Pioneer 8282***	36.1
		FA 170/ A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄	45.7

* Promedio sobre los cuatro tipos de citoplasma

** Promedio sobre los híbridos

*** Híbrido comercial

Se utilizó el diseño experimental bloques al azar, dividiendo los tratamientos en 10 bloques y cuatro repeticiones. Las variables consideradas fueron: días a floración y susceptibilidad-resistencia de los genotipos a ergot. La enfermedad fue medida a partir de observaciones visuales utilizando una escala de 0-10 (0 para ningún daño y 10 para daño total).

En el caso de los genotipos hembra, antes de la floración se escogieron tres plantas al azar las cuales se etiquetaron para tener un seguimiento de ellas durante todo el experimento.

Las panojas de estas plantas fueron cubiertas con bolsas de papel para evitar la infección natural por el patógeno. En los surcos conteniendo a los machos se escogieron seis panojas, cubriendo tres de ellas con bolsas de papel y las tres restantes con bolsas de plástico.

Conforme se iniciaba la floración en las plantas, se realizaron inoculaciones artificiales con el hongo, para asegurar la presencia del patógeno en las plantas. Para éste fin, se asperjó una solución compuesta por agua destilada y una concentración de 10^6 conidios mL^{-1} . La solución se aplicó directamente sobre las panojas seleccionadas. Una segunda aplicación se hizo cuando la panoja tenía 2/3 ó más de avance en la floración. La fuente de conidios fueron panojas infectadas con el hongo de un lote establecido en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía, en Marín, Nuevo León, México en el

ciclo previo (Primavera 1998).

A partir de que se observaron los primeros síntomas visuales (una exudación melosa en los granos infectados), lo cual ocurrió a los 13 días después de la inoculación, se realizaron observaciones cada tres días para observar el desarrollo del patógeno.

El avance de la enfermedad fue bastante notorio en los materiales susceptibles. El ataque de la enfermedad en esos genotipos se dio a tal grado que no produjeron grano (Ortíz *et al.*, 1999).

Entre los resultados más sobresalientes se puede mencionar que en forma promedio, el citoplasma A_2 mostró menor ataque del hongo en todos los cruzamientos, a diferencia del citoplasma A_4 reportado por McLaren (Citado por Bandhyopadhyay *et al.*, 1996). Así mismo, se observó un efecto superior de resistencia en las cruza donde intervino el progenitor FA163; sin embargo, el FA170 presentó una superioridad en la cruza con la A_1 comparado con los otros tipos de citoplasma (Ortíz *et al.*, 1999)

El tipo de respuesta observada en los materiales, hace suponer que la resistencia a esta enfermedad pudiera estar condicionada, no solamente por efectos del citoplasma, sino también por efectos nucleares, notándose una interacción muy fuerte entre éstos dos factores en su respuesta a la resistencia, por lo cual se consideró de suma importancia trabajar con una selección de

progenitores macho y hembra por separado para la formación de híbridos experimentales.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Experimento 1. Evaluación del efecto del citoplasma en la respuesta al ataque de ergot.

Para cumplir con el primer objetivo, en el ciclo otoño-invierno (O-I), el 15 de octubre de 1999 se sembraron en invernadero las líneas isogénicas derivadas de ATX398 (A₁TX398, A₂TX398, A₃TX398 y A₄TX398) en macetas de plástico con capacidad de 19 L utilizando un sustrato formado por la mezcla de aserrín, arena y arcilla en proporción 1:1:1 (Fotografías 1, 2, 3 y 4, respectivamente). El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones. Se sembraron cuatro semillas por maceta. Las macetas fueron regadas cada tercer día. Se realizó un aclareo a los 30 días dejando una planta por maceta. Las plantas fueron fertilizadas con Bioforte a razón de 3 mL por litro de agua a los treinta días de la siembra, haciendo un total de cuatro aplicaciones, así mismo se aplicó cypermetrina para el control del pulgón del follaje a razón de 1 mL por litro de agua realizando dos aplicaciones, la primera a los 45 días y la segunda a los 52 días. Para determinar la susceptibilidad resistencia a ergot, una vez que se observó la exposición de los estigmas, se procedió a inocular artificialmente a las florecillas con una solución formada por los conidios del hongo. Dicha solución se preparó utilizando panojas infectadas procedentes del Campo Experimental de Río Bravo, Tamps. perteneciente al INIFAP. Las

panojas infectadas se sumergieron en agua destilada, se tomaron muestras hasta ajustar a una concentración final de 1×10^6 conidias por mL.



