



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

APORTACIONES AL ESTUDIO DE *Claviceps africana* Frederickson, Mantle & de
Milliano EN LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA DE LÍNEAS DE SORGO EN
VALLES CENTRALES DE MÉXICO

MA. EUGENIA CISNEROS LÓPEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2008

La presente tesis titulada: “Aportaciones al estudio de *Claviceps africana* Frederickson, Mantle & de Milliano en la producción de semilla de líneas de sorgo en Valles Altos Centrales de México”, realizada por la alumna: Ma. Eugenia Cisneros López, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: _____

DR. LEOPOLDO E. MENDOZA ONOFRE

ASESOR: _____

DR. VÍCTOR A. GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

ASESOR: _____

DR. GUSTAVO MORA AGUILERA

ASESOR: _____

DR. MIGUEL HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

ASESOR: _____

DR. LEOBIGILDO CÓRDOVA TÉLLEZ

Montecillo, Texcoco, México, octubre de 2008

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme una beca.

Al Colegio de Posgraduados por la oportunidad de formarme como profesionista.

Al Dr. Leopoldo E. Mendoza Onofre por su paciencia, generosidad para compartir sus conocimientos y experiencia en el área agronómica y genotécnica a lo largo de este periodo de formación profesional y humana; además de su apoyo editorial, sin el cual este trabajo no hubiera sido fructífero.

Al Dr. Víctor A. González Hernández por su interés y solidaridad en la dirección del proyecto, en aspectos del diseño experimental y aspectos fisiológicos; así como por su apoyo y experiencia editorial.

A la Dra. Araceli Zavaleta Mancera por su apoyo y generosidad en el área de microscopía y anatomía, la cual fue parte fundamental.

Al Dr. Gustavo Mora Aguilera por brindarme un espacio de trabajo en el Laboratorio de Enfermedades de Frutales del CP Campus Montecillo, en el cual trabajé en forma satisfactoria, y por sus aportaciones en el área de Fitopatología y Epidemiología.

Al Dr. Miguel Hernández Martínez por sus sugerencias en aspectos agronómicos del sorgo.

Al Dr. Leobigildo Córdova Téllez por sus comentarios y sugerencias en el área de la Tecnología de Semillas.

Al Dr. Noé Ruiz García por su amistad y asesoría en el área de Estadística.

A Elvia Rosas Romero por su amistad y ayuda. Al personal del Laboratorio de Anatomía y Microscopía Campus Montecillo.

A don Mario, el Güero y Miguel, trabajadores encargados de campo, almacén e invernadero del Área de Fisiotecnia del Campus Montecillo, por su apoyo.

DEDICATORIA

*“Si tomare las alas del alba y habitare en el extremo del mar,
Aún allí me guiará tu mano,
Y me asirá tu diestra”.*

Salmo 139:9-10.

A la memoria de:

Mi padre

Juan Cisneros Díaz

“Él reposa ahora en el mejor lugar posible, cerca de Dios”.

A mi familia:

A mi madre Ma. del Refugio López López, a mis hermanos Juan Carlos, Miguel Ángel y Eréndira Cisneros López.

A mis sobrinos: Carlos Gerardo, Juan Luis, Apolus, Julieta, Isaac, Braulio, Juan Pablo y Viviana.

A Fanny, Norma y Sergio

“Juntos vamos en un barco que es la vida”.

Al hermano Fernando Cortez y a su congregación.

A los hermanos Sergio Luis, Alberto y Blanquita y sus adorables hijos.

“Agradecimiento por una nueva visión de la vida, un regalo de Dios”.

CONTENIDO

Página

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
1. El ergot del sorgo.....	5
1.1. Agente causal.....	5
1.2. Etiología.....	5
1.3. Epidemiología.....	6
1.4. Hospedantes y susceptibilidad varietal.....	7
1.5. Control.....	7
2. Floración, producción y viabilidad del polen en sorgo.....	8
3. Interacción polen-estigma-patógeno.....	9
OBJETIVOS GENERALES.....	9
HIPÓTESIS.....	10
1. Hipótesis general.....	10
2. Hipótesis particulares.....	10
LITERATURA CITADA.....	11

CAPÍTULO I. MORFOLOGÍA DE LA PANOJA DE SORGO (<i>Sorghum bicolor</i> L.	
Moench) Y FERTILIDAD DE LÍNEAS A, B y R TOLERANTES AL FRÍO 15	
I. 1. RESUMEN.....	15
I.2. INTRODUCCIÓN	16
I.3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
I.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
I.5. CONCLUSIONES	32
I.6. LITERATURA CITADA.....	33

CAPÍTULO II. INTERACCIÓN POLEN-PISTILO EN CRUZAS A x B DE SORGO	
(<i>Sorghum bicolor</i> L. Moench) Y PRODUCCIÓN DE SEMILLA..... 36	
II.1. RESUMEN	36
II.2. INTRODUCCIÓN	37
II.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
II.4. RESULTADOS	42
II.5. DISCUSIÓN	51
II.6. CONCLUSIONES	57
II.7. LITERATURA CITADA	57

CAPÍTULO III. CARACTERÍSTICAS FLORALES, RECEPTIVIDAD DEL	
ESTIGMA Y PRODUCCIÓN DE SEMILLA DE LÍNEAS A DE SORGO	
INFECTADAS CON ERGOT (<i>Claviceps africana</i> Frederickson, Mantle & de	
Milliano) 62	
III.1. RESUMEN	62
III.2. INTRODUCCIÓN.....	63

III.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
III.4. RESULTADOS	67
III.5. DISCUSIÓN	73
III.6. CONCLUSIONES.....	78
III.7. LITERATURA CITADA	79

CAPÍTULO IV. SINCRONÍA DE LA POLINIZACIÓN E INOCULACIÓN CON	
<i>Claviceps africana</i> Frederikson, Mantle & de Milliano Y SU EFECTO EN LA	
COMPATIBILIDAD POLEN-PISTILO Y PRODUCCIÓN DE SEMILLA DE	
SORGO	82
IV.1. RESUMEN.....	82
IV.2. INTRODUCCIÓN	83
IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS	84
IV.4. RESULTADOS.....	87
IV.5. DISCUSIÓN.....	94
IV.6. CONCLUSIONES	100
IV.7. LITERATURA CITADA.....	100

CAPÍTULO V. DISPONIBILIDAD DE POLEN, INCIDENCIA DE ERGOT Y	
PRODUCCIÓN DE SEMILLA CON DIFERENTES RELACIONES DE SURCOS	
HEMBRA:MACHO EN SORGO	104
V.1. RESUMEN	104
V.2. INTRODUCCIÓN	105
V.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	106
V.4. RESULTADOS	110

V.5. DISCUSIÓN.....	119
V.6. CONCLUSIONES.....	124
V.7. LITERATURA CITADA.....	125
CONCLUSIONES GENERALES	128

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO I	Página
Cuadro I.1.	Características de la panoja entre los tres grupos de líneas de sorgo, en 2006..... 21
Cuadro I.2.	Características de anteras y polen entre los dos grupos de líneas androfértiles de sorgo, en 2006..... 23
Cuadro I.3.	Comparación de medias entre grupos de líneas isogénicas (A/B), para las variables que fueron estadísticamente significativas. Promedios de 2005 y 2006..... 24
Cuadro I.4.	Comparación de medias entre dos años (2005 y 2006) para las variables que fueron estadísticamente significativas. Promedios de líneas A y B..... 25
Cuadro I.5.	Promedios de temperatura ambiente y humedad relativa de los años 2005 y 2006..... 26
Cuadro I.6.	Características del pistilo y producción de semilla de las líneas A. Promedio de dos años (2005 y 2006)..... 27
Cuadro I.7.	Características del polen y producción de semilla entre líneas B. Promedio de dos años (2005 y 2006)..... 28
Cuadro I.8.	Efecto del ambiente (años) en las características del pistilo, polen y rendimiento de seis líneas A y B..... 31
CAPÍTULO II	
Cuadro II.1.	Cuadrados medios y significancia del ANOVA combinado para características de pistilo en líneas A y de polen en líneas B..... 42
Cuadro II.2.	Características del pistilo en líneas A y del polen en líneas B. Promedio de dos años (2005 y 2006)..... 43
Cuadro II.3.	Cuadrados medios y significancia del análisis combinado para las variables de germinación de polen, crecimiento de tubo polínico y producción de semilla entre cruzas..... 47
Cuadro II.4.	Germinación, crecimiento del tubo polínico y producción de semilla de cruzas A x B, en promedio de dos años (2005 y 2006)..... 47
Cuadro II.5.	Matriz de correlación entre las variables de germinación del polen y las del rendimiento y sus componentes..... 49
Cuadro II.6.	Variables del crecimiento del tubo polínico y de producción de semilla durante 2005 y 2006. Promedios de seis cruzas A x B..... 50
Cuadro II.7.	Matriz de correlación entre variables de germinación del polen <i>vs.</i> del pistilo y del polen..... 51

CAPÍTULO III

Cuadro III.1.	Cuadros medios de los ANAVA para las características florales de líneas de sorgo.....	67
Cuadro III.2.	Promedios de características florales de líneas de sorgo.....	68
Cuadro III.3.	Correlaciones entre características florales y flores enfermas de seis líneas A de sorgo.....	69
Cuadro III.4.	Cuadros medios y significancia del ANAVA entre cruzas A x B de sorgo para receptividad del estigma y producción de semilla.....	70
Cuadro III.5.	Comparación de medias para la interacción entre genotipo e infección artificial de <i>C. africana</i> en seis cruzas A x B de sorgo.....	71

CAPÍTULO IV

Cuadro IV.1.	Cuadros medios del análisis de varianza para germinación del polen, crecimiento del tubo polínico y pistilos fecundados de los dos grupos de tratamientos.....	87
Cuadro IV.2.	Comparación de medias para las variables relacionadas con la receptividad del estigma entre el grupo de tratamientos primero inoculados y los correspondientes a primero polinizados.....	88
Cuadro IV.3.	Cuadros medios de los análisis de varianza para porcentaje de pistilos enfermos.....	89
Cuadro IV.4.	Comparación de medias entre tratamientos para pistilos infectados en sorgo.....	89
Cuadro IV.5.	Cuadros medios del análisis de varianza para las variables medidas en la etapa de grano masoso y a la cosecha, en la cruza A9 x B9.....	92
Cuadro IV.6.	Comparación de medias entre tratamientos para las variables medidas en la etapa de grano masoso y a la cosecha.....	93

CAPÍTULO V

Cuadro V.1.	Contrastes entre ambientes para las variables fenológicas promedio de ambos progenitores, y de producción de polen viable de la línea B.....	112
Cuadro V.2.	Cuadros medios para polen depositado, producción de semilla, incidencia y severidad de <i>Claviceps africana</i> para ambientes y relaciones de surcos hembra:macho.....	114
Cuadro V.3.	Comparación de medias para la cantidad de polen depositado, producción de semilla, incidencia y severidad de <i>Claviceps africana</i> entre ambientes.....	114
Cuadro V.4.	Comparación entre las relaciones hembra:macho para la disponibilidad de polen, producción de semilla, incidencia y severidad de <i>Claviceps africana</i>	115
Cuadro V.5.	Correlación entre densidad de población, disponibilidad de polen,	

	producción de semilla, incidencia y severidad de <i>Claviceps africana</i> .	
	Datos promedio de los ambientes y las proporciones.....	116
Cuadro V.6.	Comparación de medias de la distancia a la fuente de polen dentro de cada proporción A9:B9 (P) para la cantidad de polen en los tres muestreos continuos de máxima deposición, rendimiento y sus componentes e incidencia de <i>C. africana</i>	118

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II					
Figura II.1.	Secciones del estilo (et) de sorgo de flores no polinizadas en microscopia de luz teñidos con Safranina O y verde rápido FCF.....				44
Figura II.2.	Cortes seriados transversales, del ápice a la base del estilo de sorgo, teñidos con Safranina O y verde rápido FCF 72 horas después de la polinización.....				45
Figura II.3.	Cortes en parafina teñidos con azul de anilina y epifluorescencia UV (excitación, 365 nm; emisión, 397 nm) que muestran la ruta del tubo polínico en el tejido de transmisión del estilo de sorgo 72 horas después de la polinización.....				45
Figura II.4.	Germinación del polen y crecimiento <i>in vivo</i> del tubo polínico de sorgo 18 horas después de la polinización.....				48
 CAPÍTULO III					
Figura III.1.	Esclerocio de sorgo.....				73
 CAPÍTULO IV					
Figura IV.1.	Germinación <i>in vivo</i> del polen de sorgo y conidios de <i>Claviceps africana</i> con azul de anilina y epifluorescencia UV (excitación, 365 nm; emisión, 397 nm).....				90
Figura IV.2.	Infección de <i>Claviceps africana</i> en cortes longitudinales en pistilos incluidos en parafina, teñidos con azul de anilina y epifluorescencia UV (excitación 365 nm; emisión 397 nm).....				91
 CAPÍTULO V					
Figura V.1.	Trampeo del polen de sorgo.....				108
Figura V.2.	Progreso de la floración de las líneas A9 y B9.....				111
Figura V.3.	Distancia a la fuente de polen durante el incremento de la línea A9 x B9 con las relaciones 6:2, 8:2, 12:2, y 16:2.....				117

RESUMEN

APORTACIONES AL ESTUDIO DE *Claviceps africana* Frederickson, Mantle & de Milliano EN LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA DE LÍNEAS DE SORGO EN VALLES ALTOS CENTRALES DE MÉXICO

Ma. Eugenia Cisneros López, Dr.

Colegio de Posgraduados 2008

El ergot (*Claviceps africana*) es un riesgo para la producción de semilla en líneas androestériles del sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). Para estudiar la relación entre las características florales, receptividad del estigma, interacción planta-hospedero y producción de semilla en polinización manual y abierta se realizaron cinco experimentos con líneas A, B y R adaptadas a los Valles Altos Centrales de México (2200 msnm), en condiciones de campo. Los resultados indicaron que existen diferencias en las características florales, pero la mayor variación se observó en la producción de semilla y sus componentes; estas últimas, igual que la producción de polen viable, fueron las que interaccionaron más con el ambiente. La cantidad de polen de las líneas fértiles en polinización manual no fue determinante para la producción de semilla de las líneas A. La incidencia de temperaturas mínimas (3.5 a 8.4 °C) durante la floración disminuyó la receptividad de los estigmas en los tres tipos de líneas y también influyó en la interacción polen-pistilo de las cruzas isogénicas. La presencia de *C. africana* afectó la interacción polen-estigma desde la etapa de adhesión del polen al estigma hasta la fertilización del ovario. La mayor reducción de la receptividad ocurrió cuando el polen y el inóculo llegaron en forma simultánea. Durante el incremento de A9 x B9 en polinización abierta, la falta de sincronía floral entre los progenitores, la cantidad de polen disponible durante la polinización y el aumento de la distancia a la fuente de polen, influyeron claramente en la incidencia del patógeno y en menor grado en el rendimiento. Estos resultados variaron entre ambientes (combinación de fecha de siembra y años).

Palabras clave: pistilo, polen, polinización, receptividad, sincronía floral.

SUMMARY
CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF *Claviceps africana* Frederickson, Mantle & de
Milliano IN SEED PRODUCTION OF SORGHUM LINES IN THE MEXICAN
HIGHLANDS

Ma. Eugenia Cisneros López, Dr.

Colegio de Posgraduados 2008

The ergot (*Claviceps africana*) is a risk for the production of seed in male-sterile sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) lines. The relations among floral characteristics, stigma-receptivity, plant-host interaction, and seed production in manual and open pollinated A, B and R-lines adapted to the Mexican Highlands (2200 m altitude), were studied in five experiments under field conditions. Significant differences were found among lines for floral characteristics, but the highest variation was observed in seed yield and its components. The seed yield and viable pollen production were the traits with higher genotype x environment interaction. The quantity of pollen produced by the fertile lines was not decisive for the seed yield of the A-lines under manual pollination. Minimum temperatures (3.5 to 8.4 °C) during the flowering period reduced stigma receptivity in the three types of lines and it also influenced the pollen-pistil interaction of isogenic crosses. *C. africana* affected the pollen-stigma interaction from the early stage of pollen adhesion to the stigma up to the ovary fertilization. The higher receptivity reduction was observed when the pollen and the conidia arrived to the stigma almost simultaneously. During the increase of the A9 line under open pollinated conditions, the lack of floral synchrony of the parents, the quantity of available pollen during the pollination period and the increase in the distance to the pollen source clearly influenced fungus incidence, but seed yield to a lesser degree. These results varied among environments (combination of sowing date and years).

Keywords: *Sorghum bicolor*, pistil, pollen, pollination, receptivity, floral synchrony.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es un cultivo que crece en regiones tropicales y subtropicales, originario de África (Dillon *et al.*, 2007). Su importancia económica se debe a que ocupa el quinto lugar en superficie sembrada después del trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) y cebada (*Hordeum vulgare*). El sorgo se cultiva en 42 millones de hectáreas de 98 países de África, Asia, Oceanía, y América. Nigeria, India, EUA, México, Sudán, China y Argentina son los mayores productores; además constituye la base alimenticia de 500 millones de personas en 30 países (Rao *et al.*, 2002). En el año 2007 se produjeron 63 millones de toneladas, casi 8% más que el año anterior; el incremento ocurrió porque Argentina y EUA aumentaron su superficie cultivada, en respuesta a la demanda de granos, causada por la presión de la industria de los biocombustibles que usan maíz. En África y Asia, los cuales representan cerca de 40 y 20% de la producción mundial, experimentaron poco cambio en 2007 (FAO, 2007).

En México, el cultivo ha ocupado un papel relevante en el sector agropecuario, tanto del subsector pecuario como de la agroindustria. Entre los diez principales granos básicos, el sorgo ocupa el segundo lugar en cuanto a la producción (3.3 millones de toneladas), después de maíz, y tercer lugar en cuanto a la superficie sembrada (1 millón de hectáreas), después del maíz y frijol, con un rendimiento promedio nacional de 3.8 t ha⁻¹ (SIAP, 2008). El cultivo se siembra en cuatro regiones agroecológicas: El Bajío, Noreste y Noroeste, Pacífico Norte, y Sureste; los principales estados productores son: Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Sinaloa y Tamaulipas (SIAP, 2003). Agronómicamente ha demostrado ser más resistente a las irregularidades meteorológicas en las regiones de agricultura de secano,

donde ha desplazado a otros cultivos menos rentables. Cabe mencionar que la superficie sembrada ha mostrado gran variabilidad en los últimos 20 años (SAGAR, 2000).

México es el mayor importador mundial de sorgo, aunque es un cultivo estratégico para el país, ya que es un insumo fundamental para el sector pecuario que demandará en el año 2008 más de 8 millones de toneladas y se importarán cerca de 3 millones. Los precios del sorgo dependen en gran parte de los movimientos del mercado de maíz, por la relación entre ambos y el uso que se les da (ASERCA-SAGARPA, 2008).

El ergot o cornezuelo del sorgo es una plaga de importancia económica en México. El agente causal es *Claviceps africana* Frederickson, Mantle & de Milliano (anamorfo *Sphacelia sorghi*). Es una enfermedad endémica de las regiones donde el cultivo tiene su centro de origen, pero recientemente *C. africana* ha invadido otras áreas del mundo; el primer movimiento ocurrió de África a la India. Los estudios con marcadores moleculares han permitido concluir la homogeneidad genética del patógeno que invadió casi al mismo tiempo América e India-Australia (Pazoutová *et al.*, 2000). En América los primeros reportes se dieron en Brasil en 1995; en 1996 en Argentina, Bolivia, Colombia, Venezuela y Australia; durante 1997 la enfermedad se dispersó a Honduras, República Dominicana, Jamaica, Puerto Rico, México y Estados Unidos (Villarreal, 1998). No ha sido posible determinar con precisión cómo el patógeno entró en México.

El ergot es una plaga cuarentenaria en México, tipo A2: presente en el país bajo control oficial; la normatividad vigente es NOM-078-FITO-2000; el objetivo es tener la plaga bajo vigilancia para evitar que se convierta en una plaga endémica. En la producción destinada al incremento de progenitores, producción de semilla híbrida y evaluación de germoplasma experimental, la semilla debe estar libre de esclerocios; pero la tolerancia es hasta 5 esclerocios por 100 toneladas de semilla certificada (SAGAR, 2000).

REVISIÓN DE LITERATURA

1. El ergot del sorgo

1.1. Agente causal

El sorgo puede ser atacado por tres diferentes especies del género *Claviceps*: *C. sorghi*, *C. africana* y *C. sorghicola*. Desde 1997, *Claviceps africana* fue identificada en México como el agente causal (Aguirre *et al.*, 1997; Zapote, 1998; Hernández-Martínez *et al.*, 2001), por tanto se hará énfasis en esta especie.

Claviceps africana se distingue por: a) la producción de un tejido llamado esfacelia de color blanquecino, presente en flores infectadas; b) la producción de tres tipos de conidios (micro, macro y conidios secundarios); c) la formación de esclerocios en la fase sexual, que son estructuras duras, de forma esférica a oval y confinadas dentro de las estructuras florales (glumas) del hospedante (Bandyopadhyay *et al.*, 2002). Este hongo tiene dos fases: asexual (*Sphacelia sorghi* McRae) que se caracteriza por formar macroconidios: hialinos, mononucleados, oblongos a ovales y constreñidos en la parte central (9 a 17 x 5 a 8 μm); y microconidios: hialinos, mononucleados y esféricos (2 a 3 μm) (Frederickson *et al.*, 1991) y bajo ciertas condiciones ambientales se puede presentar la fase sexual (*Claviceps africana*) (Frederickson *et al.*, 1989).

1.2. Etiología

El origen del inóculo en campo puede ser: a) por ascosporas provenientes de esclerocios germinados; b) por conidios del esfacelio (Williams *et al.*, 1998) y c) por conidios de otros hospedantes como el zacate Johnson (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) (Reed *et al.*, 2002). Frederickson *et al.* (1991) encontraron que la germinación de los conidios puede ocurrir entre 15 a 24 h después de la inoculación artificial (en condiciones de invernadero). En El Bajío, México (1560 msnm), con temperatura de 11 a 29 °C y una

humedad relativa de 50 a 85%, con inoculación artificial, se encontró que la infección en el estilo ocurre entre 48 a 56 h después de la inoculación; posteriormente la infección avanza y coloniza la pared del ovario hasta alcanzar la base, penetra al saco embrionario por el micrópilo y completa la infección del ovario entre 6 a 7 d. Los síntomas externos se manifiestan por la producción de conidios en esfacelia (8 a 9 d después de la inoculación); un día después aparece el exudado (mielecilla blanquecina y transparente) y a los 40 d aparecen los esclerocios (Hernández- Martínez *et al.*, 2001). Los esclerocios resultan del endurecimiento del esfacelio; forman cuerpos duros, primero blancos pero gradualmente se tornan entre cremosos y grises y reemplazan los tejidos de la semilla; no se conocen reportes de la viabilidad de los esclerocios en México (Bandyopadhyay *et al.*, 2002).

1.3. Epidemiología

Condiciones climáticas con temperaturas cercanas a 19°C, humedad relativa alta y abundante nubosidad desde el inicio de la floración hasta la fertilización favorecen la infección del patógeno (McLaren y Wehner, 1990). Temperaturas moderadas (14 a 28 °C) combinadas con altas HR (>90%) inducen la producción de conidios y por lo tanto favorecen la dispersión de la enfermedad, pero en esas condiciones no hay diferenciación de esfacelia a esclerocios; cuando hay temperaturas de 28 a 35°C y HR menores de 90% existe formación de esclerocios, pero no hay producción de exudado ni de esporas (Bandyopadhyay *et al.*, 1990). Cabe mencionar que el estado perfecto no se ha observado en forma natural en parte alguna del mundo, por tanto, los esclerocios juegan un papel secundario en la epidemiología de la enfermedad; actualmente se cree que los conidios primarios, formados en el esfacelio del hospedantes, y los conidios secundarios, los cuales son dispersados por el viento, son fuente principal de inóculo (Frederiksen y Odvody, 2000).

1.4. Hospedantes y susceptibilidad varietal

Los genotipos con pobre producción de polen viable, tales como variedades de sorgo forrajero y las líneas androestériles usadas en la producción de semilla híbrida son particularmente susceptibles; no se ha identificado resistencia genética total en líneas hembras de sorgo (Reed *et al.*, 2002). Además del *Sorghum bicolor* como hospedero se tienen hospederos alternos como: *Cenchrus*, *Pennisetum*, *Panicum* y *Sorghum halapense* (Pasto Johnson) (Reed *et al.*, 2002). Además, en México se han reportado como hospederos a: *Digitaria horizontalis*, *Ixocarpus unisetus*, *Echinochloa ruscgalli*, *Cenchrus echinatus* y *Panicum maximum* (Montes-Belmont *et al.*, 2002).

1.5. Control

En ausencia de resistencia genética para esta plaga (Tegegne *et al.*, 1994) y ante la gran variabilidad de respuestas entre genotipos, localidades y años en México (Soltero-Díaz y Williams-Alanís, 2003), se sugiere un manejo preventivo; sembrar semilla certificada y eliminar malezas nocivas, muchas de las cuales son hospedantes alternos en lotes para producción de semilla y de evaluación experimental (SNICS, 1985). La aplicación de fungicidas a la semilla no es suficiente porque la etapa de mayor vulnerabilidad ocurre durante la floración (Bandyopadhyay *et al.*, 1998). El tiempo y la constante presencia de polen viable proveen la mejor forma de protección contra el patógeno durante la producción de semilla híbrida, además de usar fungicidas, como los triazoles (Tilt) (Montes *et al.*, 2002). La eficacia del control químico en campo depende de la distribución e incidencia del patógeno, la susceptibilidad del genotipo, la oportunidad de aplicación, así como la dosis y el producto (Aguirre, 1997).

2. Floración, producción y viabilidad del polen en sorgo

La floración es un proceso que comprende varias etapas y comienza con la diferenciación de las estructuras vegetativas a reproductivas inducida por estímulos externos y controlada genéticamente (Chasan y Walbot, 1993). En sorgo, los factores que afectan la floración, además del genético, son el fotoperiodo (aunque existen variedades insensibles) y la temperatura (Morgan *et al.*, 2002). La duración de la floración varía entre genotipos y ambientes; según Pendleton *et al.* (1994), la mayor proporción de la floración ocurre en los primeros tres días; posteriormente declina y hay panículas que completan su floración en 13 d. La antesis empieza de la parte apical a la parte basal en las flores sésiles, durante la mañana, pero la humedad y los días fríos retrasan este proceso (Maiti, 1993).

Las temperaturas de 12 °C o inferiores reducen la cantidad de polen viable en los genotipos fértiles susceptibles al frío; también pueden afectar la receptividad de los estigmas, pero la magnitud de este efecto depende del genotipo y los niveles de temperatura (Osuna-Ortega *et al.*, 2003). Asimismo, las bajas temperaturas afectan la germinación del grano de polen, pues a 10 °C la germinación es casi nula, pero lo mismo ocurre con temperatura cercanas a 40 °C (Tuinstra y Wedel, 2000). Incluso los cambios en hidratación del polen pueden causar deterioro por desecación y este tipo de daño es irreversible (Lansac *et al.*, 1994). Aunque el sorgo es una planta autógama, la fenología floral y la producción de polen viable son aspectos de importancia agronómica para la producción de semilla, pues para generar híbridos, se utiliza un sistema de androesterilidad génico-citoplásmica en el que intervienen líneas androestériles, mantenedoras y restauradoras de la fertilidad (Fenwick, 1988).

3. Interacción polen-estigma-patógeno

La interacción polen-pistilo empieza con el contacto, adhesión, hidratación, activación, germinación y desarrollo del tubo polínico (Edlund *et al.*, 2004). Cuando el polen es compatible, el resultado final de una interacción positiva es la fertilización del óvulo, pero si el polen es incompatible, alguno de los procesos que ocurren en el estigma no se presentan o el tubo polínico es rechazado en cualquier parte del pistilo (Cheung, 1995); sin embargo, las condiciones ambientales, en particular la temperatura y humedad previas y durante la floración pueden influir en la magnitud de esos procesos (Kumar *et al.*, 1995). En sorgo, la consecuencia biológica de una polinización o fertilización deficientes son las fallas en la formación de semilla (Hodnett *et al.*, 2005); además, aumenta su vulnerabilidad al ataque del ergot (*Claviceps africana*) (Wang *et al.*, 2000), por la competencia que se puede establecer entre el polen y el conidio del patógeno.

OBJETIVOS GENERALES

- 1.-Evaluar las diferencias en la morfología floral, panoja y producción de semilla entre líneas estériles y fértiles.
- 2.- Evaluar la interacción polen-pistilo en cruzas isogénicas A x B en condiciones de campo y su efecto en la producción de semilla.
- 3.-Medir el efecto de *Claviceps africana* en la interacción polen-estigma en la producción de semilla de cruzas isogénicas.
- 4.-Conocer el efecto de la competencia entre el crecimiento del tubo polínico y de las hifas de *C. africana* en la receptividad estigmática y la producción de semilla, en condiciones de campo.

5.-Medir las diferencias entre las proporciones de surcos hembra:macho durante el incremento de una línea androestéril en presencia de infección natural de *C. africana*.