Fotografía 1. Panojas de la línea androestéril ATX398 A₁ después de haber sido inoculadas. Ciclo O-I 1999. Caracteres asociados con la resistencia a ergot



Fotografía 2. Panojas de la línea androestéril ATX398 A₂ después de haber sido inoculadas. Ciclo O-I 1999. Caracteres asociados con la resistencia a ergot

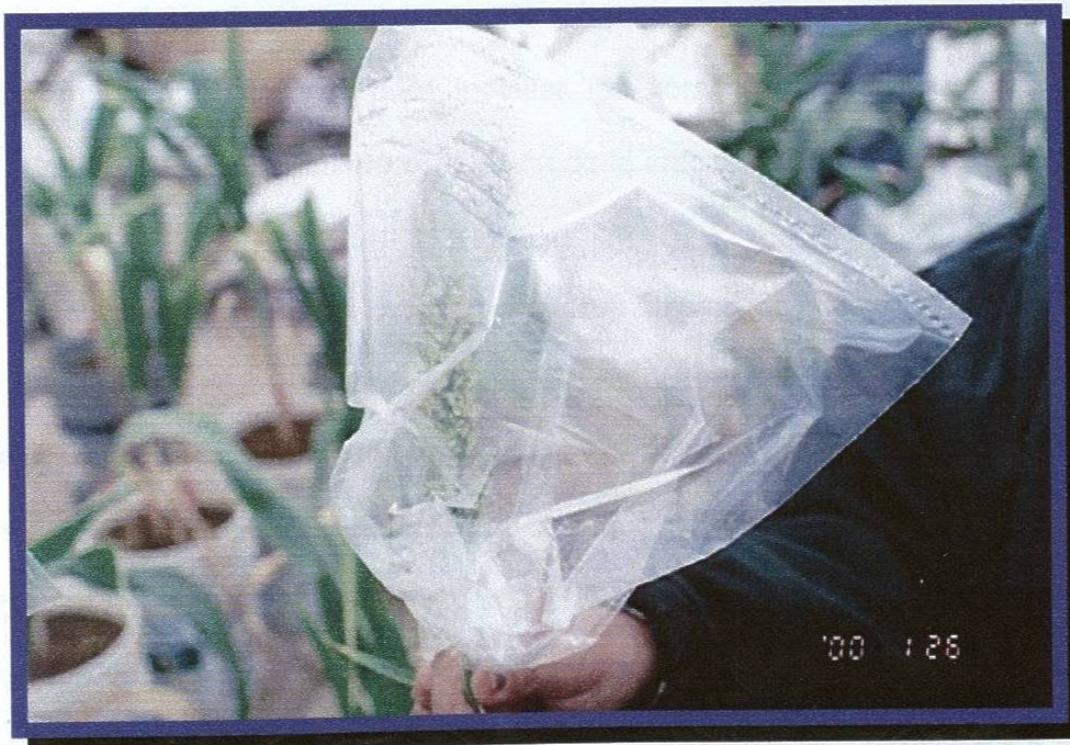


Fotografía 3. Panojas de la línea androestéril ATX398 A₃ después de haber sido inoculadas. Ciclo O-I Marín 1999. Caracteres asociados con la resistencia a ergot.



Fotografía 4. Panojas de la línea androestéril ATX398 A₄ después de haber sido inoculadas. Ciclo O-I Marín 1999. Caracteres asociados con la resistencia a ergot.

Para realizar la aplicación de la solución, se utilizó un aspersor manual realizando la primera aspersion en el primer tercio de la panoja cuando estaba en floración. La aspersion se realizó por arriba y por los cuatro lados de la panoja, aplicando aproximadamente 5 ml por panoja, realizando una segunda aspersion cuando la panoja tenía 2/3 ó más de avance en la floración. Se realizó más de una aplicación para asegurar la presencia del hongo en cuanto los estigmas estuvieran receptivos. Después de haber realizado la primera aplicación, las panojas fueron cubiertas con bolsas de plástico (Fotografía 5) con el fin de crear un microclima que elevara la humedad relativa y así favorecer el desarrollo del hongo.



Fotografía 5. Planta con la panoja cubierta por una bolsa de plástico Ciclo O-I Marín, N.L. 1999. Caracteres asociados con la resistencia a ergot

Las macetas permanecieron en el invernadero, donde se llevó a cabo la toma de datos.

Las variables observadas fueron:

3.2. Caracterización de producciones de mazorcas en relación a

1. Días a floración (d). Se contabilizó a partir de la fecha de siembra hasta observar el 50% de apertura floral en la panoja.
2. Longitud de panoja (cm). Para esta variable, la medición se hizo partir de la base de la panoja hasta la punta de la misma.
3. Flores por panoja. Se hizo un conteo de las flores presentes en cada panoja.
4. Susceptibilidad-resistencia a ergot. Una vez realizado el procedimiento anteriormente descrito para inocular las florecillas con el patógeno, se realizó la correspondiente evaluación de la enfermedad.

Después de la primera inoculación, se realizaron estimaciones del avance de la enfermedad cada tercer día con el propósito de darle un seguimiento al desarrollo del patógeno, al mismo tiempo se tomaron muestras de florecillas infectadas en diferentes etapas. Una vez que el síntoma más evidente de la enfermedad, que es la producción de mielecilla en las florecillas infectadas fue observado, se realizó un conteo de florecillas sanas e infectadas por panoja, considerando el método cuantitativo de Frederickson *et al* (1994). Para esta última variable se realizó un análisis de covarianza considerando al número de florecillas por panoja como covariable.

Con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza, para determinar la significancia de las diferencias y realizar en su caso una prueba de comparación de medias usando la prueba de diferencia mínima significativa (DMS).

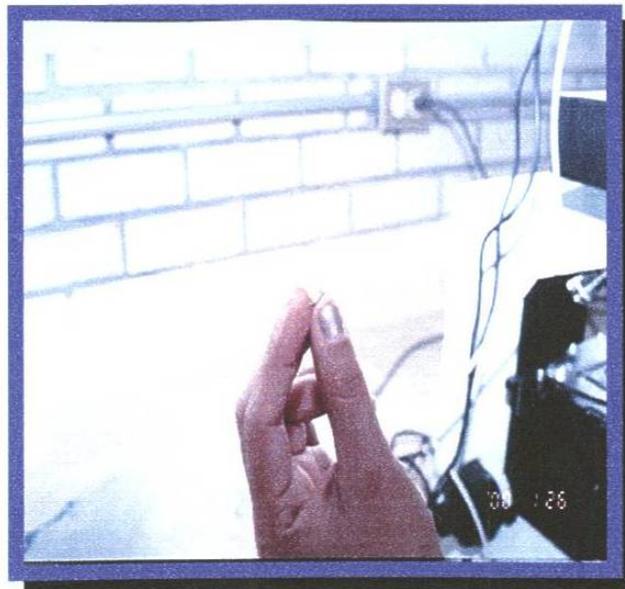
3.2. Experimento 2. Caracterización de progenitores macho en relación a la producción de polen y estimación de su heredabilidad.

En relación a la caracterización de progenitores masculinos en base a su producción de polen, se hizo una selección de los mismos considerando el grupo de progenitores evaluados en experimentos preliminares (ciclo O-I 1998). La selección se hizo tomando como criterio la mayor resistencia a ergot.