HIPÓTESIS

1. Hipótesis general

Las características florales de las líneas androestériles y fértiles de sorgo influyen en la receptividad del estigma y la producción de semilla; sin embargo, la magnitud de la respuesta depende del tipo de polinización, disponibilidad de polen viable, condiciones ambientales y tipo de infección (artificial o natural) de *Claviceps africana*.

2. Hipótesis particulares

No existen diferencias florales entre líneas isogénicas de sorgo y por tal motivo, ambos grupos deben producir la misma cantidad de semilla bajo polinización controlada. Entre las líneas androestériles hay variabilidad en las características del pistilo, al igual que entre las líneas mantenedoras para características del polen, y estas características están asociadas con la producción de semilla.

La receptividad del estigma es resultado del grado de compatibilidad entre polen-estigma y si esta respuesta es positiva hay formación de semilla pero la magnitud de la respuesta varía entre los pares isogénicos y entre ambientes.

La receptividad del estigma, durante la polinización y la inoculación controladas, es afectada por la presencia de *Claviceps africana*, pero el tiempo de arribo entre el polen vs. el inóculo determina el éxito de la polinización y en consecuencia, la producción de semilla.

Las líneas fértiles de sorgo tolerantes al frío son buenas productoras de polen viable, por lo que la cantidad de polen no debe ser un factor restrictivo en el rendimiento durante el incremento de un par A x B, aún en presencia de *Claviceps africana*.

LITERATURA CITADA

- Aguirre, R. J., A. H. Williams, G. N. Montes, and H. M. Cortinas. 1997. First report of sorghum ergot caused by *Sphacelia sorghi* in Mexico. *Plant Dis.* 81: 31.
- ASERCA-SAGARPA. 2008. <http://www.aserca.gob.mx/Directorio/index.asp>.
- Bandyopadhyay, R., D. E. Frederickson, N. W. McLaren, G. N. Odvody, and M. J. Ryley. 1998. Ergot: A new disease threat to sorghum in the Americas and Australia. *Plant Dis.* 82: 356-367.
- Bandyopadhyay, R. D., V. Muthusubramanian, P. W. Tooley, S. Chakraborty, S. Pazoutová, and S. S. Navi. 2002. Distribution and diversity of the sorghum sugary disease pathogens in India. *In: Sorghum and Millets Diseases*. Leslie, J. F. (ed). Iowa State Press. pp: 75-78.
- Chasan, R., and V. Walbot. 1993. Mechanism of plant reproduction: Questions and approaches. *Plant Cell* 5: 1139-1146.
- Cheung, A. Y. 1995. Pollen-pistil interactions in compatible pollination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 3077-3080.
- Edlund, A. F., R. Swanson, and D. Presus. 2004. Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. *Plant Cell* 16: 84-94.
- FAO. 2007. Food Outlook. Gobal Market Analysis. www.fao.org/docrep/010/ah876e/ah87eo4.hatm#32
- Fenwick, A. K. 1988. Seed Production of Agricultural Crops. Logman Scientific Technical. John Wiley and Sons, Inc. New York. pp: 88-90.
- Frederiksen, R. A., and G. N. Odvody. 2000. Compendium of Sorghum Diseases. 2nd Ed. APS Press. pp: 40-42.

- Frederickson, D. E., P. G. Mantle, and W. A. J. de Milliano. 1991. *Claviceps africana* sp. nov.; the distinctive ergot pathogen of sorghum in Africa. *Mycol. Res.* 95: 1101-1107.
- Hernández-Martínez, M., E. Cárdenas-Soriano, L. E. Mendoza-Onofre, S. Osada-Kawasoe, P. Ramírez-Vallejo y F. Zavala-García. 2001. Patogénesis de *Claviceps africana* en ovarios de sorgo. *Agrociencia* 35: 535-542.
- Hodnett, G. L., B. L. Burson, W. L. Rooney, S. L. Dillon, and H. J. Price. 2005. Pollen-pistil interactions result in reproductive isolation between *Sorghum bicolor* and divergent Sorghum species. *Crop Sci.* 45: 1403-1409.
- Kumar, A., R. K. Chowdhury, and O. S. Dahiya. 1995. Pollen viability and stigma receptivity in relation to meteorological parameters in pearl millet. *Seed Sci. Technol.* 23:147-156.
- Lansac, A. R., C. Y. Sullivan, B. E. Johnson, and K. W. Lee. 1994. Viability and germination of pollen of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Ann. Bot.* 74: 27-33.
- Maití, R. 1993. Morphophysiological Traits in Crop Improvement: Case Study – Sorghum. Pedro A. Wesche-Ebeling. Publicaciones Biológicas. UANL. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. 289 p.
- McLaren, N. W., and F. C. Wehner. 1990. Relationship between climatic variables during early flowering of sorghum and the incidence of sugary disease caused by *Sphacelia sorghi*. *J. Phytopathol.* 130: 82-88.
- Montes-Belmont, R., H. E. Flores-Moctezuma, and R. Arnulfo. 2002. Alternate host of *Claviceps africana* Frederickson, Mantle and de Milliano, causal agent of sorghum “Ergot” in the state of Morelos, Mexico. *Rev. Mex. Fitopat.* 21: 63-66.
- Montes, N., G. N. Odvody, and H. Williams-Alanis. 2002. Advances in *Claviceps africana* chemical control. *In: Sorghum and Millets Diseases*. Leslie, J. F (ed). Iowa State Press. pp: 105-110.
- Morgan, P. W., A. S. A. Finlayson, K. L. Childs, J. E. Mullet, and W. L. Rooney. 2002. Opportunities to improve adaptability and yield in grasses. Lessons from sorghum. *Crop Sci.* 42: 1791-1799.

- Osuna Ortega, J., Ma. del C. Mendoza-Castillo, and L. E. Mendoza-Onofre. 2003. Sorghum cold tolerance, pollen production, and seed yield in the Central High Valleys of Mexico. *Maydica* 48: 125-132.
- Pazoutová, S., R. Bandyopadhyay, D. E. Frederickson, P. G. Mantle, and R. A. Fredericksen. 2000. Relations among sorghum ergot isolates from the Americas, Africa, India and Australia. *Plant Dis.* 84: 437-442.
- Pendleton, B. B., G. L. Teetes, and G. G. Peterson. 1994. Phenology of sorghum flowering. *Crop Sci.* 34: 1263-1266.
- Reed, J. D., B. A. Ramundo, L. E. Clafin, and M. R. Tuinstra. 2002. Analysis of resistance to ergot in sorghum and potential alternate hosts. *Crop Sci.* 42: 1135-1138.
- SAGAR (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Recursos Hidráulicos). 2000. Situación Actual y Perspectiva de Producción de Sorgo en México- 1990-1999. Centro de Estadística Agropecuaria. México, D. F., México. pp: 12-15.
- SAGAR (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural). 2000. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. a 9 de junio del 2000. Norma Oficial Mexicana. 21 p.
- SIAP (Sistema de Información Agropecuaria). 2003. Panorama internacional para el sorgo. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Boletín Semanal del 14 de Enero del 2003.
- SIAP (Sistema de Información Agropecuaria). 2008. Panorama internacional para el sorgo. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Boletín Mensual al 30 de diciembre del 2007.
- SNICS (Servicio Nacional de Certificación de Semillas). 1985. Normas para la Certificación de Semillas. SAG. México. 91 p.
- Soltero-Díaz, L. y H. Williams-Alanís. 2003. Incidencia y severidad del cornezuelo (*Claviceps africana* Frederickson, Mantle and de Milliano) en híbridos comerciales de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] en la Ciénega de Chapala, Jalisco, México. *Rev. Mex. Fitopat.* 21: 26-33.
- Tegegne, G., R. Bandyopadhyay, T. Mulatu, and Y. Kebede. 1994. Screening for ergot resistance in sorghum. *Plant Dis.* 78: 873-876.
- Tuinstra, M. R., and J. Wedel. 2000. Estimation of pollen viability in grain sorghum. *Crop Sci.* 40: 968-970.

Wang, E., H. Meinke, M. Ryley, D. Herde, and R. Henzell. 2000. On the relation between weather variables and sorghum ergot infection. *Aust. J. Agric. Res.* 51: 313-324.

Zapote M., C. A. 1998. Histopatología de *Claviceps* sp. en México. *In*: Semana de Control de Calidad en Semillas. Cd. de México, del 31 de agosto al 05 de septiembre de 1998. Comisión de Sanidad Agropecuaria. Dirección de Sanidad Vegetal. p. 40.

CAPÍTULO I. MORFOLOGÍA DE LA PANOJA DE SORGO (*Sorghum bicolor* L. Moench) Y FERTILIDAD DE LÍNEAS A, B y R TOLERANTES AL FRÍO†

I. 1. RESUMEN

La producción de semilla de las líneas A, mediante polinizaciones manuales, generalmente es inferior a la de las líneas B autofecundadas. Para evaluar las diferencias florales y su efecto en la producción de semilla, en Montecillo, Edo. de México (2240 m de altitud) se sembraron seis pares de líneas A y B, y cuatro restauradoras tolerantes al frío, en 2005 y 2006. Se midieron características morfológicas de la panoja (*i. e.*: longitud de raquis, ramas primarias, flores fértiles por panoja); y reproductoras (*i. e.*, peso de 100 semillas, número y rendimiento de semilla, y proporción semillas/flores por panoja). En las líneas A se midieron características morfológicas del pistilo y en las líneas androfértiles, atributos de antera y polen. El grupo de líneas R superó a los otros grupos en número de flores, proporción semillas/flores y rendimiento de semilla por panoja; además, produjo más granos de polen, de menor tamaño y con mayor viabilidad durante un periodo de floración más largo. Entre los grupos A y B sólo hubo diferencias significativas para la mayoría de las características reproductoras, las que interaccionaron más con el ambiente. La cantidad de polen viable de las líneas B y R utilizado en las polinizaciones manuales no fue un factor restrictivo en la menor producción de semilla de las líneas A. La incidencia de temperaturas mínimas (3.5 a 8.4 °C) pudieron afectar la receptividad de los estigmas en los tres tipos de líneas e influir en la viabilidad del polen de las líneas androfértiles.

†Una versión al inglés de este capítulo, se encuentra en arbitraje en J. Agron. Crop Sci.

Palabras clave: *Sorghum bicolor*, morfología floral, proporción semillas/flores, tolerancia al frío, viabilidad del polen.

1.2. INTRODUCCIÓN

En la producción de semilla híbrida de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) participan tres tipos de líneas (Bantilan *et al.*, 2004): una con androesterilidad génico-citoplásmica que no produce polen viable (línea A); una isogénica androfértil mantenedora de la androesterilidad (línea B) y una androfértil restauradora de la fertilidad (línea R). La semilla de la línea A se obtiene al cruzarla con su mantenedora B. La semilla del híbrido es la F1 de la cruce simple A x R.

En los Valles Altos Centrales de México (2200 m de altitud), las bajas temperaturas (entre 10 y 12 °C) afectan a los procesos reproductivos durante la microsporogénesis del sorgo. En genotipos androfértiles susceptibles al frío, las bajas temperaturas causan retraso de la floración, baja producción de polen, alto porcentaje de polen estéril, disminución de la receptividad del estigma y pueden florecer pero no producir semilla (Osuna-Ortega *et al.*, 2003). En el Colegio de Postgraduados (CP), desde 1990 se han desarrollado híbridos experimentales tolerantes al frío que producen entre 50 y 100% de polen fértil, cuyos estigmas pueden mantenerse receptivos hasta por tres semanas aún en temperaturas de 6 °C (Osuna-Ortega *et al.*, 2000), sin afectar la producción de grano en condiciones de polinización libre. Sin embargo, en las líneas A polinizadas manualmente con sus contrapartes androfértiles (líneas B) o con líneas R para producir semilla híbrida, la producción de semilla generalmente es escasa, a pesar de que la polinización se efectúa en dos ocasiones con mezcla abundante de polen (Cisneros-López *et al.*, 2007). En contraste, las panojas autofecundadas de las líneas B y R producen mayor cantidad de semilla. Esto plantea la necesidad de estudiar la morfología y la fisiología de los órganos reproductores de las líneas progenitoras de este tipo de híbridos, para conocer las causas de la baja producción de semilla. No se conocen resultados de estudios sobre este tema en México.

Los estudios más recientes de la morfología de las estructuras reproductoras de sorgo se han enfocado a la identificación de fuentes de tolerancia al ergot o cornezuelo (*Claviceps africana* Frederickson, Mantle & de Milliano). Según Bandyopadhyay *et al.* (1998), la expresión de la tolerancia se relaciona con la conducta floral de las líneas que influye en la forma y velocidad de la polinización previa a la fecundación e infección. La incidencia del ergot en las líneas R se ha relacionado con estigmas cortos (Dahlberg *et al.*, 2001). En México, Hernández-Martínez *et al.* (2002) informaron que las líneas B y R tolerantes al frío generadas por el CP y sembradas en Celaya, Gto. presentaron mayores porcentajes de polen fértil, periodos de floración más cortos y mayores rendimientos de semilla por panoja que líneas B y R clasificadas como tolerantes al ergot. También se han reportado diferencias en tamaño de panoja, número de semillas por panoja y acumulación de materia seca en la panoja entre líneas A y sus isolíneas B (Cisneros-López *et al.*, 2007).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la relación entre las características morfológicas de la panoja y la calidad del polen, con la producción de semilla de líneas A, B, y R de sorgos tolerantes al frío, en condiciones de campo, con polinización manual. La hipótesis general fue que la fertilidad de las líneas depende de la morfología floral y la disponibilidad, viabilidad y tamaño del grano de polen, y de su interacción con el ambiente.

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

En Montecillo, Edo. de México, se estableció un experimento de campo, con riego, en los ciclos de cultivo 2005 (siembra, 11 de junio; cosecha, noviembre) y 2006 (siembra, 9 de mayo; cosecha, octubre). En cada experimento se sembraron seis pares de líneas isogénicas (identificadas como A1/B1, A2/B2, A3/B3, A5/B5, A6/B6 y A9/B9) y cuatro líneas restauradoras (R1, R2, R3 y R4), aunque en el primer año el grupo de líneas R se perdió durante la emergencia. La temperatura y humedad relativa a la intemperie se

registraron en una estación meteorológica ubicada a 150 m del sitio experimental. La parcela experimental fue de cinco surcos de 5 m de longitud con 0.92 m de anchura y 0.15 m entre plantas; la parcela útil se ubicó en los tres surcos centrales.

Las panojas recién emergidas de 40 plantas con competencia completa y con características similares, de cada genotipo, se cubrieron con bolsas de papel. En una submuestra de estas plantas se midieron las siguientes variables, con excepción de las variables fenológicas en las que los datos se tomaron por parcela:

VARIABLES FENOLÓGICAS. Días a antesis (DA), desde la siembra hasta que la mitad de las plantas de la parcela presentaron 50% de floración; periodo de floración (PF), días desde el inicio hasta el final de la floración.

Características de la panoja. Al inicio de la floración se marcaron cinco plantas por genotipo y a su término se cortaron las panojas y se registraron las siguientes variables, según CIAT (1983) y Brown *et al.* (2006): longitud del raquis (LR), ramas primarias por panoja (RP), nudos por panoja (NP), flores por rama (FR) y flores por panoja (FP); sólo se consideraron a las flores sésiles (fértiles) (House, 1982). Las mediciones se hicieron con un microscopio estereoscópico (Stereo Star Zoom Reichert® Mod 569).

Dimensiones de la antera y pistilo. Durante la disección de las cinco panojas de cada genotipo se eligieron 10 flores de la parte media de una rama. A cinco anteras se midió su longitud (LA) y anchura de la parte central (AA), con un vernier digital (Mitutoyo® Caliper No. 500-776), y en 10 pistilos se midió la longitud total (LPs), la del estigma (LEg), la del ovario (LOv) y por diferencia se estimó la longitud del estilo [LEt = LPs – (LEg + LOv)].

Producción de polen (PP). El polen se colectó diariamente en panojas individuales de cinco plantas de las líneas B y R, durante el periodo de floración, en las mismas plantas

(Vidal-Martínez *et al.*, 2001), a las 17:00 h. La bolsa de papel se sustituía. Las muestras se secaron a 75 °C durante 24 h; después, los restos florales se eliminaron y el polen se pesó en una balanza analítica. La variable corresponde a la suma de las muestras diarias de cada panoja.

Tamaño y viabilidad del polen. Al inicio de la antesis se fijó en FAA una rama de la parte media de la inflorescencia de cada una de cinco plantas androfértiles. Después, se extrajeron y se abrieron tres anteras de cada rama; el contenido de cada antera se colocó en un porta objetos y se agregó 1 a 2 gotas de azul de anilina (0.05 g mL^{-1}) en una solución de lactofenol (Kelly *et al.*, 2002). El diámetro del grano de polen (DGp) se midió en una muestra de 100 granos, con un microscopio de luz Zeiss® Xioskop 2 plus; se usó el procesador de imágenes AxionVision 4.4. La viabilidad del grano de polen se midió en 10 anteras (cinco campos de 20 granos por antera, en promedio) por rama, en granos con forma y tamaño normal, los que se clasificaron en dos grupos: viables, con densidad citoplásmica mayor que 75%, y estériles, menos de 50% (Osuna-Ortega *et al.*, 2003) y se calcularon los porcentajes de polen viable (PV) y estéril (PE).

Componentes del rendimiento. En cada línea A, al presentar 50% de floración, se hicieron polinizaciones manuales, entre las 13:00 y 14:00 h siempre por la misma persona. Cada panoja se polinizó con dos plantas de su línea B; este proceso se repitió 2 d después de que las panojas terminaron de florear. La semilla de las líneas B y R se obtuvo por autopolinización. Se cosecharon cinco cruza por genotipo y cuando el grano tenía $13 \pm 2\%$ de humedad, se midió el rendimiento de semilla por panoja (RSP) y el peso de 100 semillas (P100S). Se calculó el número de semillas por panoja [$SP = (RSP/P100S) \times 100$] y la proporción semillas/flores por panoja, expresada en porcentaje ($S/F = SP/FP \times 100$).

Análisis estadísticos. Se hicieron tres tipos de análisis de varianza (ANOVA), con un diseño de tratamientos completamente al azar: 1) Individual, para conocer las diferencias entre los grupos de líneas, con PROC GLM; 2) Individual, para medir las diferencias dentro de cada grupo, con PROC ANOVA; y 3) Combinado, para evaluar la interacción de años y líneas, con PROC ANOVA. Cuando procedía, se aplicó la prueba de comparación de medias GLM-LSMEANS-PDIFF-Tukey ($p \leq 0.05$) y ANOVA-MEANS-Tukey ($p \leq 0.05$), con el paquete estadístico SAS-9.1 (SAS, 2002). Además se hicieron correlaciones simples (PROC-CORR) entre las variables de líneas A o B que resultaron significativas en el AdV respectivo.

I.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de la panoja, floración, fertilidad del polen y producción de semilla entre los grupos de líneas A, B y R

Los resultados de los AdV individuales (no presentados) indicaron que en todas las variables hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tres grupos de líneas (A, B y R), excepto en la variable ramas por panoja y en días a antesis entre los dos grupos de líneas androfértiles (B y R).

En las características fenológicas (DA y PF) y morfológicas de la panoja (LR, NP, FR, y FP) el grupo de líneas A no presentó diferencias ($p \leq 0.05$) con el grupo de líneas B, lo cual ratifica el alto grado de isogenia de esos grupos para esas variables (Cuadro I.1). En cambio, en las variables reproductoras (RSP, P100S, SP y S/F) hubo diferencias significativas entre ambos grupos; *i. e.*, el grupo de líneas A presentó menor número y rendimiento de semillas por panoja, a pesar de que su peso de semilla fue mayor, y su relación semillas/flores fue menor a la mitad de la del grupo de líneas B. El grupo de líneas R superó entre 14 y 23% al promedio de las variables morfológicas y entre 10 y 60% a las variables reproductoras de la panoja de los grupos de líneas A y B; además, el grupo R fue

2.5 d más tardío, su período de floración fue 3 d más amplio y presentó casi el doble de la proporción semillas/flores por panoja del promedio del par isogénico. En líneas de sorgo tolerantes al frío se han reportado diferencias en la cantidad de grano obtenido por autofecundación comparado con el de polinización libre, así como entre ambientes, dentro y entre grupos de líneas B y R (Osuna-Ortega *et al.*, 2000, 2003).

Cuadro I.1. Características de la panoja entre los tres grupos de líneas de sorgo, en 2006.

Grupo	Fenológicas		Morfológicas				Reproductoras			
	DA (d)	PF (d)	LR (cm)	NP	FR	FP	RSP (g)	P100S (g)	SP	S/F (%)
A	94.0 b	13.8 b	21.1 b	12 b	34.4 b	1729 b	10.57 c	2.126 a	497 c	28.7 b
B	92.8 b	14.2 b	21.8 b	12 b	32.0 b	1577 b	16.82 b	1.488 b	1112 b	70.5 a
Prom.	93.4 (97)	14.0 (82)	21.4 (86)	12 (86)	33.2 (79)	1653 (77)	13.79 (40)	1.810 (90)	807 (46)	49.6 (60)
R	95.7 a (100)	16.5 a (100)	24.9 a (100)	14 a (100)	42.0 a (100)	2142 a (100)	34.37 a (100)	2.006 a (100)	1771 a (100)	82.7 a (100)

DA = días a antesis; PF = período de floración; LR = longitud del raquis; NP = nudos por panoja; FR = flores por rama; FP = flores por panoja; RSP = rendimiento de semilla por panoja; P100S = peso de 100 semillas; SP = semillas por panoja; S/F = proporción semillas/flores por panoja. Valores dentro de paréntesis expresan porcentajes del promedio de los grupos de líneas A y B con respecto al grupo de líneas R. Valores con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer, $p \leq 0.05$).

Al igual que en estudios previos (Cisneros-López *et al.*, 2007), en este caso se observó un menor número de semillas en las líneas A que en sus isolíneas androfértiles B, a pesar de que se uniformó la técnica experimental de cruzamientos manuales A x B.

La proporción semillas/flores por panoja promedio mostró valores de 82.7% en líneas R, 70.5% en líneas B y 28.7% en las líneas A. Si bien no es raro que el número de semillas producidas en las líneas androestériles sea inferior al el número de flores, el que esta relación no llegue al 100% en las líneas androfértiles sugiere que a pesar de su

tolerancia al frío, es posible que las bajas temperaturas imperantes en el ciclo hayan afectado la receptividad de sus estigmas (Osuna-Ortega *et al.*, 2003). Cabe destacar que la proporción semillas/flores por panoja aplicada en este estudio, no está asociada al fenómeno de “blasting” que las líneas A presentan con frecuencia.

Al comparar las características de las anteras (LA y AA) y polen (DGp, PP, PV y PE) entre los dos grupos de líneas androfértiles, sólo en longitud de antera no hubo diferencias significativas (Cuadro I.2). El grupo de líneas B superó ($p \leq 0.05$) al de líneas R en anchura de antera (8%), diámetro del grano de polen (4%) y porcentaje de polen estéril (8%); mientras que el grupo de líneas R produjo 48% más polen que el grupo de líneas B, quizás en parte debido a que su periodo de floración fue 2 d mayor, pero apenas 1.4% más de polen viable. En arroz (*Oryza sativa*), el tamaño de antera, el tamaño del polen y la producción total de polen son caracteres que diferencian a los genotipos susceptibles de los tolerantes al frío (12 °C) (Takeda *et al.*, 1987).

En esta evaluación el porcentaje de polen viable promedio de las líneas B y R (73%) fue superior al determinado en generaciones anteriores, en las que el polen fértil varió entre 50 y 60% (Osuna-Ortega *et al.*, 2003), infiriéndose que aunque se ha ganado tolerancia al frío, aún hay 17% de polen estéril. Como se mencionó para el caso de la proporción semillas/flores por panoja, en sorgo se desconoce el umbral de temperaturas bajas que afectan a la microsporogénesis y a la megasporogénesis. También Hammer *et al.* (1989) encontraron que en un mismo grupo de genotipos de sorgo las respuestas de crecimiento

Cuadro I.2. Características de anteras y polen entre los dos grupos de líneas androfértiles de sorgo, en 2006.

Grupo	LA (mm)	AA (mm)	DGp (μ m)	PP (mg)	PV (%)	PE (%)
B	3.38 a (102)	0.57 a (108)	44.0 a (104)	459 a (52)	72.6 b (98)	17.0 a (108)
R	3.33 a (100)	0.53 b (100)	42.4 b (100)	886 b (100)	74.0 a (100)	15.8 b (100)

LA = longitud de antera; AA = anchura de antera; DGp = diámetro del grano de polen; PP = producción de polen; PV = polen viable; PE = polen estéril. Valores dentro de paréntesis expresan porcentajes del grupo de líneas B con respecto al grupo de líneas R. Valores con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer, $p \leq 0.05$).

y rendimiento varían ante temperaturas mínimas entre 12.1 y 13.5 °C. Estos resultados confirman la complejidad del fenómeno de la tolerancia al frío en sorgo y robustecen la hipótesis de que es un carácter de herencia cuantitativa (Osuna-Ortega *et al.*, 2003).

Comparación entre los dos grupos de líneas isogénicas (A y B)

Los resultados del AdV combinado (datos no mostrados) de los caracteres comunes entre ambos grupos, en los dos años de evaluación (2005 y 2006), indicaron que la mayor parte de la variabilidad se debió más a las diferencias genéticas entre los dos grupos de líneas y a diferencias ambientales, que a la interacción entre ambas fuentes de variación. La frecuencia de efectos significativos ya sea entre grupos de genotipos, ambientes o su interacción, de las variables morfológicas (LR, NP, RP, FR y FP: 3 de 15 casos), fue menor que para las variables reproductoras (PSP, P100S, SP y S/P: 10 de 12 casos), lo que corrobora que las líneas A y B no presentan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para la mayor parte de las características morfológicas de la panoja, pero sí para sus características reproductoras; y que las primeras interaccionan menos con el ambiente que las segundas.

Al comparar las variables que difirieron ($p \leq 0.05$) entre los dos grupos de líneas promedio de dos años (Cuadro I.3), se ratifican las tendencias observadas en el año 2006 (Cuadro I.1) pues las líneas androestériles fueron 2 d más tardías y sus panojas tuvieron 5 ramas más, 229 más flores, pero con menos de la mitad de la proporción semillas/flores por panoja, 478 menos semillas y su peso de 100 semillas fue 457 mg superior al de sus contrapartes androfértiles lo que repercutió en que el rendimiento de semilla por panoja de las líneas B fuera 60% mayor que el de las líneas A. Las líneas A y B son isocitoplásmicas y en teoría solamente deberían diferir en que las primeras no producen polen o éste es estéril.

Cuadro I.3. Comparación de medias entre grupos de líneas isogénicas (A/B), para las variables que fueron estadísticamente significativas. Promedios de 2005 y 2006.

Grupo	DA (d)	RP	FP	RSP (g)	P100S (g)	SP (g)	S/F (%)
A	94 a (100)	52.9 a (100)	1783 a (100)	8.87 b (100)	2.021 a (100)	435 b (100)	24.4 b (100)
B	92 b (98)	47.7 b (91)	1554 b (87)	14.17 a (160)	1.564 b (77)	913 a (210)	58.8 a (240)
MDS	0.86	2.6	184	1.08	0.080	51	4

DA = días a antesis; RP = ramas por panoja; FP = flores por panoja; RSP = rendimiento de semilla por panoja; P100S = peso de 100 semillas; SP = semillas por panoja; S/F = proporción semillas/flores por panoja. Valores dentro del paréntesis expresan porcentajes con respecto al comportamiento de la línea A. Valores con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

No obstante, es posible que las variaciones citoplásmicas, ambientales y su interacción con otros factores nucleares sean responsables de las diferencias entre las líneas A y B (Moran *et al.*, 2002), y que algunas variables sean más afectadas que otras. Los principales contrastes ocurrieron en las variables relacionadas con la producción de semilla consecuencia de la polinización manual. Sin embargo, aún en condiciones óptimas de

temperatura se desconoce la cantidad de polen viable necesario para una exitosa fertilización de la mayoría de las flores en sorgo (Wang *et al.*, 2000).

Con respecto al año 2006, en 2005 los dos grupos de líneas A y B presentaron un retraso promedio de 1 d en la antesis y un aumento de 2 d en el periodo de floración, un incremento de un nudo en la panoja, así como disminuciones 4.36 g/panoja, 262 semillas y 17.5% en la proporción semillas/flores por panoja (Cuadro I.4).

Cuadro I.4. Comparación de medias entre dos años (2005 y 2006) para las variables que fueron estadísticamente significativas. Promedios de líneas A y B.

Año	DA (d)	PF (d)	NP	RSP (g)	SP	S/F (%)
2005	93.5 a	16.0 a	13.05 a	9.34 b	543 b	35.1 b
2006	92.4 b	14.0 b	12.06 b	13.7 a	805 a	52.6 a
MDS	0.86	0.6	0.81	1.08	51	4

DA = días a antesis; PF = periodo de floración; NP = nudos por panoja; RSP = rendimiento de semilla por panoja (g); SP = semillas por panoja; S/F = proporción semillas/flores por panoja. Valores con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Estas diferencias pueden deberse a que en 2005 se sembró un mes después que en 2006; además, en 2005 en la temperatura mínima promedio en los 30 d previos a la antesis fue superior en 2 °C, y las temperaturas mínimas y medias durante el periodo de floración fueron 2.5 y 1.6 °C inferiores que las del 2006 (Cuadro I.5).

Características del pistilo, del polen y del rendimiento de semilla y sus componentes

Los resultados del AdV combinado (datos no presentados) de los años 2005 y 2006 indicaron que la variabilidad de los caracteres del pistilo puede atribuirse casi en su totalidad al genotipo, mientras que en la variación de los caracteres del polen se debió al genotipo (G), al ambiente (A) y a la interacción (G x A). En el rendimiento de semilla y sus principales componentes, las tres fuentes de variación (G, A y G x A) influyeron

Cuadro I.5. Promedios de temperatura ambiente y humedad relativa de los años 2005 y 2006.

Año	Tmín	Tmáx	Tmed	HRmín	HRmáx	HRmed
DAA						
2005	8.58 a	30.63 a	19.31 a	47.68 a	99.35 a	72.3 a
2006	6.64 b	30.00 a	18.64 a	46.82 a	98.40 a	73.0 a
MDS	1.31	1.19	0.79	5.69	0.61	2.9
DPF						
2005	4.83 b	28.91 a	16.88 b	41.41 b	99.33 a	70.35 b
2006	7.35 a	29.70 a	18.53 a	51.5 a	100.00 b	75.75 a
MDS	0.94	1.38	1.50	9.72	0.51	4.92

DAA = datos registrados desde 30 d antes de la antesis; DPF = datos durante el período de floración; Tmín, Tmáx y Tmed = temperatura mínima, máxima y media; HRmín, HRmáx y HRmed = humedad relativa mínima; máxima y media. Valores con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

significativamente en ambos tipos de líneas.

Al comparar las seis líneas androestériles, con base en el promedio del grupo y de los dos años de estudio, se observó (Cuadro I.6) que la línea A2 superó a las demás en LPs, LEg y LET; pero esas características no repercutieron en un mayor rendimiento de semilla o de sus componentes. Por su parte, la línea A9 tuvo 38 % más flores y 36% más rendimiento que el promedio del grupo aunque las dimensiones de su pistilo fueron menores.

En sorgo no se tienen reportes de la relación entre estas dimensiones del pistilo y el rendimiento de semilla, aunque en líneas R se han encontrado que los estigmas cortos (1 a 3 mm) estuvieron asociados con una menor incidencia y severidad del ergot (Dahlberg *et al.*, 2001).

De las 45 correlaciones simples posibles entre las variables del Cuadro I.6, sólo 11 fueron significativas ($p \leq 0.05$); sobresalen las que ocurrieron entre la longitud de ovario con la cantidad de flores, rendimiento de semilla por panoja y semillas por panoja ($r = 0.84$, 0.91 y 0.94) y las del número de flores por panoja con rendimiento de semilla por panoja,

Cuadro I.6. Características del pistilo y producción de semilla de las líneas A. Promedio de dos años (2005 y 2006).

G	LPs (mm)	LEg (mm)	LEt (mm)	LOv (mm)	LR (cm)	FP	RSP (g)	P100S (g)	SP	S/F (%)
A1	4.49 c (93)	2.15 c (92)	0.89 c (79)	1.44 ab (105)	26.3 a (118)	2205 b (122)	8.6 bc (97)	1.785 c (88)	472 a (106)	21.4 c (85)
A2	5.87 a (121)	2.97 a (127)	1.52 a (136)	1.38 bc (101)	20.2 d (91)	2062 b (115)	9.0 b (102)	1.910 bc (95)	469 a (108)	22.7 bc (90)
A3	4.55 c (94)	2.19 c (94)	1.12 b (100)	1.23 d (90)	22.5 b (101)	1373 c (76)	7.3 b (82)	1.970 b (98)	372 b (86)	27.0 b (107)
A5	5.05 b (104)	2.32 a (99)	1.47 a (131)	1.25 cd (92)	20.6 cd (93)	1364 c (76)	7.2 c (82)	1.996 b (99)	360 b (83)	26.3 b (104)
A6	4.63 c (95)	2.19 c (94)	0.88 c (79)	1.38bc (101)	21.9 bc (98)	1298 c (72)	9.2 b (103)	2.040 a (101)	448 a (103)	34.5 a (136)
A9	4.51 c (93)	2.11 c (90)	0.86 c (77)	1.53 a (112)	22.2 b (100)	2489 a (138)	12.0 a (136)	2.428 a (120)	491 a (113)	19.7 c (77.9)
Prom.	4.85 (100)	2.32 (100)	1.12 (100)	1.37 (100)	22.3 (100)	1798 (100)	8.87 (100)	2.020 (100)	435 (100)	25.3 (100)
DSH	0.27	0.11	0.17	0.13	1.4	157	1.4	0.140	73	4

G = genotipo; LPs = longitud del pistilo; LEg = del estigma; LEt = del estilo; LOv = del ovario; LR = longitud del raquis; FP = flores por panoja; RSP = rendimiento de semilla por panoja; P100S = peso de 100 semillas; SP = semillas por panoja; S/F = proporción semillas/flores por panoja. Valores dentro del paréntesis son porcentajes respecto a la media del grupo. Valores con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

semillas por panoja y proporción semillas/flores por panoja ($r=0.73$, 0.80 y -0.87).

El número de flores fértiles por panoja puede variar entre 1600 y 4000, según el origen genético de material (Doggett, 1988). De acuerdo con Pendleton *et al.* (1994), la longitud de la panoja (longitud del raquis en este caso) está asociada con el número de flores y con el número de semillas por panoja, lo cual no ocurrió en las líneas A del presente estudio, posiblemente debido a la baja proporción semillas/flores en la inflorescencia de estas líneas.

Una medida del grado de adaptación de las líneas B a las bajas temperaturas es su capacidad para producir polen viable y asegurar la fertilidad (Osuna-Ortega *et al.*, 2000).

En promedio de los dos años, las líneas B produjeron 75% de polen viable y un rendimiento de 14.2 g/panoja (Cuadro I.7), equivalentes a un incremento de 40% en PV y de 14% en RSP, con respecto a las primeras líneas tolerantes al frío generadas por el CP (Osuna-Ortega *et al.*, 2003). Esto ratifica que durante el proceso genotécnico se han generado líneas B superiores, pero cuyo polen aún no es 100% viable. En el grupo de líneas B, la B1 produjo la mayor cantidad de polen (527 mg), con una buena proporción de polen viable (73.4%), pero presentó la menor proporción semillas/flores por panoja (46.9%) aunque tuvo 27% más flores por panoja que la media del grupo.

Cuadro I.7. Características del polen y producción de semilla entre líneas B. Promedio de dos años (2005 y 2006).

G	PP (mg)	PV (%)	PE (%)	DGp (μ m)	LR (cm)	FP	RSP (g)	P100S (g)	SP	S/F (%)
B1	527 a (139)	73.4 cd (98)	16.3 ab (109)	46.53 a (105)	23.2 b (118)	1980 b (127)	15.75 b (111)	1.636 b (105)	929 a (102)	46.9 c (77)
B2	406 bc (107)	78.6 b (105)	12.1 c (81)	41.96 bc (95)	20.6 cd (95)	1368 cd (87)	12.97 c (92)	1.614 bc (104)	839 c (92)	61.3 ab (100)
B3	165 d (44)	74.7 c (99)	15.2 b (102)	40.70 c (92)	20.0 cd (92)	1015 e (65)	10.46 e (74)	1.568 c (101)	708 d (78)	69.8 a (114)
B5	313 c (83)	69.6 d (93)	19.5 a (131)	44.46 ab (101)	19.7 c (91)	1186 de (76)	11.62 d (82)	1.391 d (89)	841 c (92)	70.9 a (116)
B6	361 c (95)	82.1 a (110)	9.3 d (63)	45.45 a (103)	21.5 c (106)	1414 c (90)	13.58 c (96)	1.395 d (89)	976 b (107)	69.0 a (113)
B9	495 a (131)	72.5 cd (96)	17.1 ab (115)	46.55 a (105)	25.6 a (108)	2441 a (156)	20.68 a (146)	1.781 a (115)	1183 a (130)	48.5 bc (79)
Prom.	379 (100)	75.2 (100)	14.9 (100)	44.27 (100)	21.7 (100)	1567 (100)	14.18 (100)	1.56 (100)	913 (100)	61.7 (100)
DSH	94	2.44	2.4	2.79	0.6	212	1.11	0.065	79	6.9

G = genotipo; PP = producción de polen (mg); PV = polen viable; PE = polen estéril; DGp = diámetro del grano de polen; LR = longitud del raquis; FP = flores por panoja; RSP = rendimiento de semilla por panoja; P100S = peso de 100 semillas; SP = semillas por panoja; S/F = proporción semillas/flores por panoja. Valores dentro del paréntesis son porcentajes respecto a la media del grupo. Valores con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

La línea B6 mostró la mayor frecuencia de polen viable (82.1%) pero valores menores en RSP (4%) y P100S (11%) respecto al promedio del grupo, aunque compensó estas desventajas con 7% más semillas por panoja. En comparación con las demás líneas, la B9 se mantuvo en el grupo superior para casi todas las variables, excepto para la proporción semillas/flores, y superó al promedio del grupo entre 5% (DGp) y 46% (RSP).

Es de destacar que a pesar de que las líneas B se autopolinizan, en todos los casos el número de semillas cosechadas fue inferior al número de flores de la panoja pues la proporción semillas/flores varió entre 46.9 y 70.9%. La menor proporción de semillas respecto al número de flores, en condiciones de polinización libre, es común en especies hermafroditas y esto se considera una estrategia reproductiva que asegura la polinización (Sutherland, 1987).

Por otra parte, de las 45 correlaciones simples entre las variables de las líneas B, 23 estuvieron asociadas significativamente ($p \leq 0.05$). Entre éstas, la longitud del raquis destacó pues correlacionó de manera positiva con la producción ($r = 0.77$) y tamaño de polen ($r = 0.73$), el número de flores ($r = 0.98$), el rendimiento, tamaño y número de semillas ($r = 0.98, 0.75$ y 0.90). Los resultados sugieren que este carácter, además de ser un descriptor morfológico (CIAT, 1983), está claramente asociado con la productividad del sorgo. Hay evidencias de que el raquis almacena reservas (Maití, 1993) y que es una fuente de fotoasimilados durante el llenado de grano (Valadez-Gutiérrez *et al.*, 2006). La viabilidad del polen no mostró asociación con variable alguna, excepto con el porcentaje de polen estéril ($r = -0.99$); sin embargo, la producción de polen y su diámetro estuvieron asociados con el número de flores, el rendimiento y el número de semillas por panoja ($r = 0.78$, en promedio). Como era de esperarse, la proporción semillas/flores por panoja estuvo inversamente relacionada con la producción de polen, número de flores, el rendimiento y

peso de 100 semillas ($r = -0.86, -0.91, -0.84, -0.82$) y el número de semillas por panoja con flores por panoja, producción y diámetro de polen ($r = 0.89, 0.75$ y 0.82). Estos resultados indican que en las líneas B el rendimiento de semilla y sus componentes están más asociados con la producción y diámetro del polen que con la viabilidad de éste; y sugieren que si bien las flores representan el número potencial de semillas, a pesar de ser una especie autógena, hay flores que no desarrollan semilla y sólo donan polen. Esto plantea la necesidad de estudiar las fallas en la polinización, fecundación y desarrollo de semilla (fenómenos de incompatibilidad) entre otros, en cruces A x B, A x R y en líneas B y R autofecundadas.

En cuanto a las diferencias entre años (Cuadro I.8), en 2005 las líneas A presentaron 137 más de flores por panoja y su raquis fue 1 cm más corto, pero menor longitud de estigma y una reducción promedio de 30% en los componentes del rendimiento, y 10% en la proporción semillas/flores por panoja que en 2006. En las líneas B no hubo diferencias significativas entre años para la longitud del raquis y número de flores por panoja, pero las hubo en las líneas A; sin embargo, en 2005 disminuyó la producción total de polen, el rendimiento de semilla, el número de semillas y la proporción semillas/flores por panoja, pero aumentó el porcentaje de polen viable y el peso de 100 semillas, respecto a 2006.

Estos resultados evidencian que estas líneas A, B y R poseen un buen grado de adaptación al frío (temperaturas mínimas entre 3.5 y 8.4 °C) y que parece difícil superar la proporción de polen viable (promedio de 75%) de las líneas B y R. Se ha reportado en sorgo que las temperaturas entre 8 y 12 °C, durante la etapa de microsporogénesis causan una disminución entre 60 y 70% en la viabilidad del polen y entre 40 a 50% en el número de semillas por panoja (Wood *et al.*, 2006).

Cuadro I.8. Efecto del ambiente (años) en las características del pistilo, polen y rendimiento de seis líneas A y B.

Año	LEg (mm)	FP	LR (cm)	RSP (g)	P100S (g)	SP	S/F (%)
Líneas A							
2005	2.30 b	1867 a	22.8 a	7.16 b	1.916 b	374 b	20.8 b
2006	2.35 a	1730 b	21.8 b	10.57 a	2.126 a	497 a	30.2 a
DMS	0.04	62	0.6	1.39	0.054	28	2
Líneas B							
	PP (mg)	PV (%)	PE (%)	RSP (g)	P100S (g)	SP	S/F (%)
2005	269 b	78.1 a	12.4 b	11.53 b	1.639 a	713 b	49.3 b
2006	459 a	72.3 b	17.2 a	16.82 a	1.489 b	1113 a	75.0 a
DMS	37	0.9	0.9	0.43	0.025	31	5

LEg = longitud de estigma; FP = flores por panoja; RSP = rendimiento de semilla por panoja; P100S= peso de 100 semillas; SP = número de semillas por panoja; S/F = proporción semillas/flores por panoja; PP = producción de polen; PV = polen viable; PE = polen estéril. Valores con letra distinta indican diferencias significativas entre los promedios de seis líneas (Tukey, $p \leq 0.05$).

La interacción genotipos x años de las líneas A, aunque significativa ($p \leq 0.05$) en cuatro de las 10 variables (rendimiento de semilla por panoja, peso de 100 semillas, semillas por panoja y proporción semillas/flores por panoja), representó un escaso porcentaje de la variación de las fuentes principales.

Semejante situación ocurrió en las líneas B, pues la interacción G x A fue significativa ($p \leq 0.05$) en las mismas cuatro variables de las líneas A, agregándose la producción de polen, el porcentaje de polen viable, y su contraparte (porcentaje de polen estéril). En este caso, la línea B6 produjo bajos porcentajes de polen estéril en ambos años (9.0 y 9.5%) mientras que la línea B5 fue la de mayor PE (16.3 y 22.5%).

En un programa genotécnico es deseable incrementar la variabilidad genética de las líneas B, así como diversificar la fuente citoplásmica de androesterilidad de las líneas A

(Menz *et al.*, 2004), porque las fuentes de tolerancia al frío y de androesterilidad citoplásmica aquí utilizadas han sido muy restringidas, debido al escaso número de genotipos tolerantes al frío con respuesta B detectadas al inicio del programa (Mendoza, 1991). La fuente de androesterilidad citoplásmica proviene del sistema Kafir-Milo (CMS A1) que se aplica de manera comercial en el mundo. A pesar de eso, existe amplia variabilidad de casi todos los caracteres entre las líneas B, lo que permite continuar seleccionando hacia los tipos sobresaliente para los caracteres de interés.

1.5. Conclusiones

La fertilidad de las líneas se asoció con la morfología floral y la disponibilidad, viabilidad y tamaño del grano de polen, aunque su interacción con el ambiente fue de menor magnitud que la de los factores principales. El grupo de líneas R presentó anteras de tamaño similar al grupo de líneas B, pero produjeron más granos de polen, de menor tamaño, con mayor viabilidad, su periodo de floración fue más largo con mayor rendimiento de semilla por panoja. Los grupos de líneas A y B no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para la mayoría de las características morfológicas de la panoja (*i. e.*, ramas y flores por panoja) pero sí para sus características reproductoras (número y tamaño de semilla). Las variables morfológicas de la panoja interaccionaron menos con el ambiente que las reproductivas. La cantidad, tamaño y viabilidad del polen (75%) en las líneas B y R no restringió su producción de semilla. La incidencia de temperaturas mínimas durante la floración entre 3.5 y 8.4 °C, puede influir en la receptividad de los estigmas y ser una causa de la disminución de la relación semillas/flores por panoja incluso en las líneas androfértiles, aunque no se descarta que pudiera haber problemas de compatibilidad entre el polen y el pistilo.

I.6. LITERATURA CITADA

- Bandyopadhyay, R., D. E. Frederickson, N. W. McLaren, C. N. Odvody, and M. J. Ryley. 1998. Ergot: A new disease threat to sorghum in the Americas and Australia. *Plant Dis.* 82: 356-367.
- Bantilan, M. C. S., U. K. Deb, C. L. L. Gowda, B. V. S. Reddy, A. B. Obilana, and R. E. Evenson. 2004. Sorghum Genetic Enhancement: Research Process, Dissemination and Impacts. ICRISAT. Patancheru, A. P., India. pp: 77-92.
- Brown, P. J., P. E. Klein, E. Bortiri, C. B. Acharya, W. L. Rooney, and S. Kresovich. 2006. Inheritance of inflorescence architecture in sorghum. *Theor. App. Gen.* 113: 931-942.
- CIAT. 1983. Metodología para Obtener Semillas de Calidad. Arroz, Frijol, Maíz y Sorgo. Unidad de Semillas del Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pp: 12-16.
- Cisneros-López, M. E., L. E. Mendoza-Onofre, G. Mora-Aguilera, L. Córdova-Téllez y M. Livera-Muñoz. 2007. Híbridos y progenitores de sorgo tolerantes al frío. II. Efecto de *Fusarium verticilloides* (Sacc.) Nirenberg en el rendimiento de semilla y sus componentes en condiciones de campo. *Agrociencia* 34: 283-294.
- Compton, P. 1990. Agronomía del Sorgo. Programa de Mejoramiento de Sorgo del ICRISAT para América Latina (LASIP). ICRISAT. Patancheru, India. 250 p.
- Dahlberg, J. A., R. Bandyopadhyay, W. L. Rooney, G. N. Odvody, and P. Madera-Torres. 2001. Evaluation of sorghum germplasm used in US breeding programmes for sources of sugary disease resistance. *Plant Pathol.* 50: 681-689.
- Doggett, H. 1988. Sorghum. 2nd ed. Tropical Agriculture Series. Longman. Essex CM20, England. pp: 70-117.
- Hammer, G. L., R. L. Vanderlip, G. Gibson, L. J. Wade, R. G. Henzell, D. R. Younger, J. Warren, and A. B. Dale. 1989. Genotype-by-environment interaction in grain sorghum. I. Effects of temperature and photoperiod on ontogeny. *Crop Sci.* 29: 376-384.
- Hernández-Martínez, M., L. E. Mendoza-Onofre, P. Ramírez-Vallejo, S. Osada-Kawasoe, E. Cárdenas-Soriano, and F. Zavala-García. 2002. Response of sorghum B y R lines to ergot (*Claviceps africana*) at Celaya, Guanajuato, Mexico. *In: Sorghum and Millets Diseases*. Leslie, J. F. (ed). Iowa State Press. Ames, IO, USA: pp: 83-85.

- House, L. R. 1982. El Sorgo. Guía para su Mejoramiento Genético. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 427 p.
- Kelly, K. J., A. Rasch, and S. Kalisz. 2002. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. *Am. J. Bot.* 89: 1021-1023.
- Kumar, A., R. K. Chowdhury, and O. S. Dahiya. 1995. Pollen viability and stigma receptivity in relation to meteorological parameters in pearl millet. *Seed Sci. Technol.* 23: 147-156.
- Maití, R. 1993. Morphophysiological Traits in Crop Improvement: Case Study - Sorghum. Pedro A. Wesche-Ebeling. Publicaciones Biológicas. UANL. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. 289 p.
- McLaren, N. W., and B. C. Flett. 1998. Use of weather variables to quality sorghum ergot potential in South Africa. *Plant Dis.* 82: 26-29.
- Mendoza C., M. del C., M. Mendoza R. y A. Carballo C. 1981. Producción de semilla de híbridos ecológicos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Chapingo, Nueva Época 31: 25-31.
- Mendoza O., L. E. 1991. Sorgo. *In*: 10 Años de Investigación Agrícola en la Región Central de México. CAEVAMEX. SARH. Chapingo, México. pp: 105-118.
- Menz, M. A., R. R. Klein, N. C. Unruh, W. L. Rooney, P. E. Klein, and J. E. Mullet. 2004. Genetic diversity of public inbreds of sorghum determined by mapped AFLP and SSR markers. *Crop Sci.* 44: 1236-1244.
- Moran, J. L., W. L. Rooney, R. A. Frederiksen, and G. N. Odvody. 2002. Differences in ergot vulnerability among sorghum genotypes and relationship between stigma receptivity and ergot vulnerability. *In*: Sorghum and Millets Diseases. Leslie, J. F. (ed). Iowa State Press. Ames, IO, USA: pp: 113-119.
- Osuna-Ortega, J., M. del C. Mendoza-Castillo, and L. E. Mendoza-Onofre. 2003. Sorghum cold tolerance, pollen production and seed yield in Central High Valleys of Mexico. *Maydica* 48: 125-132.
- Osuna-Ortega, J., L. E. Mendoza-Onofre, V. A. González-Hernández, F. Castillo-González, Ma. del C. Mendoza-Castillo y H. Williams-Alanís. 2000. Potencial del germoplasma tolerante al frío en la adaptación y adaptabilidad del sorgo en México: I. Valles Altos. *Agrociencia* 34: 561-572.

- Pendleton, B. B., G. L. Teetes, and G. C. Peterson. 1994. Phenology of sorghum flowering. *Crop Sci.* 34: 1263-1266.
- Peña, R. A., J. D. Eastin, S. D. Kachman y F. Zavala G. 2001. Herencia de la duración del periodo y tasa de llenado de grano en sorgo. *Rev. Fitotec. Mex.* 24 (2):171-178.
- SAS Institute. 2002. SAS/SAT. Versión 9.1. SAS Inst. Cary. NC. USA. Versión en línea <http://www.colpos.mx/servicios/sas/indexs.htm>.
- Sutherland, S. 1987. Why hermaphroditic plants produce many more flowers than fruits. Experimental test with *Agave mckelveyana*. *Evolution* 41: 750-759.
- Takeda, K., K. Saito, K. Yamazaki, and T. Mikami, 1987. Environmental response of yielding capacity in isogenic lines for grain size of rice. *Jpn. J. Breed.* 37: 309-317.
- Valadez-Gutiérrez, J., L. E. Mendoza-Onofre, H. Vaquera-Huerta, L. Córdova-Téllez, Ma. del C. Mendoza-Castillo y G. García de los Santos. 2006. Raleo de flores, rendimiento de semilla y distribución de materia seca post-antesis en sorgo. *Agrociencia* 40: 303-314.
- Vidal-Martínez, V. A., M. D. Clegg, and B. E. Johnson. 2001. Genetics studies on maize pollen and grain yield and their yield components. *Maydica* 46: 35-40.
- Wang, E., H. Meinke, M. Ryley, D. Herde, and R. Henzell. 2000. On the relation between weather variables and sorghum ergot infection. *Aust. J. Agric. Res.* 51: 313-324.
- Wood, A. W., D. K. Y. Tan, E. A. Mamun, and B. G. Sutton. 2006. Sorghum can compensate for chilling-induced grain loss. *J. Agron. Crop Sci.* 192: 445-451.

CAPÍTULO II. INTERACCIÓN POLEN-PISTILO EN CRUZAS A x B DE SORGO (*Sorghum bicolor* L. Moench) Y PRODUCCIÓN DE SEMILLA[†]

II.1. RESUMEN

La cantidad de semilla que se produce mediante cruzas manuales al incrementar líneas androestériles de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) o para obtener semilla F1, por lo general es menor que la que se obtiene en polinización libre. Para analizar la interacción polen-pistilo, en Montecillo, Edo. de México (2240 m de altitud), se hicieron cruza planta a planta en seis pares de líneas isogénicas, en los años 2005 y 2006. En las líneas A se midió la longitud del pistilo, estigma, estilo y ovario, así como el ancho del ovario; en las líneas B el diámetro, producción y viabilidad (densidad citoplásmica) del polen. En pistilos de las líneas A, 18 h después de la polinización (hdp), se cuantificó la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico *in vivo* con azul de anilina y epifluorescencia; a las 96 hdp se cuantificaron los pistilos fecundados y a la cosecha se determinó el rendimiento, tamaño y número de semilla por panoja. La variabilidad fenotípica de la morfología del pistilo y del diámetro del polen solamente se atribuyó al genotipo; pero en la producción y viabilidad del polen también influyeron las variaciones ambientales inherentes a los años y la interacción genotipo por ambiente. La viabilidad del polen fue la variable más relacionada con la germinación del polen y elongación el tubo polínico. La receptividad del estigma no estuvo asociada con su morfología. La compatibilidad polen-pistilo fue buena en las etapas pre- y post fertilización aún en presencia de temperaturas mínimas promedio entre 6 y 8 °C durante la polinización, a juzgar por el rendimiento de semilla entre 7 y 12 g/panoja. Las diferencias en la producción de semilla entre las cruza A x B no dependen

[†]Una versión al inglés de este capítulo, se encuentra en arbitraje en Field Crops Res.

de la cantidad y viabilidad del polen. Es necesario investigar el aborto de ovarios fecundados.

Palabras clave: *Sorghum bicolor* L. Moench, crecimiento del tubo polínico, germinación del polen *in vivo*, interacción polen-pistilo, receptividad del estigma, viabilidad del polen.

II.2. INTRODUCCIÓN

Los mecanismos reproductivos del sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) incluyen la autofecundación, polinización cruzada, sistemas de androesterilidad genética y citoplásmica, e incluso apomixis (Rao *et al.*, 2002). Cuando temperaturas inferiores a 12 °C inciden durante la microsporogénesis, los genotipos susceptibles al frío producen polen estéril (Brooking, 1976; Wood *et al.*, 2006), lo que se ha denominado androesterilidad ecológica (Ortiz y Carballo, 1972). En México se han desarrollado variedades e híbridos de sorgo tolerantes al frío (TF) adaptados a los Valles Altos Centrales (2200 m de altitud), donde prevalecen temperaturas mínimas promedio entre 6 y 8 °C (Livera y Carballo, 1977; Mendoza-Onofre, 1991; Osuna-Ortega *et al.*, 2003).

En líneas TF se ha observado que la viabilidad (densidad citoplásmica) del polen varía entre 50 y 80%, y que en las cruzas manuales A x B el promedio de la producción de semilla es 46% del de las líneas B (Cisneros-López *et al.*, 2007); además, en las líneas B y R autofecundadas la proporción de semillas respecto a flores varía entre 75 y 87% (Capítulo I de esta tesis). La menor producción de semilla en polinización manual, respecto a la que se produce en polinización cruzada, puede estar asociada con una pobre viabilidad y germinación del polen (Young y Young, 1992), y un número reducido o poco desarrollo de tubos polínicos (Marshall y Diggle, 2001). La edad del pistilo (Bassetti y Westgate, 1993b), pocos óvulos disponibles, ovarios vacíos, aborto de semillas por efecto de depresión endogámica (Wilcock y Neiland, 2002), senescencia del estigma (Sun *et al.*,

1991; Bassetti y Westgate, 1993a) o una corta duración de la receptividad del estigma (Dafni *et al.*, 2005), también pueden estar involucrados, según la especie.

La interacción polen-pistilo comprende la adhesión, hidratación, activación y germinación del polen, con el consecuente desarrollo del tubo polínico hasta la fertilización del óvulo (Edlund *et al.*, 2004). Una interacción positiva con polen compatible resulta en la fertilización del óvulo; si el polen es incompatible, no ocurren algunos procesos de los procesos mencionados o el tubo polínico es rechazado por el pistilo (Cheung, 1995). La interacción puede ser de tipo morfológico, celular o molecular (Wheeler *et al.*, 2001; Boavida *et al.*, 2005). La consecuencia agronómica más evidente de una deficiente polinización o fertilización es la reducción del rendimiento de grano; en el caso del sorgo también aumenta su vulnerabilidad al ergot (*Claviceps africana* Frederickson, Mantle & de Milliano) (Wang *et al.*, 2000).

Los objetivos de esta investigación fueron: (1) medir la variabilidad morfológica del pistilo en líneas A y la morfo-fisiológica del polen en líneas B, y su relación con eventos pre- y post fertilización; (2) cuantificar la germinación *in vivo* del grano de polen como indicador de la receptividad del estigma en cruza A x B; y (3) evaluar la interacción polen-pistilo durante la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico de las cruza, en condiciones de campo.

II.3. MATERIALES Y MÉTODOS

En Montecillo, Edo. de México (2240 m de altitud), se estableció un experimento de campo, bajo riego, en los ciclos de cultivo 2005 (siembra, 11 de junio; cosecha, noviembre) y 2006 (siembra, 9 de mayo; cosecha, octubre). Se evaluaron seis pares de líneas isogénicas (A1/B1, A2/B2, A3/B3, A5/B5, A6/B6 y A9/B9). La parcela experimental fue de cinco surcos de 5 m de longitud con 0.92 m de ancho y 0.15 m entre plantas; la parcela útil se

ubicó en los tres surcos centrales. La temperatura y humedad relativa a la intemperie se registraron en una estación meteorológica ubicada a 150 m de la parcela.