En el Cuadro 2 se enlistan los nueve progenitores y su genealogía así como un híbrido comercial. Estos progenitores fueron sembrados en invernadero en el 16 de enero de 1999. Las unidades experimentales fueron macetas de plástico con capacidad de 19 L. El sustrato estuvo formado por una mezcla de estiércol bovino, tierra negra y arena en proporción 1:1:1. El diseño experimental fue completamente al azar con 10 tratamientos y tres repeticiones. Se sembraron tres semillas por maceta. Las macetas fueron regadas cada tercer día. Se realizó un aclareo a los 30 días dejando una planta por maceta.



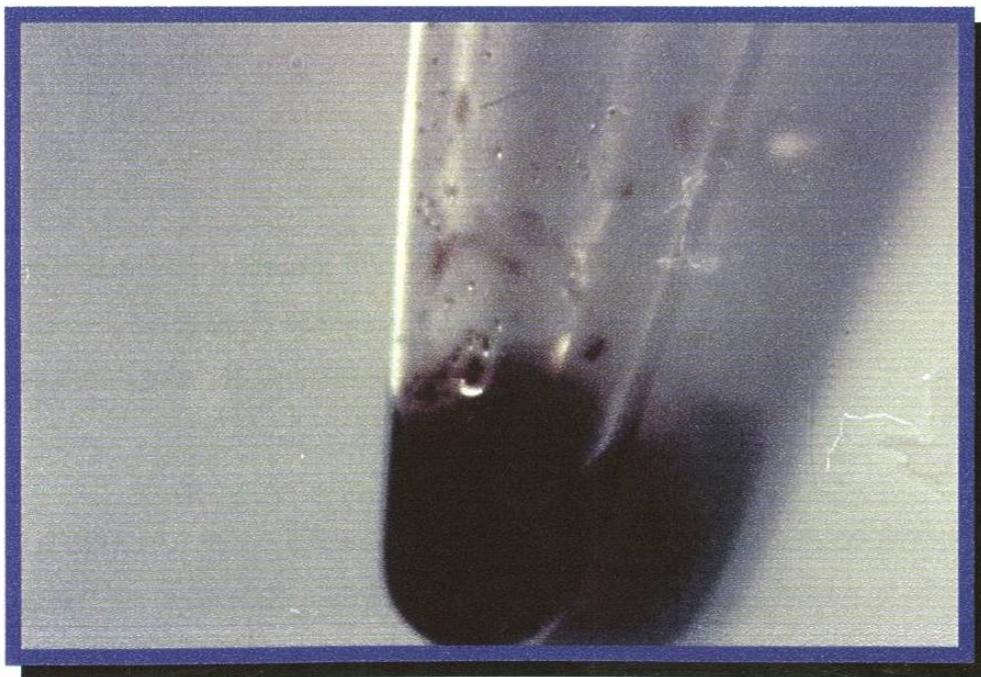
Fotografía 6. Momento en el que fueron tomadas las muestras de espiguillas de los progenitores masculinos para realizar el conteo de polen. Ciclo P-V 1999, Marín N.L. Caracteres asociados con la resistencia a ergot



Fotografía 7. Muestra de espiguilla correspondiente al primer tercio de la panoja. Ciclo P-V1999, Marín N.L. Caracteres asociados con la resistencia a ergot

Para el conteo de polen, las espiguillas se colocaron en tubos de ensaye conteniendo una solución formada de ácido acético, formaldehído y alcohol metílico al 50% (1:1:1) para preservarlas y llevar al cabo la observación posterior.

Para realizar el conteo de polen, cada florecilla fue disectada para extraer las tres anteras. Una vez extraídas, fueron colocadas en tubos de eppendorf con capacidad de 200 μL , dichos tubos contenían un volumen de 30 μL de H_2SO_4 al 99%, esto con el fin de disolver las anteras y liberar los granos de polen (Fotografía 8).



Fotografía 8. Tubo eppendorf en el que se depositaron las tres anteras pertenecientes a cada florecilla. Ciclo P-V 1999, Marín N.L. Caracteres asociados con la resistencia a ergot

La solución de H₂SO₄ conteniendo las anteras se dejó reposar por una hora. Transcurrido este tiempo, se observaron los tubos y si aún se observaban restos de anteras, se procedió a macerarlas con una pequeña espátula, esto con el fin de que no quedaran granos de polen adheridos a las paredes de las anteras. Posteriormente, los tubos se colocaron en un agitador para asegurar que la solución fuera lo más homogénea posible. Se separó una muestra de 20 μL de la solución con una micropipeta y se colocó en una cámara Neubauer. El conteo se llevó al cabo en el microscopio considerando el número de granos observados en la cuadrícula central de la cámara. El número de granos por flor se obtuvo considerando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{n \times v}{0.1}$$

Donde:

N = número de granos por flor.

n = número de granos observados

v = volumen total de la solución.

Para determinar la viabilidad del polen se realizaron pruebas de germinación con el medio de cultivo de Campbell y Scarth (citados por Lansac *et al.*, 1994), el cual ha sido utilizado para inducir la germinación de polen de sorgo y trigo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Medio basal de cultivo líquido para polen, propuesto por Campbell y Scarth (citados por Lansac *et al.*, 1994). Caracteres asociados con la resistencia a ergot.

Constituyentes	Concentración (g/100mL)
MnSO ₄	0.200
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	0.200
SUCROSA	15
POLIETILENGLICOL (PEG)	30

El medio de cultivo se distribuyó en cajas de petri. Una vez que la antesis se observó en el primer tercio de la panoja, se colectó polen directamente de la panoja a la caja de petri. Posteriormente, conforme avanzó la antesis, se hizo una segunda colecta del segundo y tercer tercio incubando a 28^o C durante tres horas. Se consideró como polen viable a aquel que desarrolló el tubo polínico por lo menos al doble del tamaño del grano de polen. Además de la prueba de germinación para determinar la viabilidad, se realizaron otras pruebas para la determinación de la misma como el método de tinción a base de KI (yoduro de potasio) descrito por Secrist y Atkins (1988). Para las pruebas con este compuesto, el polen se colectó de la panoja a la caja de petri, aplicando el KI inmediatamente después de la colecta, el tiempo de exposición de los granos fue de 30 minutos. Trascurrido este periodo se procedió a contar el número de granos fértiles e infértiles bajo el microscopio con un objetivo de 10x. Se consideraron granos viables a aquellos que se tiñeron de un color café oscuro, así como granos de color café claro o parcialmente café. Granos colapsados, deformes y teñidos de color naranja-amarillento fueron considerados como

infértiles, ya que al no teñirse evidenciaban la ausencia de actividad enzimática, y por lo tanto de viabilidad.

Las variables evaluadas fueron:

1. Días a floración (d). Se contabilizó a partir de la fecha de siembra hasta observar el 50% de apertura floral en la panoja.
2. Longitud de panoja (cm). Para esta variable la medición se hizo partir de la base de la panoja hasta la punta de la misma.
3. Número de espiguillas por panoja. Se consideró como una espiguilla solamente a la que estaba unida al raquis principal.
4. Granos de polen por flor. La determinación de esta variable se realizó mediante el procedimiento anteriormente descrito.
5. Viabilidad del polen. Para realizar la prueba de viabilidad se preparó el medio de cultivo de Campbell y Scarth (citados por Lansac *et al.*, 1994), el cual ha sido utilizado para inducir la germinación de polen de sorgo y trigo (Cuadro 3)

Con los datos de cada variable se realizaron análisis de varianza para determinar la existencia de diferencias significativas entre genotipos, en caso de significancia se aplicó la prueba de comparación de medias (DMS).