En 30 plantas con competencia completa, se colocaron bolsas de papel en las panojas recién emergidas de cada línea. Cuando las panojas de la línea A terminaron de florear se colectó polen de sus líneas B, entre las 11:00 y 12:00 h; se hicieron 10 cruces planta a planta en una sola ocasión en cada línea. Se midieron las siguientes variables:

Características morfológicas y anatómicas del pistilo. En cinco plantas no polinizadas de las líneas A se cortaron sus panojas al final de la floración. De cada panoja se extrajeron 10 pistilos de una ramilla central y se midió la longitud de: pistilo (LPs), estigma (LEg) y ovario (LOv); por diferencia se estimó la longitud del estilo [$LEt = LPs - (LEg + LOv)$]; también se midió el ancho máximo del ovario (AOv). Las mediciones se hicieron con un vernier digital Mitutoyo Caliper® 500-776 y un microscopio estereoscópico (Stereo Star Zoom Reichert® Mod 569). En pistilos de la línea A9, a las 72 h después de la polinización (hdp) se hicieron cortes histológicos para observar los tejidos internos del pistilo durante el crecimiento del tubo polínico y como testigo se usaron pistilos sin polinizar. Pistilos completos se fijaron en Farmer (75% alcohol etílico, 25% ácido acético) (Hodnett *et al.*, 2005), luego se deshidrataron en una serie de alcohol isopropílico a xileno y se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes longitudinales y transversales de 10 μ m con un micrótopo rotatorio (American Optical Company® Mod. 820 Spencer). Los cortes de pistilos se tiñeron con una solución acuosa de Safranina O al 0.05% en 2% de NaCl y Fast green FCF al 3% en alcohol etílico (70%) (Zavaleta y Engleman, 1994). Para observar los tubos polínicos los cortes se tiñeron con azul de anilina al 1% en buffer de fosfatos pH 7.4, se incubaron en el colorante por 20 h en oscuridad a 7 °C; y montados en azul de anilina (Westgate y Boyer, 1986). Finalmente, las preparaciones

se observaron con un microscopio de luz (Zeiss AXioskop 2 plus®) y epifluorescencia con un filtro UV (365 nm de excitación; 397 nm de emisión). Las fotografías se tomaron con una cámara AxionCam MRC5 y el procesador de imágenes AxionVision 4.4®.

Producción, tamaño y viabilidad del polen. El polen se colectó diariamente de panojas individuales de cinco plantas de cada línea B durante todo el periodo de floración (Vidal-Martínez *et al.*, 2001); el polen se pesó después de mantenerlo a 75 °C hasta alcanzar peso constante. La producción de polen (PP) se calculó como la suma de todos los muestreos de cada panoja. Al inicio de la antesis, una rama de la parte media de la inflorescencia de cada una de cinco plantas androfértiles se fijó en solución FAA (Zavaleta y Engleman, 1994); de esa muestra se extrajeron y se abrieron tres anteras, y el contenido de cada antera se colocó en un porta objetos y se agregó 1 a 2 gotas de azul de anilina (0.05 g mL⁻¹) en una solución de lactofenol (Kelly *et al.*, 2002). El diámetro del grano de polen (DGp) se midió en una muestra de 100 granos, con un microscopio de luz y el procesador de imágenes antes referidos. El porcentaje de polen viable (PV) de 10 anteras por rama (cinco campos de 20 granos por antera, en promedio) consideró solamente granos de polen con forma y tamaño normal, y densidad citoplásmica mayor que 75% (Osuna-Ortega *et al.*, 2003).

Germinación del grano de polen y crecimiento *in vivo* del tubo polínico. A las 18 hdp (Cisneros-López *et al.*, 2006) se cortó una ramilla central en tres panojas de cada cruce A x B, y se le extrajeron 20 pistilos que se fijaron en una solución Farmer (3:1) y se refrigeraron a 7 °C. La germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico se midieron en 10 pistilos completos que fueron procesados con el método de “aplastado, azul de anilina y epifluorescencia” (Martin, 1959; Hodnett *et al.*, 2005; Cisneros-López *et al.*, 2006). Las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia Zeiss AXioskop2

plus® con un filtro UV (365 nm de excitación; 397 nm de emisión). Las fotografías se documentaron digitalmente con la cámara y el procesador de imágenes ya descritas. La calosa de los tubos polínicos se observó en fluorescencia azul-verdosa. Con base en la frecuencia y ubicación de los granos de polen germinados (*i. e.*, con algún grado de crecimiento del tubo polínico) se midieron las variables: (a) número de granos de polen en el estigma (GPEg), y (b) número de tubos polínicos en el estigma (TPEg), estilo (TPEt) y ovario (TPOv).

Pistilos fecundados. A las 96 hdp de cada una de cinco panojas polinizadas se cortó una ramilla central de la que se extrajeron 40 pistilos completos en los que se calculó el porcentaje de pistilos fecundados (PF), *i. e.*, con el ovario ensanchado (Taylor y Obendorf, 2001). Las demás ramillas de la panoja se dejaron intactas hasta la cosecha, para medir en ellas el rendimiento de semilla y sus componentes.

Componentes del rendimiento. Se cosecharon cinco panojas por genotipo y cuando la semilla tenía cerca de 13% de humedad, en cada una se midió el rendimiento de semilla (RSP, g), tamaño o peso de 100 semillas (P100S, g; con tres muestras por panoja) y número de semillas [$SP = (RSP/P100S) \times 100$].

Análisis estadísticos. Se hicieron dos análisis de varianza (AdV) combinados, con base en un diseño de tratamientos completamente al azar: uno, para las características del pistilo (líneas A) y del polen (líneas B); y otro, para las variables relacionadas con la germinación, el crecimiento del tubo polínico y las de tipo reproductivo (PF, RSP, P100S y SP) de las cruces A x B. La comparación de medias se efectuó con la prueba PROC MEANS-Tukey, $p \leq 0.05$. En el caso de la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico se consideró a cada pistilo como una repetición (10 repeticiones), y en las demás variables a una panoja por repetición (cinco repeticiones). Se generaron dos matrices de

correlación de Pearson (PROC CORR), con datos promedio de los dos años: una, para comparar las variables de germinación del polen (GPEg, TPEg, TPEt y TPOv) *vs.* las reproductoras; otra, para relacionar las del pistilo (LPs, LEg, LEt, LOv y AOv) y las del polen (PP, PV y DGp) *vs.* las de germinación del polen. Previo al análisis, las variables expresadas en porcentaje se transformaron por arcoseno $[Y_i]^{1/2}$. Se aplicó el programa estadístico SAS versión 9.1 (SAS, 2002).

II.4. RESULTADOS

Características de las líneas

En las líneas A, en ninguna variable del pistilo hubo interacción genotipo x ambiente; el factor genotipo explicó toda la variabilidad de los atributos del pistilo, con excepción de la longitud del estigma que también fue afectada por el ambiente conferido por las diferencias en los dos años, pero en una magnitud 25 veces menor (Cuadro II.1).

Cuadro II.1. Cuadrados medios y significancia del ANOVA combinado para características de pistilo en líneas A, y de polen en líneas B.

Líneas A					Líneas B				
V	G	A	G x A	CV	V	G	A	G x A	CV
LPs	3.12*	0.146 ns	0.02 ns	4	PP	0.17*	0.37*	0.03*	19
LEg	1.04*	0.040*	0.004 ns	4	PV	92.60*	226.78*	18.27*	3
LEt	0.91*	0.003 ns	0.02 ns	12	DGp	59.96*	5.03 ns	0.62 ns	5
LOv	0.13*	0.014 ns	0.06 ns	7					
AOv	0.15*	0.003 ns	0.005 ns	7					

V = variables; G = genotipo; A = años 2005 y 2006; LPs, LEg, LEt, LOv = longitud del pistilo, estigma, estilo, ovario; AOv = ancho del ovario; PP = producción de polen; PV = polen viable; DGp = diámetro del polen; CV = coeficiente de variación (%). * $p \leq 0.05$.

En las líneas B, el diámetro del polen sólo fue afectado por el genotipo; en cambio, el genotipo, el ambiente (años) y su interacción tuvieron efectos significativos ($p \leq 0.05$) en la producción y viabilidad del polen (Cuadro II.1).

Los caracteres del pistilo con mayor variabilidad entre líneas A fueron: longitud del estilo (0.86 a 1.52 mm), longitud del ovario (1.23 a 1.53 mm) y ancho del ovario (0.62 a 0.97 mm); en las variables relacionadas con el tamaño del pistilo, la línea A2 superó entre 1 y 36% a los promedios del grupo (Cuadro II.2). La longitud del estigma fue la única estructura del pistilo con diferencias significativas entre años (2.36 mm en 2006 *vs.* 2.30 mm en 2005).

Cuadro II. 2. Características del pistilo en líneas A y del polen en líneas B. Promedio de dos años (2005 y 2006).

	Línea androestéril (A)					Línea fértil (B)			
	LPs (mm)	LEg (mm)	LEt (mm)	LOv (mm)	AOv (mm)	PP (mg)	PV (%)	DGp (μ m)	
A1	4.49 c	2.15 c	0.89 c	1.44 ab	0.70 bc	B1	527 a	73.4 cd	46.53 a
A2	5.87 a	2.97 a	1.52 a	1.38 bc	0.97 a	B2	406 bc	78.6 b	41.96 bc
A3	4.55 c	2.19 c	1.12 b	1.23 d	0.62 d	B3	165 d	74.7 c	40.70 c
A5	5.05 b	2.32 a	1.47 a	1.25 cd	0.70 bc	B5	313 c	69.6 d	44.46 ab
A6	4.63 c	2.19 c	0.88 c	1.38 bc	0.65 cd	B6	361 c	82.1 a	45.45 a
A9	4.51 c	2.11 c	0.86 c	1.53 a	0.73 b	B9	495 a	72.5 cd	46.55 a
\bar{X}	4.85	2.32	1.12	1.37	0.73	\bar{X}	379	75.2	44.27
MDS	0.27	0.11	0.17	0.13	0.07	DSH	94	2.44	2.79

LPs, LEg, LEt, LOv = longitud del pistilo, estigma, estilo, ovario; AOv = ancho del ovario; PP = producción de polen; PV = polen viable; DGp= diámetro del polen. Valores con distinta letra en una fila son estadísticamente diferentes (Tukey, $p = 0.05$).

Entre las características del polen (Cuadro II.2) la mayor variación se registró en la producción (165 a 527 mg), pero ningún genotipo fue superior en todos los atributos en el grupo de líneas. Las dos líneas (B9 y B1) que produjeron la mayor cantidad del polen (495 y 527 mg), también presentaron polen de mayor diámetro (46.55 y 46.53 μ m); pero su viabilidad (72.5 y 73.4%) fue inferior al promedio del grupo (75.2%).

Los cortes seriados de pistilos no polinizados de la línea A9 confirmaron la estructura sólida del estilo, sin perforación alguna (Figura II.1A). En los cortes transversales se observó el tejido de transmisión caracterizado por un conjunto de células

pequeñas, con paredes engrosadas y dispuestas en forma compacta, sin espacios intercelulares (Figura II.1B). Longitudinalmente estas células son alargadas (Figura II.1C). El tejido de transmisión se observó menos compacto en la zona basal (Figura II.1D).

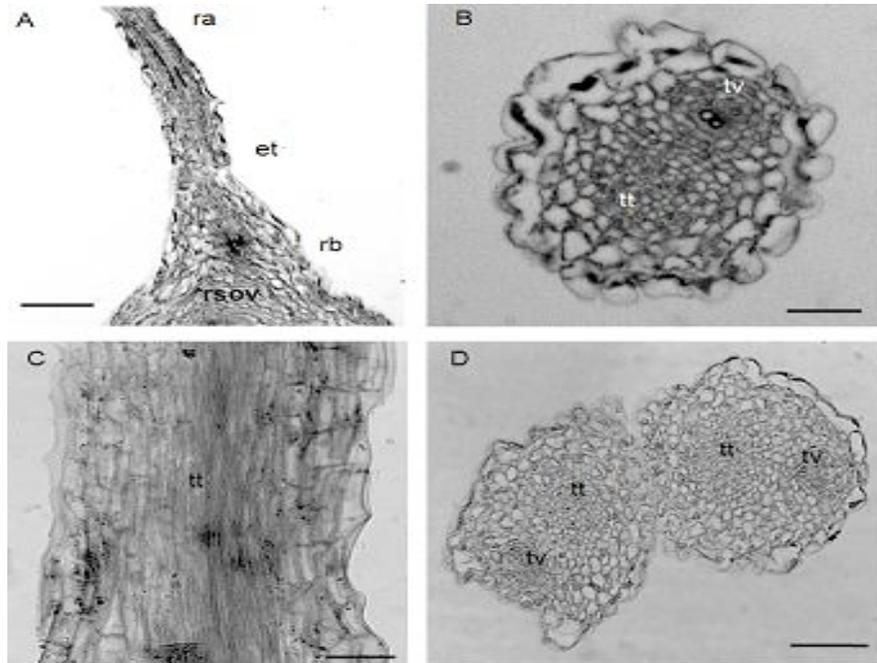


Figura II.1. Secciones del estilo (et) de sorgo de flores no polinizadas, observadas bajo microscopía de luz, teñidos con Safranina O y verde rápido FCF. (A) Sección longitudinal de un brazo (barra = 100 μm); (B) corte transversal de la región apical (barra = 100 μm); (C) sección longitudinal del tejido de transmisión (barra = 100 μm) y (D) corte transversal de la región basal de estilo, donde se unen los dos brazos (barra = 200 μm). ra = región apical; rb = basal del estilo; rsov = región superior del ovario; tt = tejido de transmisión; tv = tejido vascular.

En contraste, a las 72 hdp hubo cambios en el tejido de transmisión como consecuencia del crecimiento del tubo polínico (Figuras II.2 y II.3). En el tejido de transmisión se observaron restos de calosa (Figura II.3A), y la formación de tapones de calosa (Figura II.3B).

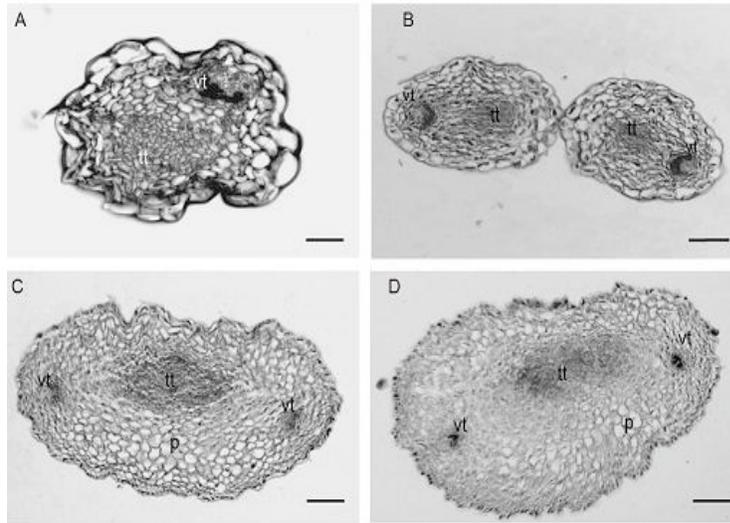


Figura II.2. Cortes seriados transversales, del ápice a la base del estilo de sorgo, teñidos con Safranina O y verde rápido FCF 72 h después de la polinización. (A) Región apical de un brazo del estilo (barra = 100 μm); (B) región basal de los dos brazos (barra = 100 μm); (C) región de transición desde el estilo al ovario (barra = 150 μm); (D) región superior del ovario (barra = 150 μm). p = parénquima; tt = tejido de transmisión; tv = tejido vascular.

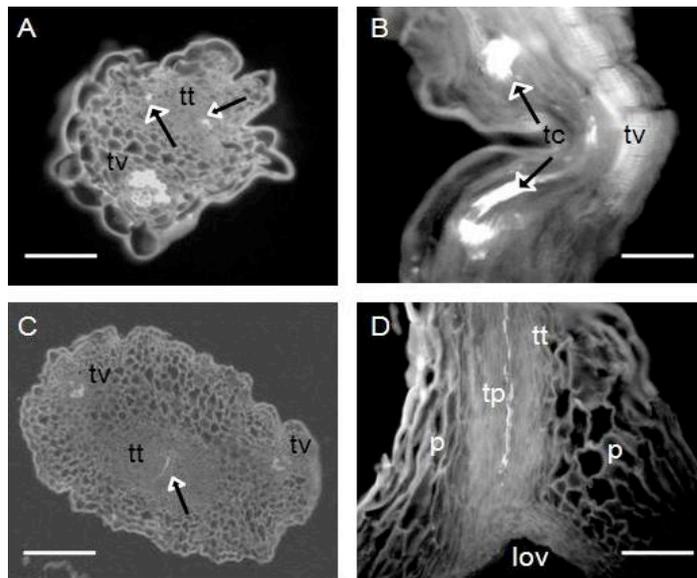


Figura II.3. Cortes en parafina teñidos con azul de anilina y epifluorescencia UV (excitación, 365 nm; emisión, 397 nm) que muestran la ruta del tubo polínico en el tejido de transmisión del estilo de sorgo 72 h después de la polinización. (A) Corte transversal de la región apical de un brazo (barra = 100 μm); (B) corte longitudinal de un brazo (barra = 150 μm); (C) corte transversal superior del ovario (barra= 150 μm); (D) corte longitudinal de la región basal del estilo (barra = 200 μm). lov = lóculo del ovario; p = parénquima; tc = tapones de calosa; tp = tubo polínico; tt = tejido de transmisión; tv = tejido vascular. Las flechas indican calosa del tubo polínico.

En 2005, las seis líneas B produjeron, en promedio, 300 mg de polen con 78% de viabilidad, pero en 2006, la producción de polen fue mayor ($p \leq 0.05$) (459 mg), aunque con menor ($p \leq 0.05$) viabilidad (72%); en estas dos variables hubo efecto significativo de la interacción G x A aunque entre 10 a 20 veces menor que el efecto de años.

Germinación del polen, crecimiento del tubo polínico y producción de semilla en las líneas A

En los Adv combinados hubo efecto del genotipo en granos de polen en el estigma (GPEg); tubos polínicos en el estigma (TPEg), estilo (TPEt) y ovario (TPOv); pistilos fecundados (PF), rendimiento de semilla por panoja (RSP); peso de 100 semillas (P100S) y semillas por panoja (SP). En las variables GPEg, TPEg, PF, RSP, P100S y SP hubo efecto de años y en GPEg, TPEg, TPEt, RSP, P100S y SP hubo efecto de la interacción (Cuadro II.3). Los coeficientes de variación de variables relacionadas con germinación del polen y crecimiento del tubo polínico (51 a 91%) fueron mayores que los de pistilos fecundados (9%) y del rendimiento y sus componentes (5 a 13%).

En las seis cruzas isogénicas, a las 18 hdp el número de tubos polínicos en el estilo y en la base del ovario fue inferior al de los granos de polen adheridos y al de los que inicialmente germinaron en el estigma (Cuadro II.4, Figura II.4). La elongación del tubo polínico a los tejidos del estilo y ovario siguió la orientación de los haces vasculares (Figura II.3B).

En promedio de las seis cruzas y dos años, en ese muestreo había 22 granos de polen aún adheridos al estigma, 10 tubos germinados en el estigma, cuatro en el estilo y apenas uno (6% respecto al número de granos adheridos al estigma) había alcanzado la base del ovario.

Cuadro II.3. Cuadrados medios y significancia del análisis combinado para las variables de germinación de polen, crecimiento de tubo polínico y producción de semilla entre cruza isogénicas.

Variable	G	A	G x A	CV
Granos de polen en el estigma (GPEg)	6263.57*	2086.67*	1916.56*	87
Tubos polínicos en el estigma (TPEg)	1454.14*	379.02*	346.09*	91
Tubos polínicos en el estilo (TPEt)	99.81*	3.19 ns	11.04*	55
Tubos polínicos en el ovario (TPOv)	4.32*	0.35 ns	0.27 ns	51
Pistilos fecundados (PF)	171.56*	154.74*	12.31 ns	9
Rendimiento de semilla por panoja (RSP)	29.60*	174.14*	3.49*	12
Peso de 100 semillas (P100S)	0.47*	0.66*	0.11*	5
Semillas por panoja (SP)	30613.28*	226935.0*	7111.84*	13

GPEg, TPEg, TPEt, y TPOv, a las 18 hdp; PF, a las 96 hdp; CV = coeficiente de variación (%). * $p \leq 0.05$.

Cuadro II.4. Germinación, crecimiento del tubo polínico y producción de semilla de cruza A x B, en promedio de dos años (2005 y 2006).

Cruza	GPEg	TPEG	TPEt	TPOv	PF (%)	RSP (g)	P100S (g)	SP
A1 x B1	13.7 b	5.4 b	2.6 b	1.3 b	24.8 b	8.59 bc	1.785 c	472 a
A2 x B2	18.0 b	9.9 b	3.0 b	1.4 b	28.4 b	8.95 b	1.910 bc	469 a
A3 x B3	11.0 b	4.3 b	2.2 b	1.3 b	35.5 a	7.33 c	1.970 b	372 b
A5 x B5	12.0 b	2.9 b	1.2 b	0.6 c	36.0 a	7.22 c	1.996 b	361 b
A6 x B6	19.6 b	11.2 b	6.3 a	1.8 ab	40.9 a	9.17 b	2.040 b	448 a
A9 x B9	57.2 a	25.6 a	6.5 a	2.0 a	24.7 b	11.96 a	2.430 a	491 a
\bar{X}	21.9	9.9	3.6	1.48	31.7	8.87	2.021	436
MDS	18.2	8.6	1.9	0.67	3.9	1.39	0.13	72.8

GPEg = granos de polen en el estigma; TPEG, TPEt, TPOv = tubos polínicos en el estigma, estilo y ovario a las 18 hdp; PF = porcentaje de pistilos fecundados 96 hdp; RSP = rendimiento de semilla por panoja; P100S = peso de 100 semillas; SP = semillas por panoja. Los valores con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p = 0.05$).

En este muestreo, la cruza A9 x B9 superó a las demás en cantidad de granos de polen adheridos al estigma y germinados; sin embargo, cuando el tubo polínico alcanzó la

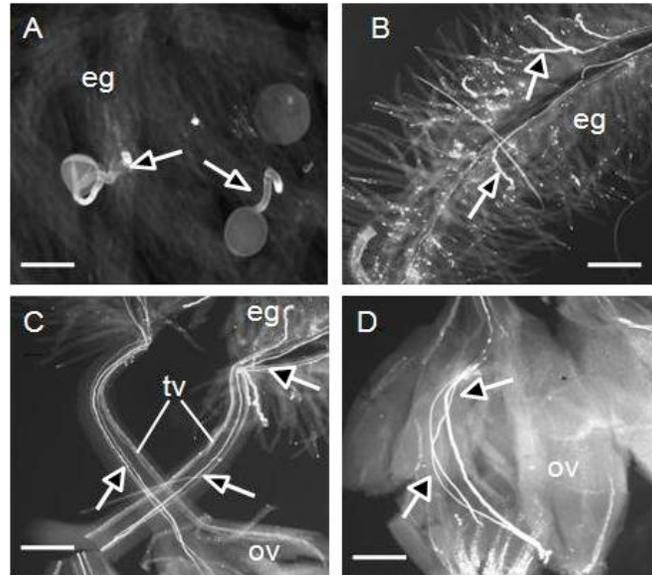


Figura II.4. Germinación del polen y crecimiento *in vivo* del tubo polínico de sorgo 18 h después de la polinización. Los pistilos se procesaron con la técnica del aplastado y se tiñeron con azul de anilina. Los tubos polínicos se visualizaron con epifluorescencia UV (excitación, 365 nm; emisión, 397 nm). (A) germinación del polen en el estigma, observándose la penetración directa en la papila (barra = 50 μ m). Crecimiento del tubo polínico en el estigma (B), estilo (C) y ovario (D) (barra = 50 μ m). eg = estigma; ov = ovario; tv = tejido vascular. Las flechas indican tubos polínicos.

zona del estilo y del ovario ya no mostró diferencias ($p \leq 0.05$) con la cruz A6 x B6 (Cuadro II.4). A las 96 hdp, A6 x B6 tuvo 16% más pistilos fecundados que A9 x B9, pero a la cosecha A9 x B9 fue la de mayor rendimiento (12 g/panoja), mayor peso individual de la semilla (2.430 g por 100 semillas) y se mantuvo en el grupo estadístico superior de semillas por panoja.

El rendimiento (RSP) fue la variable más asociada con la germinación del polen y con el crecimiento del tubo polínico ($r = 0.83^*$ a 0.98^{**}), al igual que sus componentes: peso de 100 semillas ($r = 0.57$ a 0.91^{**}) y número semillas ($r = 0.60$ a 0.75). El número de tubos polínicos que llegó al ovario tuvo correlación significativa ($r = 0.75^*$) con el número de semillas por panoja. No obstante, el porcentaje de pistilos fecundados no correlacionó significativamente con el crecimiento del tubo polínico ($r = 0.50$), peso de 100 semillas ($r =$

0.13), rendimiento ($r = 0.52$) ni con el número de semillas por panoja ($r = 0.66$) (Cuadro II.5).

Cuadro II. 5. Matriz de correlación entre las variables de germinación del polen y las del rendimiento y sus componentes.

Variable	TPEg	TPEt	TPOv	PF	RSP	P100S	SP
GPEg	0.97**	0.74*	0.70	0.47	0.94**	0.91**	0.60
TPEg		0.84*	0.81*	0.42	0.98**	0.87*	0.69
TPEt			0.92**	0.03	0.84*	0.69	0.66
TPOv				0.22	0.83*	0.57	0.75*
PF					0.52	0.13	0.66
RSP						0.77*	0.82*
P100S							0.26

GPEg = granos de polen en el estigma; TPEg, TPEt, TPOv = tubos polínicos en el estigma, estilo y ovario a las 18 hdp; PF = porcentaje de pistilos fecundados 96 hdp; RSP = rendimiento de semilla por panoja; P100S = peso de 100 semillas; SP = semillas por panoja.* $p \leq 0.05$.

En el año 2005 la magnitud de la mayoría de las variables fue menor que en 2006 (Cuadro II.6); *i. e.*, el número de granos adheridos y germinados en el estigma, pistilos fecundados, rendimiento de semilla, peso de 100 semillas y número de semillas por panoja. Sin embargo, conforme el tubo polínico creció en el pistilo ya no se observaron diferencias entre años. Durante la época de polinización (2005 y 2006), las temperaturas promedio mínimas fueron 6 y 8 °C, con máximas de 28.8 y 29.7 °C; humedades promedio mínimas de 44.6 y 49.4%, y máximas de 99.4 y 99.5%, respectivamente. Es decir, la estación de crecimiento de 2005 fue más fría (2 °C) y menos húmeda (4.8%) que 2006; además, en 2005 se sembró un mes más tarde.

La interacción G x A, resultado de la respuesta diferencial de los genotipos de un año a otro, se presentó en el rendimiento y sus componentes (RSP, P100S y SP), *i. e.*, mientras el P100S de la línea A2 fue relativamente constante en ambos años (1.924 *vs.*

Cuadro II.6. Variables del crecimiento del tubo polínico y de producción de semilla durante 2005 y 2006. Promedios de seis cruzas A x B.

Año	GPEg	TPEg	TPEt	TPOv	PF (%)	RSP (g)	P100S (g)	SP
2005	17.6 b	8.14 b	3.9 a	1.4 a	29.0 b	7.16 b	1.916 b	374 b
2006	26.2 a	11.6 a	3.5 a	1.3 a	34.2 a	10.57 a	2.126 a	497 a
MDS	7.2	3.4	0.75	0.26	1.5	0.5	0.05	28.5

GPEg = granos de polen en el estigma; TPEg, TPEt, TPOv = tubos polínicos en el estigma, estilo y ovario a las 18 hdp; PF = porcentaje de pistilos fecundados 96 hdp; RSP = rendimiento de semilla por panoja; P100S = peso de 100 semillas; SP = semillas por panoja. Los valores con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p = 0.05$).

1.896 g), el de la línea A9 disminuyó en 25% (2.701 vs. 2.154 g). Además, la magnitud de la interacción fue estadísticamente similar al del efecto del año en el número de granos de polen adheridos y germinados en el estigma, y la mayor respuesta diferencial de estas variables se presentó entre el par A5, cuyos valores fueron relativamente similares en ambos años, lo cual no ocurrió con el par A9. Respecto a las correlaciones entre las variables de la germinación del polen *vs.* las características del pistilo de las líneas A y *vs.* las del polen de las líneas B (Cuadro II.7), el ancho del ovario fue la variable más relacionada con el número de granos de polen adheridos al estigma ($r = 0.77^{**}$) y crecimiento del tubo polínico ($r =$ de 0.71 a 0.80*); la longitud del ovario presentó valores negativos (r entre -0.44 y -0.69) no significativos.

La longitud del pistilo, estigma y estilo tuvieron pobre asociación con la germinación y crecimiento del tubo polínico (r entre -0.02 y -0.42). Ninguna variable del grano de polen estuvo significativamente asociada con las del tubo polínico, aunque la correlación entre la viabilidad (densidad citoplásmica) *vs.* el número de granos de polen adheridos al estigma y germinados en esta estructura alcanzó valores medianos ($r = 0.50$ y 0.51).

Cuadro II.7. Matriz de correlación entre variables de germinación del polen *vs.* del pistilo y del polen.