En el ciclo P-V 2000 se repitió el experimento anterior. A diferencia del ciclo P-V 1999, los progenitores fueron sembrados en campo bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Cada repetición fue un surco de 5 m. La siembra se realizó el 17 de marzo del 2000. Se realizó un riego de presembrado y dos riegos de auxilio, el primero al inicio de floración y el segundo en la etapa de llenado de grano. Dentro de las labores culturales, se llevó al cabo un aporque y un deshierbe mecanizado. En el ciclo P-V 2000, junto con los progenitores, también fueron evaluados los híbridos resultantes de cruzar los progenitores masculinos FA170 (resistente a ergot) y el progenitor 10251 (susceptible a ergot; Ortiz, *et al.*, 1999) con la hembra ATX398 con los cuatro tipos de citoplasma (Cuadro 4).

Cuadro 4. Genotipos que se evaluaron en el ciclo P-V 2000, Marín, N.L. Caracteres asociados con la resistencia a ergot

híbridos		Machos		
A ₁ / FA170	A ₁ / 10251	FA170	10333	10249
A ₂ / FA170	A ₂ / 10251	FA163	10106	Pioneer 8282**
A ₃ / FA170	A ₃ / 10251	10330	FA90	
A ₄ / FA170	A ₄ / 10251	10331	10251	

**Testigo comercial

Las variables a medir fueron: 1) días a floración, 2) longitud de panoja, 3) espiguillas por panoja, 4) granos de polen por florecilla, 5) viabilidad del polen y 6) heredabilidad. Para la estimación de las variables, se realizó el mismo procedimiento que en el ciclo P-V 1999, excepto para la variable granos de polen por florecilla y viabilidad del polen. En el ciclo P-V 1999, las unidades experimentales fueron macetas y se consideró solo una panoja por maceta por repetición; sin embargo en el ciclo P-V 2000, de cada surco, fueron seleccionadas dos panojas y posteriormente se llevó al cabo el mismo procedimiento para el conteo del polen utilizado y descrito previamente. En el caso de las pruebas de viabilidad, como la siembra fue en campo, por cada surco se seleccionaron dos panojas, teniendo un total de seis panojas por genotipo.

Para el caso de la estimación de la heredabilidad, una de las formas de estimarla, es a partir de la regresión de la progenie sobre los progenitores. En este caso el análisis de regresión se realizó considerando únicamente a un progenitor, (progenitor masculino), que es el productor de polen. Los datos se obtuvieron a partir de los valores promedio de la producción de polen por florecilla en cada repetición de los progenitores 10251 y FA170. La progenie evaluada fueron los híbridos resultantes de cruzar los progenitores 10251 y FA170 con la línea isogénica ATx398 con los cuatro tipos de citoplasma (Cuadro 4).

Los datos de las progenies fueron obtenidos de la misma forma que para sus progenitores. Utilizando los datos de los progenitores y de sus progenies, el valor de la heredabilidad se obtuvo a partir del coeficiente de regresión B_1 (Strickberger, 1978) considerando la siguiente fórmula:

$$B_1 = \frac{\sum XY - (\sum X \sum Y / N)}{\sum X^2 - [(\sum X)^2 / N]} = \frac{\text{COV } XY}{\text{VAR } X}$$

Donde:

B_1 = coeficiente de regresión

$\sum X$ = Sumatoria de los valores promedio de número de granos por florecilla de los progenitores.

$\sum Y$ = Sumatoria de los valores promedio de número de granos por florecilla de la progenie.

$\sum XY$ = Sumatoria de los valores promedio de número de granos por florecilla de los progenitores por los valores promedio de número de granos por florecilla de la progenie.

$\text{COV } XY$ = Covarianza de los valores promedio de número de granos por florecilla de los progenitores y los valores promedio de número de granos por florecilla de la progenie.

$\text{VAR } X$ = Varianza de de los valores promedio de número de granos por florecilla de los progenitores.

N = número total de observaciones.

Debido a que se utilizó la regresión Progenie–progenitor, la heredabilidad fue calculada como el doble del coeficiente de regresión (Strickberger, 1978)

$$B_1 = 1/2 h^2 \quad \therefore h^2 = 2 B_1$$

Para calcular la precisión de la estima de la heredabilidad, se obtuvo el valor del error estándar a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Error estándar} = 2/\sqrt{N}$$

Donde N es el número total de observaciones (Falconer, 1978)

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Experimento 1. Evaluación del efecto del citoplasma en la respuesta al ataque de ergot.

De acuerdo a los análisis de varianza (ANVA), las variables días a floración, longitud de panoja y número de florecillas infectadas por panoja, presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de ANVA para las variables días a floración, longitud de panoja y florecillas infectadas por panoja. Ciclo O-I 1999. Caracteres asociados con la resistencia a ergot

Variable	G.L	CM	F	C.V
Días a floración	3	32.6	15.03**	1.46%
Longitud de panoja	3	15.3	4.9*	11.28%
Florecillas infectadas por panoja	3	229524	14.9 **	13.17%

*valor significativo a $P < 0.05$

** valor altamente significativo a $P < 0.05$

Para la variable días a floración, al encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos, se procedió a realizar una prueba de comparación de medias (DMS), en donde se observaron dos grupos estadísticamente diferentes (Cuadro 6), en este cuadro el cual el citoplasma A_4 se mostró como el más precoz (97 d), siendo estadísticamente igual al citoplasma A_2 (98 d), mientras

que el citoplasma A₁ (104 d) se comportó como el más tardío siendo estadísticamente igual al A₃ (103 d).

Cuadro 6. Comparación de medias de la variable días a floración de la línea isogénica ATX398 con los tipos de citoplasma A₁, A₂, A₃ y A₄. Caracteres asociados con la resistencia a ergot

Tratamiento	Media*	
ATx398 A ₁	104	a
ATx398A ₃	103	a
ATx398A ₂	98	b
ATx398A ₄	97	b

*Letras diferentes muestran diferencia significativa (P<0.05).

Estos resultados concuerdan con los de Lenz y Atkins(1981). Ellos compararon caracteres agronómicos en líneas de sorgo que diferían en su fuente de citoplasma. Para el carácter días a floración, de las ocho líneas androestériles que evaluaron, únicamente se observaron dos grupos estadísticos, en donde el citoplasma milo (A₁) fue el más tardío (78 d). De acuerdo a Quinby (1967), en sorgo se han identificado cuatro loci que determinan días a floración: Ma₁, Ma₂, Ma₃ y Ma₄. Si Ma₁ es dominante, el genotipo se muestra como tardío. En el caso del citoplasma tipo milo, esta condición podría estarse expresando.

Maves y Atkins (1988) al comparar los citoplasmas A₁, A₂, A₃ reportaron que los dos primeros fueron tardíos en florecer y manifestaron un peso mayor de 100 granos. Ganga-Kishan y Borikar (1989) indicaron que el citoplasma tiene un

efecto sobre la altura de la planta, días a floración y tamaño de grano, pero Murty (1986) no encontró esas diferencias entre los citoplasmas A₁, A₂ y A₃ para altura de planta y días a floración.

De acuerdo a los resultados del ANVA de la variable longitud de panoja (Cuadro7) se procedió a realizar una prueba de comparación de medias (DMS), en donde se observaron dos grupos estadísticos. Los citoplasmas A₁, A₃, y A₄ no mostraron diferencias significativas entre ellos (17, 16 y 16 cm, respectivamente) pero sí con respecto al citoplasma A₂, el cual obtuvo el menor valor (12 cm). Estos resultados se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Comparación de medias de la variable longitud de panoja de la línea isogénica ATX398 con los tipos de citoplasma A₁, A₂, A₃ y A₄. Caracteres asociados con la resistencia a ergot.

Tratamiento	Media*
ATx398 A ₁	17.3 a
ATx398A ₄	17 a
ATx398A ₃	16 a
ATx398A ₂	12 b

*Letras diferentes muestran diferencia significativa (P<0.05).

Para la variable número de florecillas por panoja, el citoplasma A₄ mostró el mayor valor, sin mostrar diferencias significativas con el citoplasma A₁,