Variable	Pistilo de líneas androestériles					Polen de líneas fértiles		
	LPs	LEg	LEt	LOv	AOv	PP	PV	DGp
GPEg	-0.48	-0.23	-0.24	-0.44	0.77*	-0.48	0.50	0.13
TPEg	-0.42	-0.16	-0.14	-0.46	0.80*	-0.42	0.51	-0.08
TPEt	-0.02	-0.31	-0.27	-0.66	0.71	-0.03	0.40	-0.49
TPOv	-0.22	-0.29	-0.18	-0.69	0.73*	-0.22	0.38	-0.53

GPEg = granos de polen en el estigma; TPEg, TPEt, TPOv = tubos polínicos en el estigma, estilo y ovario a las 18 hdp; LPs = longitud del pistilo, LEg = del estigma, LEt = del estilo, LOv = del ovario; AOv = ancho del ovario; PP = producción de polen; PV = polen viable y DGp= diámetro del polen. * $p \leq 0.05$.

II.5. DISCUSIÓN

Características de las líneas A y B

Las características morfológicas del pistilo de las líneas A, al igual que el diámetro del polen de las líneas B, variaron entre genotipos pero no fueron afectadas por los cambios ambientales inherentes a los años de estudio ni por la interacción genotipo x ambiente (Cuadro II.1), lo que sugiere que son variables heredables, estables o de poca plasticidad fenotípica (Vidal-Martínez *et al.*, 2004). En cambio, las características fisiológicas del polen (producción y viabilidad) fueron afectadas por el ambiente y por su interacción con el genotipo. Comparativamente con el pistilo, el polen es una unidad reproductora de mayor valor adaptativo (Heslop-Harrison, 2000); *i. e.*, su diámetro refleja el grado de madurez (Heslop-Harrison, 1982) y de hidratación (Lansac *et al.*, 1994), y su contenido citoplásmico expresa su viabilidad y cantidad de reservas para el crecimiento del tubo (Dafni *et al.*, 2005). Estos aspectos, entre otros, son indispensables para iniciar la germinación, etapa en la que la humedad relativa y la temperatura, influyen en la viabilidad del polen y su germinación (Lansac *et al.*, 1994).

En sorgo no se dispone de información acerca de la variación morfológica del pistilo entre líneas androestériles y su relación con la germinación del polen. En líneas restauradoras se ha encontrado amplia variación en la longitud (de 1 a 12 mm) y en la forma del estigma; además, las líneas R con estigmas cortos (1 a 3 mm) presentaron mayor resistencia al ergot (*Claviceps africana*) (Dahlberg *et al.*, 2001), condición morfológica que todas las líneas A (Cuadro II.2) (2.32 ± 0.31 mm) muestran en este estudio.

Germinación del polen y crecimiento del tubo polínico en líneas A

En el pistilo de las flores fértiles de sorgo, antes de la floración, se identifica el sistema vascular, el tejido de transmisión y el canal estilar (hendidura localizada en la unión de los dos brazos del estilo) (Pizzolato, 1991). Nuestros resultados indican que el estilo es básicamente sólido antes de la polinización (Figura II.1) ya que en su interior no hay perforación alguna; en cambio, a las 72 hdp, en los cortes transversales se observó mayor diferenciación del tejido de transmisión, el que se ensancha a medida que se aproxima a la región superior del ovario (Figura II.2). Estos cambios en el estilo facilitan el crecimiento del tubo polínico, pues puede haber lisis celular (Heslop-Harrison, 2000) y apertura de espacios en el tracto de transmisión (Hudak *et al.*, 1993), probablemente intracelulares, porque no observamos necrosis celular (Figura II.3). El tejido de transmisión se considera especializado para el crecimiento del tubo polínico y se ha observado en *Pennisetum glaucum* (Willingale y Mantle, 1985), *Zea mays* (Westgate y Boyer, 1986) y en dicotiledóneas como *Brugmansia suaveolens* (Hudak *et al.*, 1993). En este nuestro caso, se observó que el tubo polínico no creció dentro del haz vascular y sólo ocupó la región del tejido de transmisión. La disminución del número de tubos polínicos respecto al número de granos que inicialmente germinan (Figura II.4) posiblemente esté más relacionado con mecanismos bioquímicos y de suministro de nutrientes que con una barrera física, aunque

el tejido de transmisión corresponde sólo a una porción del estilo. Se desconoce el mecanismo que le permite al pistilo diferenciar entre los tubos polínicos compatibles.

Los altos coeficientes de variación de los caracteres relacionados con la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico (entre 51 y 94%) se atribuyen a una combinación de factores; *i. e.*, el tamaño de muestra (Marshall y Diggle, 2001); la forma sigmoideal de la curva acumulada de germinación del polen (Sun *et al.*, 1991); el menor número de tubos polínicos en comparación con los granos de polen que inicialmente germinan (Hodnett *et al.*, 2005; Price *et al.*, 2006); la baja eficiencia en la fecundación pues muchos granos de polen germinan pero no fecundan (Taylor y Obendorf, 2001); y las interacciones entre los tejidos gametofíticos (polen y saco embrionario) y esporofíticos (tejidos del ovario) (Weterings y Russell, 2004).

El porcentaje promedio de tubos polínicos en la base del ovario fue menor de 5% a las 18 hdp, quizás debido a que las temperaturas mínimas promedio (6 y 8 °C) prevalentes en el campo durante la polinización son menores a las que imperan en invernaderos, condición en la que existen mejores respuestas; *i. e.*, 12% (Hodnett *et al.*, 2005) y 17% (Price *et al.*, 2006) a 1 hdp, y 70% (Sun *et al.*, 1991) a las 3 hdp. Destaca la cruza A9 x B9 por su mejor comportamiento en los eventos previos a la fecundación. El número de granos de polen que germinan en el estigma es un indicador de la receptividad de este órgano (Dafni *et al.*, 2005), y en el presente estudio las líneas B produjeron entre 165 y 527 mg de polen durante el periodo de floración (Cuadro II.2), equivalente a un promedio de 27 mg por día. Además, el número de granos de polen tampoco se considera un factor restrictivo pues estas líneas produjeron entre 500 y 700 granos de polen por antera (datos no mostrados). En consecuencia y acorde con Wilcock y Neiland (2002), la producción de polen no estuvo asociada con la producción de semillas, quizá porque basta un tubo

polínico en el saco embrionario para que ocurra la doble fecundación (Taylor y Obendorf, 2001; Weterings y Russell, 2004).

En todas las cruzas el número de tubos polínicos fue menor al de granos de polen inicialmente adheridos. Entre los factores que restringen el crecimiento del tubo polínico se encuentran la morfología del pistilo (Heslop-Harrison, 1982), la competencia por nutrientes (Herrero y Hormaza, 1996) o por agua y espacio en el estigma (Heslop-Harrison, 1982, 2000), la edad del estigma (Sun *et al.*, 1991) y las interacciones entre los tejidos de los progenitores (Weterings y Russell, 2004). Además, el sorgo sólo tiene un ovario con un óvulo (Earp *et al.*, 2004).

La cruz A9 x B9 (Cuadro II.4) superó al promedio del grupo en todas las variables relacionadas con la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico, desde 43% para TPOv a 161% para GPEg, lo que anticiparía un alto grado de compatibilidad entre el pistilo de la línea A y el polen de su línea B (Wilcock y Neiland, 2002); también las superó en las variables reproductivas en un rango de 12% (número de semillas) a 35% (rendimiento). Se esperaba que esa cruz produjera el mayor número de semillas por panoja del grupo, pues la línea A9 tiene 38% más flores que la media (Capítulo I de esta tesis) y su línea isogénica (B9) produjo 31% más polen que el promedio del grupo (Cuadro II.2), con un porcentaje de viabilidad de 72%. Sin embargo, a las 96 hdp el porcentaje de pistilos fecundados de esa cruz fue 7% inferior al promedio del grupo y 16% respecto a la cruz de mayor PF (A6 x B6) (Cuadro II.4). Si bien, la producción de semilla puede disminuir por la absorción de ovarios fecundados (Taylor y Obendorf, 2001), en nuestro estudio, a las 96 hdp la frecuencia máxima de pistilos fecundados fue inferior a 50%. La edad del estigma es otro factor que influye en su receptividad, germinación del polen y crecimiento del tubo polínico (Sun *et al.*, 1991), y aunque aquí no se cuantificó, la experiencia de campo en la región

indica que el estigma permanece receptivo al menos durante 8 d después del fin de la antesis. En este estudio no se observó daño externo en los pistilos, como arrugamiento, decoloración o deformación, que implicaran cambios en la receptividad del estigma (Dafni *et al.*, 2005). Tampoco se observaron tubos polínicos con crecimiento anómalo (enroscamientos) ni fallas en su dirección (Figuras II.2, II.4).

En resumen, la receptividad del estigma del grupo de cruzas mostró un buen grado de compatibilidad polen-pistilo en las etapas pre- y post fertilización pues como consecuencia de estos procesos la producción de semilla, en polinización manual, varió entre 7.22 y 11.96 g/panoja (1.44 a 3.92 t ha⁻¹) (Cuadro II.4), aceptable desde el punto de vista agronómico.

Las diferencias entre años en el número de granos adheridos y germinados en el estigma, y en las variables reproductoras (Cuadro II.6), pueden deberse a los contrastes en humedad y temperatura durante el periodo de floración (Capítulo I de esta tesis); además, en 2005 se sembró un mes más tarde. En condiciones *in vitro* la germinación del polen de sorgo no es influida por los cambios de temperatura entre 20 °C a 40 °C pero a 10 °C fue menor a 1% (Tuinstra y Wedel, 2000). Cuando el grano de polen de sorgo pierde el 50% de su contenido de agua a 25 °C su viabilidad es nula y no hay producción de semilla (Lansac *et al.*, 1994). Como se indicó, los estudios de germinación *in vivo* del polen y crecimiento del tubo polínico en sorgo se han efectuado en invernadero, mientras que el presente caso fue en condiciones de campo. Además, los valores aquí registrados sugieren que el grupo de cruzas posee buena tolerancia al frío, porque durante la polinización ocurrieron temperaturas mínimas entre 6 y 8 °C.

Correlaciones entre las características del pistilo, del polen, la germinación y elongación del tubo polínico

Las diferencias entre germinación y crecimiento del tubo polínico *in vitro vs. in vivo* reflejan la importancia del pistilo en la germinación del polen (Cisneros-López *et al.*, 2006) y en el crecimiento del tubo polínico (Sánchez *et al.*, 2004). Nuestros resultados indican que la receptividad estigmática no está asociada con la longitud del estigma y del estilo, aunque se esperaba una mayor asociación con la longitud del estigma por ser el primer sitio de contacto entre el polen y el pistilo (Dafni *et al.*, 2005); en cambio, el ancho y longitud del ovario si estuvieron asociados. En arroz (*Oryza sativa* L.) (Farell *et al.*, 2006) y en líneas restauradoras de sorgo (Dahlberg *et al.*, 2001), la morfología del estigma fue independiente del número de granos de polen adheridos. Las correlaciones positivas aquí encontradas quizás se deban a la atracción quimiotrópica del ovario hacia el polen (Taylor y Hepler, 1997); y las relaciones negativas se atribuyen a restricciones estilares, en primer lugar físicas, que impiden el crecimiento del tubo polínico (Heslop-Harrison, 1982).

La baja correlación entre la viabilidad del polen (r de 0.38 a 0.51) y su tamaño (r entre -0.53 y 0.13) *vs.* la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico, puede atribuirse a que la disponibilidad de nutrientes en el estigma no está asociada con el tamaño de polen (Cruzan, 1990); a que la densidad citoplásmica del polen aumenta la probabilidad pero no la certeza de germinar (Pline *et al.*, 2002); o a que el polen estéril puede dar falsos positivos o respuestas parciales de germinación (Heslop-Harrison *et al.*, 1982). Los resultados globales de las correlaciones expresan las múltiples interacciones entre los progenitores, cuya su magnitud varía dependiendo del progenitor que intervenga, como hemos observado en cruza A x R dialélicas (inédito).

Se propone que el problema de la producción de grano se encuentra en las primeras etapas de desarrollo de la semilla, a causa de fallas en el desarrollo del embrión y deficiencias en el abastecimiento de nutrientes por parte de la nucela y endospermo (Heslop-Harrison, 1982; Weber *et al.*, 1998); o al efecto de las relaciones fuente-demanda entre las estructuras de la inflorescencia (Gambín y Borrás 2005), entre otras. El presente estudio demuestra que la viabilidad del grano de polen y su competencia para germinar y crecer dentro del pistilo no son variables que determinen la baja producción de semillas entre las cruza isogénicas.

II.6. CONCLUSIONES

La variabilidad fenotípica en la morfología del pistilo y del diámetro del polen sólo es atribuida a la componente genética, mientras que en la producción y viabilidad del polen también influyen las variaciones ambientales inherentes a los años y la interacción genotipo x año. Las variables del pistilo y polen que más relación tuvieron con la germinación y elongación del tubo polínico fueron el ancho y longitud del ovario y la densidad citoplásmica del polen. La receptividad del estigma no estuvo relacionada con su morfología. El grupo de cruza isogénicas posee un buen grado de compatibilidad polen-pistilo en las etapas pre- y post fertilización, aún en presencia de temperaturas mínimas entre 6 y 8 °C durante la polinización pues el rendimiento de semilla osciló entre 7 y 12 g/panoja. Es decir, las diferencias en producción de semilla entre cruza isogénicas no son consecuencia de la cantidad y viabilidad del polen. Se sugiere investigar las causas del aborto de ovarios fecundados en sorgo.

II.7. LITERATURA CITADA

Bassetti, P., and M. E. Westgate. 1993a. Senescence and receptivity of maize silks. *Crop Sci.* 33: 275-278.

- Bassetti, P., and M. E. Westgate. 1993b. Water deficit affects receptivity of maize silks. *Crop Sci.* 33: 279-282.
- Boavida, L. C., A. N. Vieira, D. J. Becker, and A. J. Feijó. 2005. Gametophyte interaction and sexual reproduction, how plants make a zygote. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 615-632.
- Brooking, I. R. 1976. Male sterility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench induced by low night temperature. I. Timing of the stage of sensitivity. *Aust. J. Plant Physiol.* 3: 589-596.
- Cheung, A. Y. 1995. Pollen-pistil interactions in compatible pollination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 3077-3080.
- Cisneros-López, M. E., L. E. Mendoza-Onofre, H. A. Zavaleta-Mancera, G. Mora-Aguilera, L. Córdova-Téllez, V. A. González-Hernández y M. Hernández-Martínez. 2006. Viabilidad y germinación del grano de polen en líneas de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). Sociedad Mexicana de Histología (eds). Memorias XXX Congreso Nacional de Histología. UAM, México, D. F. p. 66.
- Cisneros-López, M. E., L. E. Mendoza-Onofre, G. Mora-Aguilera, L. Córdova-Téllez y M. Livera-Muñoz. 2007. Híbridos y progenitores de sorgo tolerantes al frío. I: Calidad de la semilla y su influencia en el establecimiento de plántulas. *Agrociencia* 41: 45-55.
- Cruzan, M. B. 1990. Variation in pollen size, fertilization ability and post fertilization siring ability in *Erythronium grandiflorum*. *Evolution* 44: 843-856.
- Dafni, A., E. Pacini, and M. Nepi. 2005. Pollen and stigma biology. *In*: Dafni, A., G. Kevan, and B. C. Husban (eds). *Practical Pollination Biology*. NHBS. Cambridge, Canada. pp: 1-58.
- Dahlberg, J. A., R. Bandyopadhyay, W. L. Rooney, G. N. Odvody, and P. Madera-Torres, 2001. Evaluation of sorghum germplasm used in US breeding programs for sources of sugary disease resistance. *Plant Pathol.* 50: 681-689.
- Edlund, F., A. R. Sanson, and D. Preuss. 2004. Pollen and stigma structure and function. The role of diversity in pollination. *Plant Cell* 16: S84-S97.
- Earp, C. F., C. M. McDonough, and L. W. Rooney. 2005. Microscopy of pericarp development in caryopsis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Cereal Sci.* 39: 21-27.

- Farell, T. C., K. M. Fox, R. L. Williams, and S. Fukai. 2006. Genotypic variation for cold tolerance during reproductive development in rice screening with cold air and cold water. *Field Crops Res.* 98: 178-194.
- Gambín, B. L., and L. Borrás. 2005. Sorghum kernel weight: Growth patterns from different position within the panicle. *Crop Sci.* 45: 553-561.
- Herrero, M., and J. I. Hormaza. 1996. Pistil strategies controlling pollen tube growth. *Sex. Plant Reprod.* 9: 343-347.
- Heslop-Harrison, J. 1982. Pollen-stigma interaction and cross-incompatibility in grasses. *Science* 215: 1358-1364.
- Heslop-Harrison, Y. 2000. Control gates and micro-ecology. The pollen-stigma interactions in perspective. *Ann. Bot.* 85 (supplement A): 5-13.
- Hodnett, G. L., B. L. Burson, W. L. Rooney, S. L. Dillon, and H. J. Price. 2005. Pollen-pistil interactions result in reproductive isolation between *Sorghum bicolor* and divergent *Sorghum* species. *Crop Sci.* 45: 1403-1409.
- Hudak, J., B. Walles, and F. Vennigerholz. 1993. The transmitting tissue in *Brugmansia suaveolens* L., ultrastructure of stylar transmitting tissue. *Ann. Bot.* 71: 177-186.
- Kelly, K. J., A. Rasch, and S. Kalisz. 2002. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. *Am. J. Bot.* 89: 1021-1023.
- Lansac, A. R., C. Y. Sullivan, B. E. Johnson, and K. W. Lee. 1994. Viability and germination of the pollen of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Ann. Bot.* 74: 27-33.
- Livera M., M. y A. C. Carballo. 1977. Mejoramiento genético del *Sorghum bicolor* (L.) Moench por tolerancia al frío. Adaptación de genotipos tolerantes. *Agric. Téc. Méx.* 4: 77-99.
- Martin, F. W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence microscopy. *Stain Technol.* 34: 125-128.
- Marshall, D. L., and P. K. Diggle. 2001. Mechanism of differential pollen donor performance in wild radish *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* 88: 242-257.

- Mendoza Onofre, L. E. 1991. Sorgho. *In*: 10 Años de Investigación Agrícola en la Región Central de México. SARH. INIFAP. CIFAP México. Campo Exptal. Valle de México. Pub. Esp. No. 4. pp: 104-118.
- Ortiz, C. J. y A. C. Carballo. 1972. La problemática del mejoramiento del sorgo de grano para Valles Altos de México. Anais do I Simposio Interamericano de Sorgho. Brasilia, Brasil. pp: 75-85
- Osuna-Ortega, J., Ma. del C. Mendoza-Castillo, and L. E. Mendoza-Onofre. 2003. Sorghum cold tolerance, pollen production and seed yield in Central High Valleys of Mexico. *Maydica* 48: 125-132.
- Pizzolato, T. D. 1991. Vascular system of the fertile spikelet of *Sorghum* (Gramineae, Panicoideae). *Can. J. Bot.* 69: 656-670.
- Price, J. H., G. L. Hodnett, B. L. Burson, S. L. Dillon, D. M. Stelly, and W. L. Rooney. 2006. Genotype dependent interspecific hybridization of *Sorghum bicolor*. *Crop Sci.* 46: 2617-2622.
- Pline, W. A., L. Keith, T. O. Edmisten, J. W. Wilcut, R. Wells, and N. S. Allen. 2002. Use of digital image analysis, viability stains and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. *Crop Sci.* 42: 2193-2200.
- Rao, N. G. P., U. R. Murty, and B. S. Rana. 2002. Sorghum. *In*: Evolution and Adaptation of Cereal Crops. Chopra, V. L., and P. Shyam (eds). Sci. Pub., Inc. Enfield, New Hampshire, USA. pp: 214-238.
- Sánchez, A. M., M. Bosch, M. Bots, J. Nieuwland, R. Feron, and C. Mariani. 2004. Pistil factors controlling pollination. *Plant Cell* 16: S98-S106.
- SAS Institute. 2002. SAS/SAT. Versión 9.1. SAS Inst. Cary. NC. USA, Versión en línea <http://www.colpos.mx/servicios/sas/indexs.htm>
- Sun, Y., K. M. Suksayretrup, B. Kirham, and G. H. Liang. 1991. Pollen tube growth in reciprocal interspecific pollinations of *Sorghum bicolor* and *S. versicolor*. *Plant Breed.* 107: 197-202.
- Taylor, L. P., and P. K. Hepler. 1997. Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 461-491.

- Taylor, D. P., and R. L. Obendorf. 2001. Quantitative assessment of some factors limiting set in buckwheat. *Crop Sci.* 41: 1792-1799.
- Tuinstra M. R., and J. Wedel. 2000. Estimation of pollen viability in grain sorghum. *Crop Sci.* 40: 968-970.
- Vidal-Martínez, V. A., M. D. Clegg, and B. E. Johnson. 2001. Genetics studies on maize pollen and grain yield and their yield components. *Maydica* 46: 35-40.
- Vidal-Martínez, V. A., M. D. Clegg, B. E. Johnson, A. Osuna-García, and B. Coutiño-Estrada. 2004. Phenotypic plasticity and pollen production components in maize. *Agrociencia* 38: 273-284.
- Wang, E., H. Meinke, M. Ryley, D. Herde, and R. Henzell. 2000. On the relation between weather variables and sorghum ergot infection. *Aust. J. Agric. Res.* 51: 313-324.
- Weber, H., U. Heim, S. Golombeck, L. Borisjuk, and U. Wobus. 1998. Assimilate uptake and the regulation of seed development. *Seed Sci. Res.* 8: 331-345.
- Weterings, K., and S. D. Russell. 2004. Experimental analysis of fertilization process. *Plant Cell* 16: S107-S118.
- Westgate, M. E., and J. S. Boyer. 1986. Reproduction at low silk and pollen water potential in maize. *Crop Sci.* 26: 951-956.
- Wheeler, M. J., V. E. Frankil-Tong, and F. C. H. Franklin. 2001. The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. *New Phytol.* 151: 565-584.
- Wilcock, C., and R. Neiland. 2002. Pollination failure in plants. Why it happens and when it matters. *Trends Plant Sci.* 7: 270-277.
- Willingale, J., and P. G. Mantle. 1985. Stigma constriction in pearl millet, a factor influencing reproduction and disease. *Ann. Bot.* 56: 109-115.
- Wood, A. W., D. K. Y. Tan, E. A. Mamun, and B. G. Sutton. 2006. Sorghum can compensate for chilling-induced grain loss. *J. Agron. Crop Sci.* 192: 445-451.
- Young, H. J., and T. P. Young. 1992. Alternative outcome of natural and experimental high pollen loads. *Ecology* 73: 639-647.
- Zavaleta, H. A., and M. Engleman. 1994. Anatomy of the ovule and seed of *Manilkara zapota* (L.) Van Royen (Sapotaceae). *Phytomorphology* 44: 169-175.

CAPÍTULO III. CARACTERÍSTICAS FLORALES, RECEPTIVIDAD DEL ESTIGMA Y PRODUCCIÓN DE SEMILLA DE LÍNEAS A DE SORGO INFECTADAS CON ERGOT (*Claviceps africana* Frederickson, Mantle & de Milliano) †

III.1. RESUMEN

El ergot (*Claviceps africana*) del sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es un riesgo para la producción de semilla en líneas androestériles. Para conocer la relación entre características florales, receptividad del estigma y producción de semilla en plantas inoculadas, se sembraron seis pares de líneas A y B adaptadas a los Valles Altos Centrales de México (2200 msnm), en condiciones de campo. En líneas B se midió la densidad citoplásmica del polen y en las A: días a antesis, periodo de floración, longitud del estigma y de panoja, flores por panoja, densidad y apertura floral, y progreso de la floración. En cruza manuales A x B, inmediatamente después de la polinización se asperjó una suspensión de inóculo (1×10^6 conidios mL⁻¹) y a las 18 h se contó *in vivo* el polen adherido y germinado en el estigma, tubos polínicos en estilo y ovario, y pistilos fecundados. A la cosecha se evaluó el número y el porcentaje de flores enfermas, el rendimiento y sus componentes por panoja. La línea A3 fue la más precoz, con el periodo de floración más corto y el mayor progreso de la floración; la línea A9 fue la más tardía, con los estigmas más cortos y la mayor cantidad de flores. El hongo disminuyó la receptividad del estigma, el rendimiento y sus componentes. En promedio de las cruza, hubo 11% de flores enfermas, 365 semillas por panoja inoculada y 498 en aquéllas sin inocular. En las plantas inoculadas, la cruza A9 x B9 sobresalió por su rendimiento (14.7 g/panoja) y baja frecuencia (9%) de flores enfermas. La cruza A3 x B3 presentó la menor reducción (17%)

†Una versión al inglés de este capítulo, se encuentra en arbitraje en Seed Sci. & Technol.

en las variables relacionadas con la receptividad del estigma y 11% de flores enfermas.

Palabras clave: *Sorghum bicolor*, componentes del rendimiento, interacción polen-pistilo, interacción hospedero-patógeno.

III.2. INTRODUCCIÓN

El ergot [*Claviceps africana* Frederickson, Mantle & de Milliano (anamorfo *Sphacelia sorghi*)] del sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) infecta los pistilos de flores no polinizadas y está presente en México desde 1997 (Aguirre *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2001). El síntoma distintivo inicial es la producción de mielecilla en las flores infectadas y la acumulación de la masa de hifas (esfacelio) en todos los tejidos del ovario, incluido el saco embrionario. Cuando el esfacelio se seca, se forma el esclerocio, sustituto de la semilla (Frederickson *et al.*, 1999).

La floración es la etapa fenológica más vulnerable al patógeno (Reed *et al.*, 2002). Los genotipos con escasa producción de polen fértil, las líneas androestériles mal polinizadas y algunos sorgos forrajeros son más susceptibles al hongo (McLaren y Wehner, 1992; Meinke y Ryley, 1997). La temperatura óptima para la infección y desarrollo de la enfermedad es 19 °C; el riesgo disminuye en temperaturas superiores a 28 °C. Las temperaturas inferiores a 15 °C durante la microsporogénesis, frecuentes en los Valles Altos Centrales de México (2200 m de altitud), reducen la viabilidad del polen (Brooking, 1976; McLaren y Flett, 1998), e indirectamente favorecen la incidencia y severidad de la enfermedad; lo mismo ocurre cuando la humedad relativa es mayor a 90% (McLaren, 2002).

Los estudios para evaluar la relación entre las características florales del sorgo y la susceptibilidad a *C. africana*, así como la interacción entre tales características y los factores del ambiente, son escasos (Dahlberg *et al.*, 2001). Este tipo de estudios son necesarios para identificar criterios de selección de fuentes de tolerancia al patógeno. En El

Bajío, México (1580 msnm), las líneas B y R adaptadas a los Valles Altos Centrales de este país, denominadas tolerantes al frío, presentaron menor daño a la enfermedad que genotipos tolerantes al patógeno, lo que en parte se atribuyó a su mayor precocidad y tamaño de panoja, periodo de floración más corto, y mayor cantidad y viabilidad de polen (Hernández-Martínez *et al.*, 2002); además, la línea A-LIVA X tolerante al frío tuvo mayor tasa de apertura floral (Mendoza-Onofre *et al.*, 2006). En estas investigaciones, sólo se emplearon dos pares de líneas A/B tolerantes al frío y actualmente se dispone de cerca de 30 pares isogénicos, de los cuales se seleccionaron seis por sus contrastes morfológicos, fenológicos y agronómicos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar las diferencias de las características florales de seis pares de líneas A y B, y de la receptividad del estigma y la producción de semilla en cruza A x B inoculadas con *C. africana*.

III.3. MATERIALES Y MÉTODOS

En Montecillo, Estado de México (2240 m de altitud y temperatura mínima promedio de 6.7 °C durante la estación de crecimiento), en condiciones de campo y riego, se sembraron seis pares de líneas isogénicas tolerantes al frío (A1/B1, A2/B2, A3/B3, A5/B5, A6/B6 y A9/B9). La siembra se hizo el 9 de mayo y la cosecha el 14 de octubre de 2006. La parcela experimental fue de 10 surcos de 5 m de longitud, 0.92 m de ancho y 0.15 m entre plantas; la parcela útil consistió de los tres surcos centrales. Los registros de temperatura y humedad a la intemperie durante la estación de crecimiento se tomaron en una estación meteorológica digital localizada a 150 m del sitio experimental.

Características florales. En diez plantas (una planta por repetición) de cada línea A se cuantificó los días a 50% de antesis (DA) y periodo de floración (PFL) (días de inicio a fin de la floración). Al final de la antesis se extrajeron 10 pistilos de una rama central por

panoja a los que se midió longitud del estigma (LEg, mm). En cada panoja se midió su longitud (LP, cm), número de flores sésiles (FP) y se calculó la densidad floral (DF = FP/LP, en flores por centímetro de panoja) (Mendoza-Onofre *et al.*, 2006), apertura floral (número de flores por día del periodo de floración) (AF = FP/PFL) y progreso de la floración (longitud florecida por día durante el periodo de floración) (PRF = LP/PFL). En las líneas B se extrajo una rama central de la panoja de cinco plantas (una planta por repetición), en la que se cuantificó el porcentaje de polen viable (VP = granos de forma y tamaño típicos, con densidad citoplásmica mayor a 75%) mediante tinción con acetocarmín (Osuna-Ortega *et al.*, 2003).

Polinización, inoculación y receptividad del estigma. En cada línea A, a la emergencia de la panoja, se cubrieron 20 plantas con bolsas de papel y al final de la floración se polinizaron 10 plantas con abundante polen de su respectiva línea B, en una sola ocasión (Capítulo I de esta tesis). Inmediatamente después se asperjó 5 mL de una suspensión (1×10^6 conidios mL⁻¹) del hongo provenientes de plantas enfermas de un lote anexo cuya siembra fue más temprana, y se volvieron a cubrir. Las otras 10 plantas sólo se polinizaron y fungieron como testigo.

Después de 18 h, se cortó una ramilla central de dos panojas por tratamiento y se fijó en solución de Farmer (Ruzin, 1999). Para evaluar la receptividad del estigma se extrajeron 30 pistilos por ramilla y en cada uno se midió la germinación del polen y el crecimiento *in vivo* del tubo polínico, con la técnica de azul de anilina, “aplastado” y epifluorescencia (Cisneros-López *et al.*, 2006). Además, se calculó el número de granos de polen adheridos al estigma (GPEg), tubos polínicos en estigma, estilo y base del ovario (TPEg, TPEt y TPOv), y porcentaje de pistilos fecundados (PF) (con al menos un tubo polínico en la base del ovario). Sólo se consideraron pistilos completos y con una uniforme

distribución de conidios, por lo que el tamaño final de la muestra fueron diez pistilos por rama y por tratamiento. Las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss AXioskop 2 plus®, HBO 050/AC) con un filtro UV (excitación, 365 nm; emisión, 397 nm). Las imágenes se capturaron digitalmente con una cámara AxionCam MRC5 y el procesador de imágenes AxionVision 4.4®.

Producción de semilla. En cada cruce A x B se cosecharon cinco plantas tratadas e igual número de plantas del testigo, en las que se determinó el rendimiento de semilla (RSP), peso de 100 semillas (P100S) (promedio de tres muestras), número de semillas (SP), flores enfermas (FE = con glumas con mielecilla, restos de esfacelio o de esclerocio) y porcentaje de flores enfermas (PFE = FE/FP) por panoja. En 20 esclerocios por genotipo, se hicieron cortes longitudinales que se observaron en un microscopio estereoscópico Zeiss 475022 para verificar si se trataba de tejido esfacélico o esclerótico.

Análisis estadístico. Se hicieron dos tipos de análisis de varianza (AdV) en un diseño completamente al azar: uno, para comparar diferencias florales de las seis líneas A y la viabilidad del polen de sus respectivas líneas B; así como para número y porcentaje de flores enfermas. El otro, producto de la combinación de dos factores: seis cruces A x B con dos niveles de inóculo (con y sin), para comparar las variables relacionadas con la receptividad del estigma y la producción de semilla. Las variables expresadas en porcentaje se transformaron previamente por arco seno de la raíz cuadrada del valor de la variable. La comparación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey. Se hicieron correlaciones de Pearson entre las características florales de las líneas A. Todos los análisis se hicieron con el programa SAS ver 9.1 (SAS Institute, 2002).

III.4. RESULTADOS

Características florales de las líneas

Las líneas A difirieron entre sí ($p \leq 0.01$) en todas las variables (Cuadro III.1).

Cuadro III.1. Cuadrados medios de los ANAVA para las características florales de líneas de sorgo.

Variable	Genotipo	CV	Variable	Genotipo	CV
Líneas A					
Días a antesis	69.92**	1	Densidad floral	2626.16**	9
Periodo de floración	62.63**	8	Apertura floral	7808.09**	7
Longitud del estigma	0.50**	3	Progreso de la floración	0.85**	4
Longitud de la panoja	14.83**	5			
Flores por panoja	1184953.07**	8			
Líneas B					
Viabilidad del polen	681.24**	6			

CV = coeficiente de variación (%). ** $p \leq 0.01$.

Ninguna línea superó a las demás en todas las características, pero las diferencias entre las líneas contrastantes fueron amplias; *i. e.*, 6 d para días a antesis y para la duración de la floración; 0.83 mm para longitud del estigma (equivalente a 38% del valor menor); 5.1 cm (26%) para longitud de panoja; 1154 flores por panoja (94%); 55 flores cm^{-1} de panoja (94%); 101 flores por día de floración (124%); y 0.85 cm d^{-1} (67%) de progreso de la floración (Cuadro III.2).

Las líneas B también presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para viabilidad del polen, la cual osciló entre 66% (B5) y 83% (B6) (Cuadro III.2). Las líneas más tardías tendieron a producir panojas con más flores ($r = 0.67^*$) y con mayor densidad floral ($r = 0.72^*$); las de estigmas más largos fueron los de panoja más corta ($r = -0.61^*$). La apertura floral (flores por día de floración) correlacionó con longitud de panoja ($r = 0.62^*$),

Cuadro III.2. Promedios de características florales de líneas de sorgo.

G	DA (d)	PFL (d)	LEg (mm)	LP (cm)	FP (flores)	DF (flores cm ⁻¹)	AF (flores d ⁻¹)	PRF (cm d ⁻¹)	VP (%)
A1	94.1 b	11.6 b	2.16 c	24.4 a	2107 b	86.5 b	181.6 a	2.10 a	70.6 b
A2	95.2 ab	15.3 a	2.99 a	19.3 b	1988 b	103.6 a	129.9 c	1.26 b	72.9 b
A3	91.6 c	9.9 c	2.24 bc	20.9 b	1344 c	64.1 c	135.7 bc	2.11 a	70.8 b
A5	96.0 a	16.0 a	2.39 b	20.3 b	1340 c	66.0 c	83.7 d	1.27 b	65.9 c
A6	90.4 c	15.1 a	2.20 c	20.8 b	1222 c	58.8 c	80.9 d	1.37 b	82.6 a
A9	96.7 a	15.4 a	2.17 c	20.8 b	2376 a	114.0 a	154.3 b	1.35 b	71.6 b
\bar{X}	94.0	13.9	2.35	21.0	1730	82.2	127.7	1.57	72.4
DMS	1.8	1.4	0.14	1.9	267.1	13.8	18.8	0.13	2.4

G = genotipo; DA= días a antesis; PFL = periodo de floración; LEg= longitud del estigma; LP = longitud de panoja; FP = flores por panoja; DF= densidad floral; AF = apertura floral; PRF = progreso de la floración; VP = viabilidad del polen de las líneas B respectivas. Valores con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p = 0.05).

flores por panoja ($r = 0.79^*$) y densidad floral ($r = 0.62^*$), mientras que el progreso de la floración se asoció con periodo de floración ($r = 0.97^{**}$), longitud de panoja ($r = 0.72^*$) y apertura floral ($r = 0.60^*$) (Cuadro III.3). En este experimento, el número de flores enfermas se asoció de manera positiva y significativa con los días a antesis ($r = 0.72^*$) y periodo de floración ($r = 0.74^*$), y de forma negativa con el progreso de la floración ($r = -0.63^*$); pero al calcular las correlaciones con el porcentaje de flores enfermas, las asociaciones fueron negativas con el número de flores ($r = -0.79^*$), densidad floral ($r = -0.88^*$) y apertura floral ($r = -0.88^*$) (Cuadro III.3).

Los valores promedio durante los 30 d previos a la floración fueron: temperatura mínima, 5.8 °C; máxima, 29.8 °C; humedad relativa máxima, 99%, y mínima, 39%. Los valores respectivos durante el periodo de floración fueron 6.8 °C, 30.7 °C, 99% y 48%.

Cuadro III.3. Matriz de correlaciones entre características florales y flores enfermas de seis líneas A de sorgo.

	PFL	LEg	LP	FP	DF	AF	PRF	FE	PFE
DA	0.48	0.29	-0.12	0.67*	0.72*	0.28	-0.40	0.72*	-0.17
PFL		0.35	-0.54	0.09	0.27	-0.53	-0.97**	0.74*	-0.38
LEg			-0.61*	0.10	0.32	-0.14	-0.47	-0.07	-0.14
LP				0.30	-0.05	0.62*	0.72*	-0.14	-0.28
FP					-0.95**	0.79*	-0.01	-0.17	-0.79*
DF						0.62*	-0.24	0.20	-0.74*
AF							0.60*	-0.28	-0.88*
PRF								-0.63*	-0.38
FE									0.47

DA = días a antesis; PFL = periodo de floración; LEg = longitud del estigma; LP = longitud de la panoja; FP = flores por panoja; DF = densidad floral; AF = apertura floral; PRF = progreso de la floración; FE = flores enfermas; PFE = porcentaje de flores enfermas. *, ** = $p \leq 0.05$ y 0.01 , respectivamente.

Receptividad del estigma y producción de semilla

En la receptividad del estigma hubo diferencias significativas entre genotipos ($p \leq 0.05$), medida como cantidad de granos de polen en el estigma (GPEg) y tubos polínicos en estigma (TPEg) y estilo (TPEt). La inoculación tuvo efecto significativo en las cinco variables relacionadas con la receptividad del estigma, pero la interacción genotipo por inoculación fue significativa sólo para GPEg y TPEg (Cuadro III.4). Para rendimiento de semillas por panoja, sus componentes (semillas por panoja y peso de 100 semillas) y número de flores enfermas por panoja, hubo diferencias significativas por efecto de genotipos, inoculación y su interacción.

En promedio de cruzas, el efecto negativo de la infección del hongo en todas las variables de receptividad del estigma y de producción de semilla fue evidente (Cuadro III.5), con reducciones que variaron de 14% (peso de 100 semillas) a 47% (tubos polínicos

Cuadro III.4. Cuadrados medios y significancia del ANAVA entre cruzas A x B de sorgo para receptividad del estigma y producción de semilla.

Variable	G	I	G x I	CV
Polen en el estigma	762.15**	3768.33**	413.04**	50
Tubos polínicos en el estigma	262.11**	1118.01**	143.41**	62
Tubos polínicos en el estilo	16.24**	29.40**	3.73 ns	63
Tubos polínicos en el ovario	2.54 ns	57.03**	2.04 ns	91
Pistilos fecundados	177.50 ns	4004.16**	144.16 ns	13
Rendimiento	18.73**	266.52**	3.29**	12
Peso de 100 semillas	0.58**	1.36**	0.16**	6
Semillas por panoja	11543.56**	319375.10**	12176.71**	12
Flores enfermas	4875.49**	na	na	20
Porcentaje de flores enfermas	71.26**	na	na	24

G = genotipo (cruzas A x B); I = inoculación (inoculado y sin inocular); G x I = interacción genotipo por inoculación; CV = coeficiente de variación (%); na = no aplica pues en los testigos sin inocular la variables presentaron valores de cero. ** = $p \leq 0.01$.

en el estigma) respecto al testigo sin inocular. Aunque el número de granos adheridos al estigma se redujo casi a la mitad por efecto del patógeno, el porcentaje de germinación del polen en el estigma (TPEg/GPEg) fue similar al del testigo sin inocular (51 vs. 52%). El hongo causó un decremento promedio de 40% en rendimiento de semilla por panoja, como resultado de 14% de disminución en peso de semilla y 29% en número de semillas.

Los genotipos de sorgo respondieron de manera diferencial a la inoculación de *C. africana*, en variables registradas desde etapas tempranas después de la polinización hasta las relacionadas con la producción de semilla. La interacción G x I fue significativa ($p \leq 0.05$) para número de granos de polen adheridos (GPEg) y germinados en el estigma (TPEg); sin embargo, cuando el tubo polínico alcanzó las partes más internas del pistilo (TPEt y TPOv) ya no hubo efecto significativo de la interacción (Cuadro III.4). El efecto negativo de *C. africana* en las etapas iniciales fue mayor ($p \leq 0.05$) en las cruzas A2 x B2 y A9 x B9, cuyos valores de GPEg y TPEg equivalieron a reducciones de 62 a 67% de los

Cuadro III.5. Comparación de medias para la interacción entre genotipo e infección artificial de *C. africana* en seis cruzas A x B de sorgo.

Cruza	GPEg	TPEg	TPEt†	TPOv†	PF†	RSP	P100S	SP	FE	PFE
Con inóculo										
A1xB1	7.4 de (45)	4.2 cd (35)	2.3 (15)	1.2 (45)	60 (33)	6.2 de (44)	1.606 de (17)	385 cd (32)	185 ab	9 c
A2xB2	5.3 e (67)	2.8 d (65)	1.6 (38)	0.7 (67)	50 (37)	6.6 de (37)	1.782 cd (9)	371 dc (30)	181 ab	9 c
A3xB3	10.1 cde (11)	5.6 cd (8)	2.7 (10)	1.1 (39)	70 (21)	6.0 de (31)	1.387 e (30)	429 c (3)	154 b	11 bc
A5xB5	10.5 cde (22)	5.0 cd (18)	2.9 (9)	1.3 (19)	65 (23)	5.7 e (38)	1.939 bc (0)	297 d (37)	241 a	18 a
A6xB6	13.5 cd (35)	5.5 cd (54)	2.9 (9)	1.3 (50)	80 (11)	6.2 de (43)	1.966 bc (5)	310 d (40)	183 ab	15 ab
A9xB9	11.3 cde (63)	6.4 cd (62)	3.0 (39)	1.3 (52)	55 (45)	8.2 cd (44)	2.055 b (23)	397 cd (25)	220 ab	9 c
\bar{X}	9.7 B (45)	4.9 B (47)	2.6 B (21)	1.2 B (43)	63 B (29)	6.4 B (40)	1.789 B (14)	365 B (29)	194	12
Sin inóculo										
A1xB1	13.4 cd	6.5 cd	2.7	2.2	90	11.0 b	1.938 bc	570 a	0	0
A2xB2	16.2 bc	7.9 bc	2.6	2.1	80	10.4 b	1.957 bc	532 ab	0	0
A3xB3	11.3 cde	6.1 cd	3.0	1.8	90	8.7 cd	1.966 bc	442 bc	0	0
A5xB5	13.5 cd	6.1 cd	3.2	1.6	85	9.2 bc	1.934 bc	473 abc	0	0
A6xB6	20.9 b	11.9 b	3.2	2.6	90	10.8 b	2.071 b	518 ab	0	0
A9xB9	30.4 a	16.9 a	4.9	2.7	100	14.7 a	2.678 a	529ab	0	0
\bar{X}	17.6 A	9.2 A	3.3 A	2.1 A	89 A	10.7 A	2.091 A	511 A	0	0
DMS (GxI)	7.2	4.6	1.9	1.5	39	2.2	0.26	117	na	Na
DMS (I)	1.7	1.10	0.47	0.38	9	0.54	0.063	28	na	Na

GPEg = granos de polen en el estigma; TPEg, TPEt y TPOv = tubos polínicos en estigma, estilo y ovario; PF = pistilos fecundados 18 h después de la polinización (%); RSP = rendimiento de semilla por panoja (g); P100S = peso de 100 semillas (g), SP = semillas por panoja, FE = flores enfermas; PFE = porcentaje de flores enfermas, respecto a las flores por panoja. Valores dentro de paréntesis corresponden a porcentajes respecto al testigo sin inoculación. Valores con letra minúscula distinta en una columna son estadísticamente diferentes para la interacción genotipo x inoculación (G x I). Valores con letra mayúscula distinta en una columna son estadísticamente diferentes para el efecto de la inoculación (I). † Variables sin efecto significativo de la interacción G x I. na = no aplica pues en los testigos sin inocular la variables presentaron valores de cero. (Tukey, p = 0.05).

testigos respectivos (sin ergot), que en la cruza A3 x B3 donde la incidencia del patógeno redujo a esas variables en sólo 8 y 11%. En cuanto al rendimiento y sus componentes, el hongo ocasionó reducciones del rendimiento del orden de 31% (A3 x B3) a 44% (A1 x B1, A6 x B6 y A9 x B9) respecto a los testigos sin inóculo, pérdidas que se asocian más con las registradas en número de semillas por panoja (3 a 40%) que en peso de semilla (0 a 30%). El número de flores enfermas fue mayor en las cruzas A5 x B5 y A9 x B9 (230 en promedio) y menor en A3 x B3 (154); sin embargo, el porcentaje de flores enfermas osciló entre 9 y 18%.

A diferencia de lo que ocurrió en las características florales de las líneas A, donde ninguna mostró superioridad en todos los caracteres (Cuadro III.2), la cruza A9 x B9 ocupó el grupo superior ($p < 0.05$) en la mayoría de las variables, tanto en plantas tratadas como en testigo; mientras que A3 x B3 destacó por presentar menores reducciones en presencia del patógeno (Cuadro III.5).

Durante el proceso infectivo, la masa de hifas sustituyó a la semilla aunque no siempre formó esclerocios maduros. A la cosecha (aproximadamente 60 d después de la inoculación) se observó que los esclerocios están constituidos por la estructura esponjosa del esfacelio y no hay diferenciación del tejido esclerótico cerca de la base (Figura III.1). Algunas florecillas infectadas con micelio fueron colonizadas por hongos saprófitos, como *Cerebella* sp. (Figura III.1B) que impidieron el desarrollo del esclerocio (Figura III.1C) a la cosecha. En el tejido esfacélico se observó formación de conidios, lo que evidencia que ese tejido infectado constituye una fuente de inóculo (Figura III.1D).

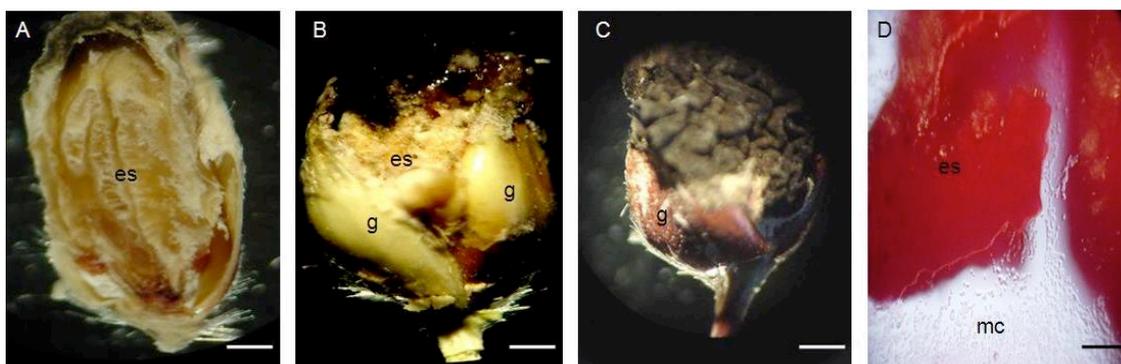


Figura III.1. Esclerocio de de *C. africana*. (A) Corte longitudinal en fresco de un esclerocio a la cosecha; (B) después de la inoculación los hongos saprófitos empiezan a colonizar la masa micelial e impiden la formación del esclerocio a la cosecha (C); y (D) segmento de la estructura interna del esclerocio donde se observan los conidios liberados. es = esfacelio; (g) = gluma; mc = macroconidios. Barras de A, B y C = 4 mm; barra de D = 20 μ m.

III.5. DISCUSIÓN

Características florales de las líneas A

Como se esperaba, durante el proceso de derivación de los nuevos pares de líneas A y B adaptadas a los Valles Altos de México (tolerantes al frío) se logró seleccionar genotipos de características florales y de precocidad contrastantes, lo que demuestra la ausencia de ligamiento genético entre estos caracteres. La precocidad, la corta duración de la floración (Dahlberg *et al.*, 2001; Hernández-Martínez *et al.*, 2002; Mendoza-Onofre *et al.*, 2006) y los estigmas cortos son características que se han asociado con una menor incidencia y severidad del ergot (Dahlberg *et al.*, 2001) o como opciones de escape a la infección (McLaren, 2002), características que la línea A3 satisface (Cuadro III.2). En el presente estudio, las correlaciones entre longitud del estigma *vs.* días a antesis y duración de la floración en estas líneas A fueron de baja magnitud y no significativas. No obstante, las características del estigma son de interés porque en este órgano se inicia la infección de *C. africana* (Frederickson y Mantle, 1988; Bandyopadhyay, 1998).

La variación registrada en la densidad citoplásmica de las líneas B, de 66 a 86%, está dentro del rango de respuestas de este tipo de líneas observadas en ambientes templados con frío nocturno (≤ 12 °C) (Osuna-Ortega *et al.*, 2003).

Características florales y severidad de la enfermedad

Mendoza-Onofre *et al.* (2006) observaron que la línea A LIVA X (línea A1 del presente estudio), evaluada en México a 1560 msnm, presentó mayor apertura floral y progreso de la floración, y menor incidencia de *C. africana* que las líneas ATx 630 y ATx 631, introducidas de los EE.UU. En el presente estudio, al comparar un mayor número de líneas androestériles tolerantes al frío en condiciones de polinización e inoculación controladas, en las que el tiempo de exposición ocurrió sólo en una ocasión ante una alta densidad de inóculo (1×10^{-6}) (Komolong *et al.*, 2003), se confirma que las líneas más precoces, con más corto periodo de floración y con mayor longitud florecida por día presentan menos flores enfermas (Cuadro III.3). En cambio, al analizar el porcentaje de flores enfermas, que estandariza la variable en función del total de flores de la panoja, resulta que las líneas más sanas corresponden a las que producen más flores, con mayor densidad y apertura floral, quizás debido al efecto de dilución de la enfermedad, o sea, que existe más tejido que inóculo (Campbell y Madden, 1990). Esto significa que número y porcentaje de flores enfermas son criterios diferentes y complementarios para calificar la severidad del patógeno, cuyo valor específico depende de las características florales de la panoja. Por otra parte, en promedio de las seis cruzas hubo 194 flores infectadas (Cuadro III.5), equivalente a 11% del total de flores (1729), que corresponde al Grado 3 de severidad (11 a 25% de flores enfermas por panícula) de la escala propuesta por Tegegne *et al.* (1994). Este nivel de daño puede considerarse moderado a pesar de que la evaluación se hizo a la cosecha cuando el hongo saprófito *Cerebella* sp. ya había colonizado el tejido

esfacélico (Figura III.1B, C) y las panojas habían permanecido embolsadas, lo que aumenta la severidad de la infección. La línea A3 destacó como la más precoz, la de menor duración de la floración y el mayor progreso de la misma (Cuadro III.2) con el menor número de flores enfermas (Cuadro III.5).

La longitud del estigma no se asoció con el número de flores enfermas (Cuadro III.3), posiblemente debido a que en inoculaciones artificiales y con dosis altas de inóculo su importancia relativa es menor a la que ocurre en condiciones naturales. Al respecto, Dahlberg *et al.* (2001) observaron que los estigmas de las líneas fértiles (B y R) de sorgo resistentes a *C. africana* son cortos (1 a 3 mm) y de rápida desecación después de ser polinizados. En el presente caso, la longitud de los estigmas de la línea A9 (cuya cruza A9 x B9 fue la de mayor rendimiento, con sólo 9% de flores enfermas) fue 2.17 mm (inferior en 8% al promedio del grupo y en 28% respecto a la línea de estigmas más largos). En cuanto a la velocidad de desecación, es probable que las temperaturas mínimas promedio de 6.8 °C y HR máximas entre 90 y 100%, favorezcan que los estigmas tarden en desecarse en esta región. Por tanto, en los Valles Altos Centrales de México, los estigmas cortos, periodo corto de floración y rápido progreso de la floración pueden estar involucrados en una menor severidad de la enfermedad.

Efecto del ergot en la receptividad del estigma y producción de semilla

C. africana redujo la adhesión del polen al estigma y su germinación, así como la elongación del tubo polínico, porcentaje de pistilos fecundados, rendimiento de semilla por panoja y sus componentes (Cuadro III.5). El número de flores enfermas es un indicador de la severidad por el tipo de patogénesis de *Claviceps* spp. (Frederickson y Mantle, 1988; Tegegne *et al.*, 1994; Hernández-Martínez *et al.*, 2001). Aunque la severidad promedio de las líneas fue 11%, que equivale a un daño moderado, la reducción promedio de 40% en el

rendimiento (29% en número de semillas y 14% en tamaño de las mismas) indica que el daño fue severo, discrepancia que resalta la necesidad de conjuntar los criterios agronómicos con los fitopatológicos para evaluar la tolerancia o resistencia a este patógeno. Como en el presente experimento la inoculación se hizo inmediatamente después de la polinización, se esperaba que las reducciones en el rendimiento y en sus componentes fueran menores, pues según Frederickson *et al.* (1991), Hernández-Martínez *et al.* (2001) y Hodnett *et al.* (2005) el tiempo requerido para fecundar del óvulo es menor que para su infección. Esto también plantea la necesidad de evaluar con mayor precisión los diferenciales de tiempo entre polinización e inoculación, así como la competencia entre el grano de polen y la espora por fecundar o infectar el ovario.

La presencia de *C. africana* disminuyó la receptividad estigmática (adhesión y germinación del grano de polen, crecimiento del tubo polínico, fecundación del ovario) ya que sus hifas se ramifican por todo el estigma, estilo y ovario (Hernández-Martínez *et al.*, 2001). Aún así, algunos tubos polínicos llegaron al ovario a un grado tal que el número de semillas sólo se redujo en 29% en promedio (Cuadro III.5) sin que la interacción G x I haya sido significativa para el número de tubos polínicos en el ovario ni para el porcentaje de pistilos fecundados.

La respuesta diferencial en el rendimiento y sus componentes entre las cruzas según esté o no presente el hongo (Cuadro III.5) se ejemplifica con A9 x B9, que en presencia de un alto potencial de inóculo tuvo 9% de flores enfermas y aunque redujo en 44% su rendimiento, éste fue superior a cualquier otra, incluso a A1 x B1, la cual tuvo el mismo nivel de severidad y reducción en el rendimiento. La craza A3 x B3 presentó la menor reducción del rendimiento (31%) lo que significaría que es la más tolerante al patógeno, pero no la más rendidora pues A9 x B9 la superó en 37%. La craza A3 x B3 tuvo la mayor

adhesión y germinación de polen en el estigma y aunque su línea A desarrolló 43% menos flores que la línea A9, lo que explicaría el menor rendimiento, su porcentaje de flores enfermas fue el menor del grupo, lo que concuerda con las características relacionadas de posibles escapes a la enfermedad discutidas en párrafos previos. Esto ratifica la necesidad de precisar los criterios para definir tolerancia al ergot, o a cualquier factor adverso de interés agronómico.

Con temperaturas mínimas 30 d antes y durante la floración que variaron entre 3 y 12 °C, las líneas B presentaron entre 66 y 83% de polen viable; además, fueron buenas productoras de polen (Capítulo I de esta tesis). En híbridos comerciales sanos evaluados en invernadero se encontró que con valores de viabilidad inferiores de 80% el número máximo de semillas fue 400 (Wood *et al.*, 2006). En el presente estudio, las líneas B tuvieron en promedio 72% de polen viable, y en los testigos sin inocular las cruzas produjeron 498 semillas por panoja e incluso, cuando los genotipos estuvieron infectados por el hongo, el número de semillas fue 365; es decir, la viabilidad del polen no fue un factor restrictivo para la producción de semilla en este caso. Sin embargo, aún se desconoce la cantidad de polen viable necesaria para lograr una polinización y fertilización 100% exitosa (Ryley *et al.*, 2002). Posiblemente la viabilidad del polen sea un factor más crítico cuando la polinización es manual que en polinización libre en la que los estigmas están expuestos al flujo continuo de polen (Bassetti y Westgate, 1993).

Las bajas temperaturas (<12 °C) pueden causar esterilidad masculina (Osuna-Ortega *et al.*, 2003) o reducir la compatibilidad entre las cruzas (McLaren, 1999). En estudios histológicos efectuados en este mismo grupo de líneas tolerantes al frío se ha observado la presencia de ovarios vacíos y fallas en la formación de semilla después de la polinización (Capítulo I de esta tesis), lo que también explicaría las reducciones en rendimiento de

semilla. Las bajas temperaturas pre y post-antesis pueden influir en el desarrollo de la enfermedad, pues en este experimento el exudado de las florecillas infectadas se presentó 15 d después de la inoculación, 5 d más tarde que en El Bajío (1560 msnm) (Hernández-Martínez *et al.*, 2001).

Además, la alta humedad relativa ($\geq 90\%$) que prevalece en los Valles Altos Centrales de México durante la etapa post-antesis, posiblemente afectó la escasa producción de esclerocios, ya que en el muestreo efectuado a la cosecha solamente se detectó tejido esfacélico (Figura III.1A), quizás debido a la colonización del exudado por hongos saprófitos (Figura III.1B, C) (Bandyopadhyay *et al.*, 1990). El tejido esfacélico, sin embargo, constituye una fuente de inóculo (Figura 1D) y diseminación del patógeno (Soltero-Díaz y Williams-Alanís, 2003), cuya repercusión epidémica dependerá de la longitud del periodo de floración y de las condiciones climáticas inductivas.

III.6. CONCLUSIONES

En todas las variables morfológicas y fenológicas hubo diferencias significativas entre las líneas A, pero ninguna línea superó a las demás en todas esas variables, lo que permitiría reunir todas las características deseables en una línea mediante mejoramiento genético. La línea A3 fue la más precoz, con el periodo de floración más corto y el mayor progreso de la floración; la línea A9 fue la más tardía, con los estigmas más cortos y la mayor cantidad de flores. En las líneas B hubo diferencias significativas para la viabilidad del polen con valores entre 66 y 89%. *Claviceps africana* afectó la receptividad del estigma, el rendimiento de semilla y sus componentes. La cruza A9 x B9 destacó por su mayor producción de semilla, incluso en presencia del hongo. La cruza A3 x B3 presentó el menor número de flores enfermas.

III.7. LITERATURA CITADA

- Aguirre, R. J., A. H. Williams, G. N. Montes, and H. M. Cortinas. 1997. First report of sorghum ergot caused by *Sphacelia sorghi* in Mexico. *Plant Dis.* 81: 31.
- Bandyopadhyay, R., L. K. Mughogho, S. K. Manohar, and M. V. Satyanarayana. 1990. Stroma development, honeydew formation, and conidial production in *Claviceps sorghui*. *Phytopatol.* 80: 812-818.
- Bandyopadhyay, R., D. E. Frederickson, N. W. McLaren, G. N. Odvody, and M. J. Ryley. 1998. Ergot: A new disease threat to sorghum, in the Americas and Australia. *Plant Dis.* 82: 356-367.
- Bassetti, P., and M. E. Westgate. 1993. Senescence and receptivity of maize silks. *Crop Sci.* 33: 275-278.
- Brooking, I. R. 1976. Male sterility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench induced by low night temperature. I. Timing of the stage of sensitivity. *Aust. J. Plant Physiol.* 3: 589-596.
- Campbell, C. L., and L. W. Madden. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology.* J. Wiley and Sons, Inc. New York. USA. p. 190.
- Cisneros-López, M. E., L. E. Mendoza-Onofre, H. A. Zavaleta-Mancera, G. Mora-Aguilera, L. Córdova-Téllez, V. A. González-Hernández y M. Hernández-Martínez. 2006. Viabilidad y germinación del grano de polen en líneas de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). Soc. Mex. de Histología (Ed). *Memorias XXX Congreso Nacional de Histología.* UAM. México, D. F. p. 66.
- Dahlberg, J. A., R. Bandyopadhyay, W. L. Rooney, G. N. Odvody, and P. Madera-Torres. 2001. Evaluation of sorghum germplasm used in US breeding programs for sources of sugary disease resistance. *Plant Pathol.* 50: 681-689.
- Frederickson, D. E., and P. G. Mantle. 1988. The path of infection of sorghum by *Claviceps sorghi*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33: 221-234.
- Frederickson, D. E., P. G. Mantle, and W. A. J. de Milliano. 1991. Windborne spread of ergot disease (*Claviceps africana*) in sorghum A-lines in Zimbabwe. *Plant Pathol.* 42: 368-377.
- Frederickson, D. E., G. N. Odvody, N. Montes y T. Isakeit. 1999. El ergot del sorgo. Diferenciación de los esfacelios y esclerocios de *Claviceps africana* en la semilla. Servicio de Extensión Agrícola de Texas. USA. pp: 1-6.

- Hernández-Martínez, M., E. Cárdenas-Soriano, L. E. Mendoza-Onofre, S. Osada-Kawasoe, P. Ramírez-Vallejo, and F. Zavala-García. 2001. Pathogenesis of *Claviceps africana* in sorghum ovaries. *Agrociencia* 35: 535-542.
- Hernández-Martínez, M., L. E. Mendoza-Onofre, P. Ramírez-Vallejo, S. Osada-Kawasoe, E. Cárdenas-Soriano, and F. Zavala-García. 2002. Response of sorghum B and R lines to ergot (*Claviceps africana*) at Celaya, Guanajuato, México. *In: Sorghum and Millets Diseases*. Leslie, J. F. (ed). Iowa State Press. USA. pp: 83-85.
- Hodnett, G. L., B. L. Burson, W. L. Rooney, S. L. Dillon, and H. J. Price. 2005. Pollen-pistil interactions result in reproductive isolation between *Sorghum bicolor* and divergent Sorghum species. *Crop Sci.* 45: 1403-1409.
- Komolong, B., S. Chakroborty, M. Ryley, and D. Yates. 2003. Ovary colonization by *Claviceps africana* is related to ergot resistance in male-sterile sorghum lines. *Plant Pathol.* 52: 620-627.
- McLaren, N. W. 1997. Changes in pollen viability and concomitant increase in the incidence of sorghum ergot with flowering date and implications in selection for escape resistance. *J. Phytopathol.* 145: 261-265.
- McLaren, N. W. 1999. Host x pathogen x environment interaction in sorghum ergot disease. *In: Global Conference on Ergot of Sorghum*. Brasil Sete Lagoas. June 1-8. pp: 122-134.
- McLaren, N. W. 2002. Genotype x environment effects on the response of sorghum to ergot and repercussions for disease screening. *In: Sorghum and Millets Diseases*. Leslie, J. F. (ed). Iowa State Press. USA. pp: 95-101.
- McLaren, N. W., and F. C. Wehner. 1992. Pre-flowering low temperature predisposition of sorghum to sugary disease (*Claviceps africana*). *J. Phytopathol.* 135: 328-334.
- McLaren, N. W., and B. C. Flett. 1998. Use of weather variables to quantify sorghum ergot potential in South Africa. *Plant Dis.* 82: 26-29.
- Meinke, H., and M. Ryley. 1997. Effects of sorghum ergot on grain sorghum production: a preliminary climatic analysis. *Aust. J Agric. Res.* 48:1241-1247.
- Mendoza-Onofre L. E, M. Hernández-Martínez, E. Cárdenas-Soriano, and P. Ramírez-Vallejo. 2006. Cold-tolerant sorghum germplasm as a potential source to ergot

- (*Claviceps africana* Frederickson, Mantle & de Milliano) tolerance. *Agrociencia* 40: 593-603.
- Osuna-Ortega, J., Ma. del C. Mendoza-Castillo, and L. E. Mendoza-Onofre. 2003. Sorghum cold tolerance, pollen production, and seed yield in the Central High Valleys of Mexico. *Maydica* 48: 125-132.
- Reed, J. D., M. R. Tuinstra, N. W. McLaren, K. D. Kofoid, N. W. Ochanda, and L. E. Claflin. 2002. Analysis of combining ability for ergot resistance in grain sorghum. *Crop Sci.* 42: 1818-1823.
- Ryley, J. M., D. J. Herde, S. A. Bhuiyan, R. G. Henzell, and D. R. Jordan. 2002. An overview of biology of sorghum ergot. *In: Sorghum and Millets Diseases*. Leslie, J. F. (ed). Iowa State Press. USA. pp: 141- 150.
- Ruzin, S. E. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford Univ. Press. 316 p.
- Soltero-Díaz, L. y H. Williams-Alanis. 2003. Incidencia y severidad del cornezuelo (*Claviceps africana*, Frederickson, Mantle and de Milliano) en híbridos comerciales de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] en la Ciénega de Chapala, Jalisco, México. *Rev. Mex. Fitopat.* 21: 26-33.
- Tegegne, G., R. Bandyopadhyay, T. Mulatu, and Y. Kebede. 1994. Screening for ergot resistance in sorghum. *Plant Dis.* 78: 873-876.
- SAS. 2002. SAS/SAT. Versión 9.1. SAS Inst. Cary. NC. USA. Versión en línea <http://www.colpos.mx/servicios/sas/indexs.htm>.
- Wood, A. W., D. K. Y. Tan, E. A. Mamun, and B. G. Sutton. 2006. Sorghum can compensate for chilling-induced grain loss. *J. Agron. Crop Sci.* 192: 445-451.

CAPÍTULO IV. SINCRONÍA DE LA POLINIZACIÓN E INOCULACIÓN CON *Claviceps africana* Frederikson, Mantle & de Milliano Y SU EFECTO EN LA COMPATIBILIDAD POLEN-PISTILO Y PRODUCCIÓN DE SEMILLA DE SORGO

IV.1. RESUMEN

El ergot (*Claviceps africana*) del sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es una enfermedad que afecta el desarrollo de la semilla. La interacción entre el polen y el conidio determina si los ovarios serán fertilizados o colonizados, por lo que el tiempo de arribo al estigma es crítico. Se midió el efecto del intervalo entre la polinización e inoculación en la receptividad del estigma y la producción de semilla en la cruza A9 x B9 en Montecillo, Estado de México (2240 msnm). Al final de la antesis se aplicaron tratamientos de polinización e inoculación simultáneas y con diferencias de 2 y 4 h; los testigos fueron panojas sólo polinizadas o sólo inoculadas. A las 18 h se contó el número de granos adheridos y germinados en el estigma, tubos polínicos en estilo y ovario, y pistilos fecundados; a las 18, 48 y 72 h, los pistilos enfermos. En grano masoso y a la cosecha se registró el número de flores enfermas y semillas; además, a la cosecha se midió el rendimiento y el P100S. El patógeno redujo la receptividad del estigma; la mayor reducción (40 a 60%) ocurrió cuando el polen y el inóculo llegaron en forma simultánea, sin importar cual se depositó primero. La ruta de crecimiento del tubo polínico fue la única vía de infección. Los tratamientos primero inoculados tuvieron en promedio 60% más flores enfermas y reducciones de 36, 30 y 8% en el rendimiento, número y tamaño de la semilla, respecto a los primero polinizados.

Palabras clave: *Sorghum bicolor*, *Claviceps africana*, calosa, polen, receptividad del estigma.

IV.2. INTRODUCCIÓN

El ergot (*Claviceps africana*) del sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es una enfermedad que en un lapso de cinco años (1997 a 2002) se dispersó a todas las áreas sorgueras comerciales en México (Pecina *et al.*, 2007); incluso en estaciones experimentales ubicadas a 2200 m de altitud. Los genotipos androestériles son más susceptibles a la infección que los fértiles (Meinke y Ryley, 1997) y la floración es la etapa más vulnerable al ataque del patógeno (Reed *et al.*, 2002). En consecuencia, la sincronía de la floración para obtener semilla de líneas A (mediante cruza A x B) o semilla F1 (por medio de cruza A x R), el tiempo de arribo del polen y del conidio al estigma, así como la competencia entre la velocidad de crecimiento del tubo polínico y la velocidad de colonización de la espóra, influyen en que los ovarios sean fertilizados o resulten invadidos por las hifas del hongo (Ryley *et al.*, 2002; Mendoza-Onofre *et al.*, 2006), lo que afecta la incidencia y severidad de la enfermedad. Los factores ambientales que disminuyen la viabilidad del polen (McLaren, 1997; Musabyimana *et al.*, 1995) o provoquen problemas de compatibilidad entre polen-estigma predisponen a los genotipos fértiles de sorgo a la infección (Moran *et al.*, 2002).

Poco se conoce del efecto del proceso inoculación/polinización pues generalmente, en líneas androestériles las inoculaciones se han hecho en ausencia de polen (Moran *et al.*, 2002) o la polinización se ha aplicado días después de la inoculación; *i. e.*, un retraso de 1 a 4 d ocasionó una reducción entre 50 y 80% en el número de semillas por panoja; incluso cuando se polinizó 30 min después, el decremento fue de 37% (Mendoza-Onofre *et al.*, 2006).

En condiciones de invernadero y en ausencia de polen, la germinación de conidios puede ocurrir entre 15 a 24 h después de la inoculación (hdi) y la colonización del ovario

entre 6 y 8 d (Frederickson *et al.*, 1991). En cambio, en el Bajío de México, en condiciones de campo e inoculación artificial, el proceso infectivo se completó 24 h antes (Hernández-Martínez *et al.*, 2001). En ausencia de esporas, el tubo polínico llega a la base del ovario en sólo una hora (Hodnett *et al.*, 2005). Por lo anterior, se puede inferir que en los lotes de producción de semilla híbrida en los que la sincronía de floraciones sea perfecta o en plantas fértiles sin factores ambientales que reduzcan la proporción de polen fértil, el daño causado por el hongo debería ser mínimo o nulo en líneas cleistogámicas.

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la sincronía entre la polinización y la inoculación de *Claviceps africana* en la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico *in vivo* en pistilos de sorgo durante las primeras etapas de infección y su influencia en la producción de semilla de la cruce isogénica A9 x B9.

IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS

El 3 de abril de 2006 se sembró la línea androestéril A9 en una parcela de 16 surcos de 5 m de longitud y 0.92 m de ancho en Montecillo, Estado de México (2240 m de altitud). A los 20 d después de la siembra se aclareó a una planta cada 20 cm. La parcela útil consistió de los ocho surcos centrales, en donde al emerger la panoja se cubrieron 20 plantas por surco (160 plantas en total). Cuando las panojas terminaron de florecer (8 d después del inicio de la floración), se aplicaron ocho tratamientos: T1: testigo sólo polinizado; T2: testigo sólo inoculado; T3: inoculado e inmediatamente después polinizado; T4: polinizado e inmediatamente después inoculado; T5 y T6: inoculado y 2 ó 4 h después polinizado; T7 y T8: polinizado y 2 ó 4 h después inoculado. Cada tratamiento se aplicó a 15 plantas en un surco. La inoculación o polinización inicial fue a las 12:00 h. La inoculación consistió en aplicar 5 mL de una suspensión de 1×10^6 conidios mL⁻¹ (Reed *et al.*, 2002), cuya cepa provino de plantas enfermas de un lote cercano. La polinización se

hizo en una sola ocasión con abundante polen de su línea isogénica, y las panojas se mantuvieron embolsadas hasta la cosecha (5 de octubre).

Receptividad del estigma. La germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico *in vivo* se midió 18 h después de la aplicación de los tratamientos (hdat). En tres plantas por tratamiento se cortó una ramilla central de la panoja, se fijó en Farmer (75% alcohol etílico, 25% ácido acético) (Hodnett *et al.*, 2005) y se procesó con la técnica de azul de anilina y “aplastado” para su observación al microscopio (Cisneros-López *et al.*, 2006). En 39 pistilos completos/planta/tratamiento se midieron las siguientes variables: número de granos de polen adheridos al estigma (GPEg), tubos polínicos en estigma (TPEg), estilo (TPEt) y ovario (TPOv), y pistilos fecundados (PF, con al menos un tubo polínico en la base del ovario). Las muestras se observaron con un microscopio de luz (Zeiss AXioskop 2 plus®) y epifluorescencia con un filtro UV (excitación, 365 nm; emisión, 397 nm). Las fotografías se tomaron con una cámara AxionCam MRC5 y el procesador de imágenes AxionVision 4.4®.

Incidencia, severidad e histopatología. En las plantas anteriores se tomó otra ramilla de la parte media de la panoja y a 13 pistilos (de características uniformes y que tenían cantidad similar de inóculo expuesto) por rama/planta/tratamiento se les aplicó la técnica de azul de anilina arriba citada, y se contaron los pistilos enfermos que presentaban alguna expresión del patógeno (esporas germinadas, crecimiento del micelio o necrosis del tejido) a las 18, 48 y 72 hdat. Esta variable se expresó en porcentaje (PPE). Además, para observar el efecto histológico de la infección, se tomaron seis pistilos de los tratamientos T1, T2 y T3 de los muestreos anteriores, se fijaron en Farmer, se deshidrataron en una serie de alcohol isopropílico a xileno, y se incluyeron en parafina para obtener cortes longitudinales y transversales de 10 µm con un micrótopo rotatorio (American Optical

Company® Mod. 820 Spencer). Las preparaciones se tiñeron con azul de anilina 1% en amortiguador de fosfatos pH 7.4, se incubaron en el colorante por 20 h en oscuridad a 7 °C; y se montaron en el colorante (Westgate y Boyer, 1986). La severidad en campo se determinó en la etapa de grano masoso (44 d después de la aplicación de los tratamientos, ddat) en cinco panojas, y a la cosecha en siete panojas; en ambos casos se contaron las flores enfermas (FEGM y FEC, respectivamente), que presentaban glumas con mielecilla, esfacelio o con al menos un esclerocio. Se hicieron dos muestreos pues desde el punto de vista fitopatológico la etapa de grano masoso es la más apropiada para evaluar los daños directos causados por el patógeno, ya que después de esa etapa proliferan hongos saprófitos (Bandyopadhyay *et al.*, 1998; McLaren, 1999); sin embargo, agronómicamente el muestreo a la cosecha es indispensable para evaluar el rendimiento y sus componentes.

Producción de semilla. En ambos muestreos post-antesis se contó el número de semillas por panoja (SPGM y SPC, respectivamente), pero solamente en el muestreo a la cosecha se midió el rendimiento de semilla por panoja (RSP) y el peso de 100 semillas (P100S).

Análisis estadístico. Se hicieron dos análisis de varianza independientes con base en un diseño de tratamientos completamente al azar; uno, para los que fueron primero inoculados (T3, T5 y T6), y otro para los que fueron primero polinizados (T4, T7 y T8); en ambos grupos se incorporó a T1 (sólo polinizado) como testigo para las variables: germinación del polen, crecimiento del tubo polínico, pistilos fecundados, número de semillas en grano masoso y a la cosecha, rendimiento y peso de 100 semillas. También se aplicó un análisis de varianza factorial (4x3) de dos factores: tratamientos y muestreos posteriores a la aplicación de éstos (hdat), en los que se agregó T2, el testigo sólo inoculado, a cada grupo de tratamientos, para porcentaje de pistilos enfermos y para flores

enfermas en los dos muestreos post-antesis. La comparación de medias de estas pruebas fue mediante Tukey ($p = 0.05$). Además, se hicieron contrastes entre los dos grupos de tratamientos mediante la prueba t de Student. Previo al análisis, las variables expresadas en porcentaje se transformaron por arcoseno $[Y_i]^{1/2}$. El programa utilizado fue SAS versión 9.1 (SAS, 2002).

IV.4. RESULTADOS

Receptividad del estigma

En los dos grupos de tratamientos hubo diferencias significativas ($p \leq 0.01$) en la germinación y crecimiento del tubo polínico y en el porcentaje de pistilos fecundados (Cuadro IV.1).

Cuadro IV.1. Cuadrados medios del análisis de varianza para germinación del polen, crecimiento del tubo polínico y pistilos fecundados de los dos grupos de tratamientos.

Variable	Tratamientos primero inoculados (T1, T3, T5, T6)		Tratamientos primero polinizados (T1, T4, T7, T8)	
	CM	CV	CM	CV
Granos de polen en estigma	1307.18**	60	1218.90**	51
Tubos polínicos en estigma	883.05**	86	629.08**	83
Tubos polínicos en estilo	192.03**	89	115.25**	83
Tubos polínicos en ovario	54.70**	94	45.53**	98
Pistilos fecundados	168.75**	14	132.97**	13

T1 = testigo sólo polinizado; T3, T5 y T6: = inoculado y polinizado inmediatamente, ó 2 ó 4 h después; T4, T7 y T8 = polinizado e inoculado inmediatamente ó 2 ó 4 h después; CV = coeficiente de variación (%). ** = $p \leq 0.01$

El hongo redujo la expresión de todas las variables en magnitudes que variaron de 1 a 70%. En el grupo de tratamientos que primero fueron polinizados y luego inoculados (T4, T7 y T8) se observó que cuando se inoculó más cerca de la polinización, el efecto negativo del hongo fue mayor (Cuadro IV.2) 1B); *i. e.*, cuando la inoculación fue inmediatamente después de la polinización (T4), la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico

se redujeron 45% en promedio, y los pistilos fecundados en 40%, respecto al testigo sólo polinizado (T1). En el grupo de tratamientos primero inoculados (T3, T5 y T6), los mayores daños debidos a la inoculación del hongo también se observaron cuando se hizo inmediatamente después de la polinización; *i. e.*, en el tratamiento T3, primero inoculado e inmediatamente polinizado, la reducción fue en promedio de 62% tanto para la germinación del polen como para el crecimiento del tubo polínico, y de 52% para pistilos fecundados (Cuadro IV.2).

Cuadro IV.2. Comparación de medias para las variables relacionadas con la receptividad del estigma entre el grupo de tratamientos primero inoculados y los correspondientes a primero polinizados.

Variable	Tratamientos primero inoculados					Tratamientos primero polinizados				
	T1	T3	T5	T6	MDS	T1	T4	T7	T8	MDS
GPEg	18.0 a	10.3 c	14.0 b	11.9 bc	2.7	18.0 a	11.2 c	14.8 b	17.9 a	2.6
TPEg	8.6 a	2.5 c	7.0 a	4.3 b	1.6	8.6 a	3.7 b	8.0 a	8.2 a	2.0
TPEt	4.1 a	1.5 c	3.0 b	1.6 c	0.7	4.1 a	1.8b	3.4 a	3.5 a	0.9
TPOv	2.1 a	0.6 c	1.1 b	0.8 bc	0.4	2.1 a	0.7 c	1.3 b	1.7 ab	0.4
PF	35.0 a	16.7 b	25.0 b	25.0 b	9.3	35.0 a	19.3 b	30.0 a	31.0 a	9.6

T1 = Testigo sólo polinizado; T3, T5 y T6: = inoculado y polinizado inmediatamente, ó 2 ó 4 h después; T4, T7 y T8 = polinizado e inoculado inmediatamente ó 2 ó 4 h después. GPEg = granos de polen en el estigma; TPEg, TPEt, TPOv = tubos polínicos en estigma, estilo y ovario; y PF = pistilos fecundados. Valores con letra distinta en la misma variable y grupo de tratamientos son estadísticamente diferentes (Tukey, $p = 0.05$).

Al contrastar estadísticamente los dos grupos (T3, T5 y T6 *vs.* T4, T7 y T8) se encontró que el efecto de la inoculación con el hongo fue 25% más severa ($p = 0.05$) cuando se inoculó antes de polinizar que cuando la inoculación fue después de polinizar, en promedio de las cinco variables medidas.

Incidencia, severidad e histopatología

Se detectó efecto de tratamientos (T) en el porcentaje de pistilos enfermos ($p \leq 0.05$), pero no del tiempo de muestreo (H) ni de la interacción T x H (Cuadro IV.3), por lo que en el Cuadro IV.4 se presenta la comparación de medias de los tres tiempos de muestreo.

Cuadro IV.3. Cuadrados medios de los análisis de varianza para porcentaje de pistilos enfermos.

Tratamientos primero inoculados				Tratamientos primero polinizados			
T	H	T x H	CV	T	H	T x H	CV
1913.3**	169.3 ns	50.9 ns	23	3701.8 **	182.5 ns	37.8 ns	25

T = tratamientos; H = 18, 48 y 72 h después de la aplicación de los tratamientos; T x H = interacción tratamientos por horas. CV = coeficiente de variación (%). ** = $p \leq 0.01$.

Cuadro IV.4. Comparación de medias entre tratamientos para pistilos infectados en sorgo.

Tratamientos primero inoculados					Tratamientos primero polinizados				
T2	T3	T5	T6	MDS	T2	T4	T7	T8	MDS
59.8 a	53.0 a	31.6 b	31.6 b	13.1	59.8 a	41.9 b	15.4 c	21.4 c	11.0

T2 = Testigo sólo inoculado; T3, T5 y T6: = inoculado y polinizado inmediatamente, ó 2 ó 4 h después; T4, T7 y T8 = polinizado e inoculado inmediatamente ó 2 ó 4 h después. Valores con letra distinta en el mismo grupo de tratamientos son estadísticamente diferentes (Tukey, $p = 0.05$).

Los tratamientos que primero fueron inoculados presentaron un promedio de 16% más pistilos enfermos que los tratamientos que primero fueron polinizados (39 vs. 23%). Cuando primero se polinizó y se inoculó 2 h (T7) ó 4 h (T8) después, hubo 15 y 21% de pistilos enfermos, mientras que el testigo sólo inoculado presentó casi tres veces más daño en los pistilos (Cuadro IV.4). Incluso el porcentaje de pistilos enfermos del tratamiento en el que se inoculó inmediatamente después de la polinización (T3) no presentó diferencias con el testigo sólo inoculado ($p = 0.05$).

En campo las temperaturas mínimas fueron inferiores a 11 °C, con máximas de 34 °C y humedades relativas diarias entre 54 y 100%, durante el período comprendido entre la aplicación de los tratamientos (31 de julio) y 72 h después.

En los pistilos sólo polinizados (T1) sin inoculación, a las 18 h el polen había germinado y algunos tubos polínicos habían llegado a la base del ovario (Figura IV.1A, B, C); en cambio, en los tratamientos en los que la polinización y la inoculación fueron casi simultáneos (T3 y T4), a las 18 hdat ni el polen ni los conidios habían germinado (Figura IV.1D), incluso a las 48 h el polen seguía sin germinar (Figura IV.1E) mientras que las hifas empezaban a crecer sobre el estigma (Figura IV.1F).

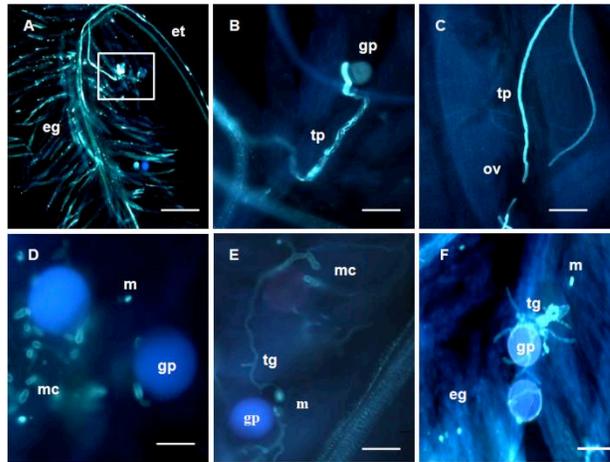


Figura IV.1. Germinación *in vivo* del polen de sorgo y conidios de *Claviceps africana* con azul de anilina y epifluorescencia UV (excitación, 365 nm; emisión, 397 nm). A, B, C = Germinación del polen y crecimiento del tubo polínico en estigmas sanos a las 18 h después de la polinización. En los tratamientos de polinización e inoculación simultánea, a las 18 h después (D) no se observa germinación del polen; y 48 h después (E, F) los conidios habían germinado, incluso las hifas crecían en la superficie del estigma y sobre los granos de polen (I). eg = estigma; et = estilo; gp = grano de polen; m = microconidio; mc = macroconidio; ov = ovario; tg = tubo germinativo; tp = tubo polínico. Barra = 50 μ m.

A las 18 hdat en los pistilos sanos sólo polinizados se observó que las células del estigma y estilo están íntegras (Figura IV.2A, B), y que los procesos de germinación y crecimiento del tubo polínico son normales.

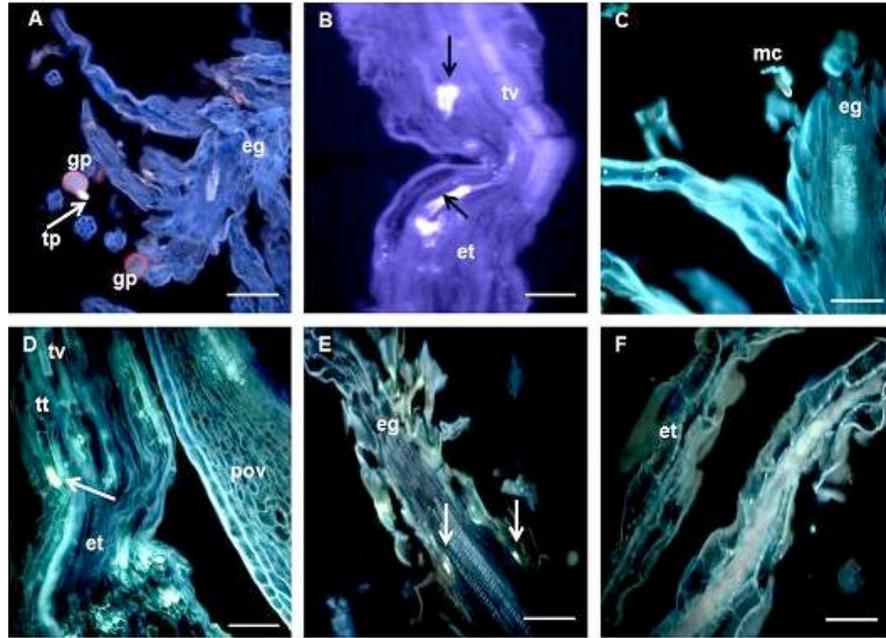


Figura IV.2. Infección de *Claviceps africana* en cortes longitudinales en pistilos incluidos en parafina, teñidos con azul de anilina y epifluorescencia UV (excitación 365 nm; emisión 397 nm). A y B: Germinación del polen en el estigma y crecimiento del tubo polínico en estilos sanos; C a F: en pistilos inoculados e inmediatamente polinizados; C = germinación de conidios en el estigma 18 hdat; D = disgregación celular en estilo 48 hdat; E y F = colapso celular del estigma y estilo 72 hdat. eg = estigma; et = estilo; gp = grano de polen; mc = macroconidio; pov = pared del ovario; tp = tubo polínico; tt = tejido de transmisión; tv = tejido vascular. Las flechas indican la formación de tapones de calosa del tubo polínico. Barra = 20µm.

En ese mismo muestreo, en el tratamiento primero inoculado e inmediatamente polinizado (T3) pocos conidios (1 a 3) habían germinado en el estigma (Figura IV.2C), aunque los daños a los tejidos del estilo fueron evidentes hasta las 48 hdat (Figura IV.2D). El estigma (Figura IV.2E) y estilo (Figura IV.2F) presentaron mayor disgregación o desorden celular por efecto de la infección fúngica que el ovario y sus paredes, a las 72 hdat. Los resultados de T2 y T3 fueron similares. En ningún pistilo se observó germinación ni penetración del patógeno directamente a través de las paredes del estilo y ovario; el daño inició por la ruta de crecimiento del tubo polínico.

Producción de semilla y severidad

También hubo efecto de tratamientos ($p \leq 0.01$) en todas las variables relativas al rendimiento y a la severidad del daño, en ambas etapas de muestreo post-antesis (Cuadro IV.5).

Cuadro IV.5. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables medidas en la etapa de grano masoso y a la cosecha, en la cruz A9 x B9.

Variable	Tratamientos primero inoculados		Tratamientos primero polinizados	
	T3, T5, T6, más testigos		T4, T7, T8, más testigos	
	CM	CV	CM	CV
Muestreo en grano masoso				
Flores enfermas	45705.91**	19	93984.93**	20
Semillas por panoja	57483.65**	7	45878.98**	6
Muestreo a la cosecha				
Flores enfermas	209235.92**	27	320004.71**	33
Semillas por panoja	9263.14**	10	44066.14**	7
Rendimiento	202.58**	11	120.11**	9
Peso de 100 semillas	1.18**	6	0.89**	7

CM = cuadrados medios; CV = coeficiente de variación (%). ** = $p \leq 0.01$.

El exudado (síntoma visible de la enfermedad) ocurrió 15 ddat, lapso durante el cual la temperatura y humedad máxima fueron 34 °C, 99.9%, mínima de 4.5 °C, 53.7% y media, 19.2 °C, 76.8%. En ambos muestreos, el testigo sólo inoculado (T2) tuvo el mayor número de flores enfermas (392 en grano masoso y 569 a la cosecha); el testigo sólo polinizado (T1) no presentó daño (Cuadro IV.6).

En los tratamientos que primero fueron polinizados (T4, T7 y T8) se observó que a mayor lapso entre la polinización y la inoculación hubo menor número de flores enfermas, en ambos muestreos, con el consecuente incremento en el número de semillas. En cambio, en los tratamientos T3, T5 y T6 que primero fueron inoculados, el número de flores

Cuadro IV.6. Comparación de medias entre tratamientos para las variables medidas en la etapa de grano masoso y a la cosecha.

Variable	Tratamientos primero inoculados						Tratamientos primero polinizados					
	T1	T2	T3	T5	T6	MDS	T1	T2	T4	T7	T8	MDS
Muestreo en grano masoso												
FE	0 c	392 a	222 b	186 b	203 b	87	0 c	392 a	163 b	126 bc	87 c	71
SP	640 a	0 c	407 b	431 b	446 b	62	640 a	0 c	418 b	588 a	578 a	64
Muestreo a la cosecha												
FE	0	569 a	295 b	196 b	212 b	124	0	569 a	176 b	137 b	109 b	120
SP	664 a	0 c	378 c	489 b	472 b	76	664 a	0 c	477 c	598 b	613 ab	60
RSP	20.9 a	0 c	8.1 c	12.5 b	12.1 b	2.2	20.9 a	0 c	10.9 c	16.6 b	17.0 b	2.3
P100S	3.15 a	0 c	2.15 c	2.54 b	2.57 b	0.2	3.15 a	0 c	2.28 c	2.80 b	2.80 b	0.3

T1 = Testigo sólo polinizado y T2 = sólo inoculado; T3, T5 y T6: = inoculado y polinizado inmediatamente, ó 2 ó 4 h después; T4, T7 y T8 = polinizado e inoculado inmediatamente ó 2 ó 4 h después. FE = flores enfermas; SP = semillas por panoja; RSP = rendimiento de semilla (g) por panoja y P100S = peso de 100 semillas (g). Valores con letra distinta en la misma variable, grupo de tratamientos y muestreo son estadísticamente diferentes (Tukey, $p = 0.05$).

enfermas y de semillas por panoja fue estadísticamente igual en ambos muestreos, aunque el número de semilla por panoja siempre fue inferior al testigo sólo polinizado (Cuadro IV.6). El efecto nocivo de la inoculación fue evidente en ambos muestreos, pues en promedio los tratamientos primero inoculados tuvieron 39% (219) más flores enfermas y 20% menos semillas (437) que los tratamientos primero polinizados. En ambos grupos de tratamientos, el rendimiento y peso de 100 semillas disminuyeron ($p = 0.05$) por efecto de la inoculación con el hongo, ya sea que fueran primero inoculados o primero polinizados, pero la mayor reducción ocurrió cuando la inoculación y la polinización fueron casi simultáneas (Cuadro IV.6). Además, el rendimiento y tamaño de semilla fueron 36 y 8% mayores en los tratamientos en los que primero llegó el polen que en los que primero llegó

el inóculo. Destaca que a pesar de que hubo una reducción en el número de semillas por efecto del inóculo, el peso de la semilla no se incrementó.

IV.5. DISCUSIÓN

Receptividad estigmática

La receptividad del estigma, medida a través de la adhesión y germinación del polen, y el crecimiento del tubo polínico hasta la fecundación (Dafni *et al.*, 2005), disminuyó por la acción del patógeno, aun en presencia del polen, sea con polinización casi simultánea o con una diferencia de 2 ó 4 h de la inoculación. En los tratamientos primero inoculados se esperaba que conforme se polinizara más tarde, el efecto negativo del patógeno aumentaría, mientras que en los tratamientos primero polinizados se esperaba que a medida que se inoculara más tarde, la receptividad del estigma fuera mayor. Ambas situaciones se cumplieron, aunque la relación no fue lineal en el primer caso, pero sí en el segundo.

Estos resultados pueden atribuirse a una interferencia física, pues la aspersion del patógeno en suspensión puede influir desde el inicio del proceso infeccioso (Malcolm *et al.*, 2002) debido a una competencia por espacio, cambios hídricos o lavado del polen. En el primer caso, aunque el tamaño del grano de polen de sorgo (40 a 50 μm) (Cisneros-López *et al.*, 2007) es mayor que los macro (9 a 17 x 5 a 8 μm), micro (2 a 3 μm) y conidios secundarios (8 a 14 x 4 a 6.5 μm) de *Claviceps africana* (Frederickson *et al.*, 1991), los estigmas pueden recibir varias veces más esporas que polen (Figura IV.1D); especialmente en condiciones controladas, en las que concentraciones altas de inóculo (1×10^6 conidios mL^{-1}) (Komolong *et al.*, 2003) se distribuyen uniformemente, como ocurrió en este caso. En un estudio efectuado en invernadero, con polinización manual y varias especies de

Sorghum, se encontró que los granos de polen por pistilo variaron entre 44 y 88 en *S. bicolor* (Hodnett *et al.*, 2005; Price *et al.*, 2006).

Además de la competencia por espacio, también pudo haber cambios hídricos en el polen y en la superficie estigmática ocasionados por la aplicación de la suspensión, sobre todo en los tratamientos casi simultáneos (T3 y T4), los cuales mostraron la mayor reducción en las variables relacionadas con la receptividad del estigma. En los tratamientos primero inoculados (T3, T5 y T6) la suspensión cubrió la superficie del estigma antes de la polinización, lo que quizás impidió que algunos granos de polen hicieran contacto o que se interrumpiera la fase de reconocimiento con el estigma (Heslop-Harrison, 1982). En sorgo se desconoce el mecanismo de reconocimiento entre el grano de polen y el estigma; tampoco se conoce tal mecanismo entre la espora de las especies que causan el ergot (*C. africana*, *C. sorghi* y *C. sorghicola*) y el estigma del hospedero. Es posible que los sitios de reconocimiento sean comunes, pues en el presente estudio se demuestra que *C. africana* es un patógeno altamente específico, que sólo penetra a través del estigma. En los tratamientos primero polinizados (especialmente en T4) el polen depositado se cubrió por la suspensión de conidios y de oligosacáridos provenientes del exudado (Bandyopadhyay *et al.*, 1998), formándose una película líquida alrededor del polen (Heslop-Harrison, 1982), condición que pudo impedir la hidratación del polen necesaria para su germinación (Heslop-Harrison, 2000). Al respecto, las infecciones naturales del patógeno ocurren por la dispersión de películas de agua que transporta el viento (Frederickson *et al.*, 1993). Esto es contrario a lo que sugieren Malcolm *et al.* (2002) respecto a que la suspensión acuosa no simula la infección natural pues indican que en *Claviceps africana* los conidios secundarios son la fuente principal de infección. Sin embargo en el presente estudio la fuente principal de inóculo fueron los macroconidios (Figura IV.1D).

Finalmente, la suspensión pudo haber lavado al polen, como ocurre cuando se presenta lluvia después de la polinización (Bandyopadhyay *et al.*, 1998) y disminuir el número de granos de polen adheridos (Cuadro IV.2), especialmente cuando la inoculación fue más cercana a la polinización, como ocurrió en los dos tratamientos en que se polinizó e inoculó de manera casi simultánea.

Al parecer, la interferencia inicial en la adhesión del polen también disminuyó la posterior germinación y crecimiento del tubo polínico de los tratamientos en los que los intervalos entre la polinización e inoculación fueron 2 y 4 h (Cuadro IV.2), en comparación con el testigo sólo polinizado. Incluso se observaron anomalías en la dirección del crecimiento del tubo polínico, *i. e.*, enroscamientos, que al final disminuyeron los pistilos fecundados. Estas alteraciones pueden ser causadas por la interferencia del patógeno (Marr, 1997), pues mientras el número de tubos polínicos disminuye del estigma hacia la base del ovario (Hodnett *et al.*, 2005), las hifas de *Claviceps* se multiplican en las estructuras internas del pistilo, intra-celularmente (Frederickson y Mantle, 1988; Scheffer y Tudzynsky, 2006) y ocupan el espacio que le correspondería al tubo polínico, comportamiento que se corroboró en el presente experimento. Esto sugiere que los conidios germinaron primero o a la par que el polen y que la actividad del patógeno empezó antes de lo esperado (Ryley *et al.*, 2002), aún con la humedad (55%) y temperatura mínimas (4.5 °C) que prevalecieron durante las 72 h dat, pues los macroconidios pueden germinar *in vitro* aún a temperaturas entre 5 a 10 °C y 40% de humedad (Bhuiyan *et al.*, 2002). Además, las temperaturas cercanas a 12 °C pueden inducir la esterilidad femenina o reducir la compatibilidad entre progenitores (McLaren, 1999) y afectar el éxito de la polinización.

Infección del pistilo

Todas las panojas inoculadas mostraron síntomas de la enfermedad, pero no todos los pistilos se infectaron. El testigo sólo inoculado (T2) tuvo en promedio 60% de pistilos enfermos (con esporas germinadas, micelio y colapso celular), superior a los otros tratamientos (Cuadro IV.4). Frederiksen y Odvody (2000) afirman que algunos o todos los ovarios pueden ser infectados, aunque no indican las causas de esta respuesta diferencial. En las muestras de todos los tratamientos, aunque no se cuantificó, se observó que sólo una porción de las esporas no germinó a las 18 hdat (Figura IV.1E, F); quizá ésta sea una causa por la cual hubo pistilos inoculados que no se enfermaron; además, se ha reportado que 48 h después de la inoculación con *Claviceps sorghi* la mayoría de los conidios germinaron pero con limitado crecimiento del micelio (Frederickson y Mantle, 1988). Por otra parte, la viabilidad inicial del inóculo varía de 50 a 80% en *Claviceps africana* (Claflin, 1999; Frederickson y Odvody, 2002).

En los pistilos donde los conidios germinaron hubo abundante crecimiento del micelio a las 48 y 72 hdat. Incluso en los tratamientos polinizados e inoculados casi simultáneamente (T3 y T4), los granos de polen sin germinar fueron colonizados por el micelio (Figura IV.2F), aunque el porcentaje de pistilos enfermos varió entre tratamientos (Cuadro IV.4). A las 72 hdat las células de los estilos enfermos presentaron rompimiento de paredes y colapso celular en el tejido de transmisión (Figura IV.2D, F), y en los tratamientos simultáneos el crecimiento del tubo polínico se inhibió (Figura IV.2D). El tejido de transmisión del estilo es un tejido especializado para el crecimiento del tubo polínico (Heslop-Harrison, 2000), que en sorgo se caracteriza por ser una región opuesta al tejido vascular y compuesta por células pequeñas con paredes delgadas (Capítulo II de esta tesis), lo cual facilitaría la colonización por el hongo. No se observó crecimiento del

micelio en el parénquima de la pared del ovario, a las 72 hdat, lo que concuerda con las observaciones de Komolong *et al.* (2003); tampoco se detectó necrosis celular en estigma ni estilo en tratamiento alguno a las 48 hdat, ni en las paredes del ovario después de 72 hdat, como Hernández-Martínez *et al.* (2001) reportaron, posiblemente porque el grado de reacción varía entre genotipos (Frederickson *et al.*, 1994). Al respecto, en México se han encontrado diferencias de patogenicidad entre aislamientos de *C. africana* (Pecina *et al.*, 2007); además, debe considerarse un posible efecto de las bajas temperaturas en el proceso patogénico.

La importancia de evaluar la enfermedad durante las primeras etapas de infección radica en que el estigma y tejido de transmisión infectado desde esas fases, ya no son viables desde el punto de vista reproductivo (Heslop-Harrison, 2000), por lo que la formación de calosa en la base del ovario como reacción del hospedero para detener el avance de la infección (Komolong *et al.*, 2003) sería tardía. De acuerdo con los resultados histológicos del presente experimento, no hay suficiente evidencia de que la calosa constituya una barrera que impida el avance del hongo, como lo sugieren Komolong *et al.* (2003) y Hüchelhoven (2007), pues la calosa puede formarse cuando existen problemas de compatibilidad entre el polen y el pistilo (Hodnett *et al.*, 2005). Nuestros resultados confirman que el estigma es el nicho más adecuado para la germinación de los conidios (Bhuiyan *et al.*, 2002) y fue la única vía de infección (Frederickson y Mantle, 1988); además, no se observó la penetración directa por estilo u ovario propuesta por Ryley *et al.* (2002). Esto significa que *C. africana* es un patógeno altamente específico.

Producción de semilla

La pérdida de receptividad del estigma causada por la competencia polen *vs.* inóculo durante las primeras 72 hdat repercutió en la severidad de la enfermedad, en magnitud

variable según el tiempo de arribo del polen y del inóculo. Como consecuencia de la competencia que se generó durante la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico, los tratamientos sin diferencial de tiempo entre inóculo y polen (T3 y T4), en promedio tuvieron mayor número de flores enfermas (214) y de semillas (420) que los tratamientos con diferencial (T5, T6, T7 y T8), aunque las diferencias ($p = 0.05$) fueron mayores para el número de semillas (Cuadro IV.6). A la cosecha, T3 y T4 redujeron el rendimiento en 61 y 50% y el tamaño de la semilla en 32 y 26% (Cuadro IV.6), a pesar de que los progenitores (A9 y B9) presentaron sincronía floral. Esta respuesta no debe considerarse atípica, pues incluso líneas androfértiles tolerantes al ergot tuvieron 30% de pérdida en el rendimiento, de 19% en el número y de 8% en tamaño de la semilla, mientras que líneas tolerantes al frío experimentaron menores decrementos (21, 12 y 11% respectivamente) al ser inoculadas a una concentración de 1×10^4 conidios mL^{-1} (Hernández-Martínez *et al.*, 2002). En condiciones de campo, bajo inoculación natural se registró desde 5 hasta 63% de incidencia y 2% de flores enfermas en líneas B (Dahlberg *et al.*, 2001).

En comparación con el testigo T1 que sólo fue polinizado, tanto en los tratamientos primero inoculados como en los primero polinizados, el rendimiento de semilla por panoja y sus componentes disminuyeron, sobre todo cuando fueron primero inoculados, en magnitudes que variaron con la diferencia de tiempo entre polinización e inoculación (Cuadro IV.6). La ausencia de compensación entre el número y el tamaño de las semillas pudo ser consecuencia del proceso de patogénesis del hongo que afectó el sistema de transporte (tejido vascular) del pistilo; a diferencia de lo que ocurre en panojas sanas donde en ausencia de daños al sistema de transporte, a un incremento en el número de semillas generalmente se corresponde un menor tamaño de la semilla y viceversa (Valadez-Gutiérrez *et al.*, 2006).

La mayor diferencia ($p = 0.05$) en el número de flores enfermas en el muestreo a la cosecha respecto al de grano masoso (Cuadro IV.6) puede atribuirse a que la humedad relativa máxima durante la etapa de llenado de grano fue cercana a 100%, lo que favoreció la colonización del exudado por hongos saprófitos como *Cerebella* sp., que agravaron los síntomas de la enfermedad (Bandyopadhyay *et al.*, 1990).

IV.6. CONCLUSIONES

La presencia del patógeno disminuyó la receptividad del estigma tanto en polinización simultánea como con una diferencia de 2 y 4 h con respecto a la inoculación. El mayor daño ocurrió cuando el polen y el inóculo llegaron en forma simultánea, sin importar cuál se depositó primero. Esto sugiere que los conidios germinaron primero o a la par que el polen y que la actividad del patógeno empezó antes que la del grano de polen. Los cambios en la receptividad del estigma afectaron la fertilización del óvulo porque hubo reducción en la producción de semilla. Los tratamientos en los que se inoculó primero tuvieron en promedio más flores enfermas (60%) y menos semillas (30%). En este experimento la única vía de infección del patógeno fue el estigma; no se observó penetración directa por estilo u ovario.

IV.7. LITERATURA CITADA

- Bandyopadhyay, R., L. K. Mughogho, S. K. Manohar, and M. V. Satyanarayana. 1990. Stroma development, honeydew formation, and conidial production in *Claviceps sorghi*. *Phytopathol.* 80: 812-818.
- Bandyopadhyay, R., D. E. Frederickson, N. W. McLaren, G. N. Odvody, and M. J. Ryley. 1998. Ergot: A new disease threat to sorghum, in the Americas and Australia. *Plant Dis.* 82: 356-367.
- Bhuiyan, S. A., V. J. Galea, M. J. Ryley, D. Tay, and A. T. Lisle. 2002. Factors influencing the germination of macroconidia and secondary conidia of *Claviceps africana*. *Aust. J. Agric. Res.* 53: 1087-1094.

- Cisneros-López, M. E., L. E. Mendoza-Onofre, H. A. Zavaleta-Mancera, G. Mora-Aguilera, L. Córdova-Téllez, V. A. González-Hernández y M. Hernández-Martínez. 2006. Viabilidad y germinación del grano de polen en líneas de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). Sociedad Mexicana de Histología. Memorias XXX Congreso Nacional de Histología. UAM. México, D. F. p. 66.
- Claflin, L. E. 1999. Ergot: A new disease of grain sorghum in the western hemisphere. *Rev. Mex. Fitopat.* 17: 46-48.
- Dafni, A., E. Pacini, and M. Nepi. 2005. Pollen and stigma biology. *In: Practical Pollination Biology*. Dafni, A., G. Kevan, and B. C. Husban (eds). NHBS. Cambridge, Canada, pp: 1-58.
- Dahlberg, J. A., R. Bandyopadhyay, W. L. Rooney, G. N. Odvody, and P. Madera-Torres. 2001. Evaluation of sorghum germplasm used in US breeding programs for sources of sugary disease resistance. *Plant Pathol.* 50: 681-689.
- Frederiksen, R. A., and G. N. Odvody. 2000. Compendium of Sorghum Diseases. 2nd ed. APS Press. pp: 40-42.
- Frederickson, D. E., and P. G. Mantle. 1988. The path of infection of sorghum by *Claviceps sorghi*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33: 221-234.
- Frederickson, D. E., P. G. Mantle, and W. A. J. de Milliano. 1991. *Claviceps africana* sp. nov.; the distinctive ergot pathogen of sorghum in Africa. *Mycol. Res.* 95: 1101-1107.
- Frederickson, D. E., P. G. Mantle, and W. A. J. de Milliano. 1993. Windborne spread of ergot disease (*Claviceps africana*) in sorghum A-lines in Zimbabwe. *Plant Pathol.* 42: 368-377.
- Frederickson, D. E., P. G. Mantle, and W. A. J. de Milliano. 1994. Susceptibility to ergot in Zimbabwe of sorghums that remained uninfected in their native climates in Ethiopia and Rwanda. *Plant Pathol.* 43: 27-32.
- Frederickson, D. E., and G. N. Odvody. 2002. Survival of inoculum of *Claviceps africana* in Zimbabwe: Potential sources of initial inoculum. *In: Sorghum and Millets Diseases*. Leslie, J. F. (ed). Iowa State Press. pp: 79-82.

- Hernández-Martínez, M., E. Cárdenas-Soriano, L. E. Mendoza-Onofre, S. Osada-Kawasoe, P. Ramírez-Vallejo, and F. Zavala-García. 2001. Pathogenesis of *Claviceps africana* in sorghum ovaries. *Agrociencia* 35: 535-542.
- Hernández-Martínez, M., L. E. Mendoza-Onofre, P. Ramírez-Vallejo, S. Osada-Kawasoe, E. Cárdenas-Soriano, and F. Zavala-García. 2002. Response of sorghum B and R lines to ergot (*Claviceps africana*) at Celaya, Guanajuato, Mexico. *In: Sorghum and Millets Diseases*. Leslie, J. F (ed). Iowa State Press. pp: 83-85.
- Heslop-Harrison, J. 1982. Pollen-stigma interaction and cross-incompatibility in grasses. *Science* 215: 1358-1364.
- Heslop-Harrison, Y. 2000. Control gates and micro-ecology. The pollen-stigma interactions in perspective. *Ann. Bot.* 85 (suppl. A): 5-13.
- Hodnett, G. L., B. L. Burson, W. L. Rooney, S. L. Dillon, and H. J. Price. 2005. Pollen-pistil interactions result in reproductive isolation between *Sorghum bicolor* and divergent *Sorghum* species. *Crop Sci.* 45: 1403-1409.
- Hückelhoven, R. 2007. Cell wall-associated mechanism of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 101-127.
- Komolong B., S. Chakraborty, M. Ryley, and D. Yates. 2003. Ovary colonization by *Claviceps africana* is related to ergot resistance in male-sterile lines. *Plant Pathol.* 52: 620-627.
- Marr, D. 1998. The effect of *Microbotryum violaceum* spores on pollen germination in *Silene acaulis*. *Int. J. Plant Sci.* 159: 221-227.
- McLaren, N. W. 1997. Changes in pollen viability and concomitant increase in the incidence of sorghum ergot with flowering date and implications in selection for escape resistance. *J. Phytopathol.* 145: 261-265.
- McLaren, N. W. 1999. Host x Pathogen x Environment Interaction in Sorghum Ergot Disease. *In: Global Conference on Ergot of Sorghum*. Brasil ete Lagoas. June 1-8. pp: 122-134.
- Meinke, H., and M. Ryley. 1997. Effects of sorghum ergot on grain sorghum production: a preliminary climatic analysis. *Aust. J Agric. Res.* 48: 1241-1247.
- Mendoza-Onofre, L. E., M. Hernández-Martínez, E. Cárdenas-Soriano, and P. Ramírez-Vallejo. 2006. Cold-tolerant sorghum germplasm as a potential source to ergot

- (*Claviceps africana* Frederickson, Mantle & de Milliano) tolerance. *Agrociencia* 40: 593-603.
- Moran, L. J., W. L. Rooney, R. A. Frederiksen, and G. N. Odvody. 2002. Differences in ergot vulnerability among sorghum genotypes and the relationship between stigma receptivity and ergot vulnerability. *In: Sorghum and Millets Diseases*. Leslie, J. F. (ed). Iowa State Press. pp: 113-120.
- Musabyimana, T., D. Sehene, and R. Bandyopadhyay. 1995. Ergot resistance in sorghum in relation to flowering, inoculation technique and disease development. *Plant Pathol.* 44: 109-115.
- Pecina Q., V., N. Montes G., H. Williams A., S. Hernández D., N. Mayek P. y L. K. Prom. 2007. Diversidad genética de aislamientos de cornezuelo (*Claviceps africana* Frederickson, Mantle y de Milliano) de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] en México. *Rev. Mex. Fitopat.* 25: 43-47.
- Price, J. H., G. L. Hodnett, B. L. Burson, S. L. Dillon, D. M. Stelly, and W. L. Rooney. 2006. Genotype dependent interspecific hybridization of *Sorghum bicolor*. *Crop Sci.* 46: 2617-2622.
- Reed, J. D., M. R. Tuinstra, N. W. McLaren, K. D. Kofoid, N. W. Ochanda, and L. E. Claflin. 2002. Analysis of combining ability for ergot resistance in grain sorghum. *Crop Sci.* 42: 1818-1823.
- Ryley, J. M., D. J. Herde, S. A. Bhuiyan, R. G. Henzell, and D. R. Jordan. 2002. An overview of biology of sorghum ergot. *In: Sorghum and Millets Diseases*. Leslie, J. F. (ed). Iowa State Press. pp: 141-150.
- SAS Institute. 2002. SAS/SAT. Versión 9.1. SAS Inst. Cary. NC. USA. Versión en línea (<http://www.colpos.mx/servicios/sas/indexs.htm>).
- Scheffer, J., and P. Tudzynski. 2006. *In vitro* pathogenicity assay for the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Mycol. Res.* 110: 465-470.
- Valadez-Gutiérrez, J., L. E. Mendoza-Onofre, H. Vaquera-Huerta, L. Córdova-Téllez, Ma. del C. Mendoza-Castillo, and G. García-de los Santos. 2006. Flowers thinning, seed yield and post anthesis dry matter distribution in sorghum. *Agrociencia* 40: 303-314.
- Westgate, M. E., and J. S. Boyer. 1986. Silk and pollen water potentials in maize. *Crop Sci.* 26: 947-951.

CAPÍTULO V. DISPONIBILIDAD DE POLEN, INCIDENCIA DE ERGOT Y PRODUCCIÓN DE SEMILLA CON DIFERENTES RELACIONES DE SURCOS HEMBRA:MACHO EN SORGO

V.1. RESUMEN

El ergot (*Claviceps africana* Frederickson, Mantle & de Milliano) del sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es un riesgo para la producción de semilla en líneas androestériles. En Montecillo, Estado de México (2240 msnm), el 5 de mayo y 10 junio de 2005 se incrementó semilla de la línea A9 x B9, con las relaciones hembra:macho: 4:2, 6:2 y 8:2; el 3 de abril de 2006 se sembró un tercer lote con las relaciones 8:2, 12:2 y 16:2. En ambas líneas se registró: días al inicio de antesis, antesis, periodo y progreso de la floración. En la línea B se cuantificó la producción y viabilidad del polen. El polen depositado se trapeó durante el periodo de floración en los surcos hembra. A la cosecha se evaluó la producción de semilla/panoja y sus componentes, incidencia y severidad de *C. africana*, y se estimó el rendimiento ha^{-1} de la línea A. Hubo diferencias ($p \leq 0.05$) en los días a antesis y periodo de floración entre ambas líneas; el progreso de la floración fue rápido en la línea A9 y lento en B9. La cantidad de polen producido varió de 14 a 32 mg/panoja durante el periodo de floración y el polen depositado, de 1 a 4 granos $\text{cm}^{-2} \text{d}^{-1}$. La producción de semilla/panoja; número de semillas/panoja; la incidencia de la enfermedad y el polen depositado, disminuyeron a medida que la distancia a la fuente fue mayor. Los mayores rendimientos se obtuvieron en las fechas de siembra de abril y mayo (2.6 y 2.8 t ha^{-1}); y en las proporciones 8:2 y 12:2 (2.7 y 2.9 t ha^{-1}). La incidencia de *C. africana* aumentó de 10 a 43% al aumentar la relación h:m, aunque en todos los casos la severidad fue menor a 2%.

Palabras clave: *Sorghum bicolor*, disponibilidad de polen, polinización, sincronía floral.

V.2. INTRODUCCIÓN

La presencia de *Claviceps africana* en lotes de producción de semilla de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es mayor cuando no hay sincronía floral entre los progenitores hembra (líneas A, androestériles) y macho (líneas B y R, androfértiles) (Meinke y Ryley, 1997); o cuando ocurren temperaturas inferiores a 12 °C durante la microsporogénesis de las líneas macho pues provocan baja producción de polen (Parh *et al.*, 2006) o que éste sea estéril (McLaren, 1997). Sin embargo, aún en casos de sincronía floral perfecta entre los progenitores y alta frecuencia de polen fértil, la incidencia y severidad de la enfermedad aumentan cuando la relación de surcos hembra:macho (rh:m) es alta, ya que la cantidad de polen es insuficiente para polinizar las plantas hembra más alejadas de la fuente de polen (Hernández-Martínez *et al.*, 2006). En consecuencia, la relación de surcos hembra:macho es una estrategia para el manejo de la enfermedad (Bandyopahyay *et al.*, 1998); además, la presencia y el desarrollo del ergot dependen de la interacción entre hospedero, ambiente y patógeno (McLaren, 2002).

En México, en lotes de incremento de la cruza E15A x E15B (A x B) y del híbrido A155 x R8509 (A x R) sembrados en El Bajío (1500 msnm) con rh:m de 8:4, la incidencia de ergot en los surcos más distantes de la fuente de polen (3.04 m) fue 42% en el lote A x B y 66% en el lote A x R, con valores de severidad de 19 y 22%, y reducciones en el rendimiento de semilla ha⁻¹ de 45 y 56%, respectivamente, comparada con la de los surcos más cercanos a la fuente de polen (0.76 m) (Hernández-Martínez *et al.*, 2006). En los Valles Altos Centrales de México (2200 msnm) se desconoce la rh:m adecuada para producir semilla básica de los híbridos experimentales de sorgo y el efecto de la presencia natural de *C. africana*. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la sincronía floral del par isogénico A9/B9, así como la producción y disponibilidad de polen de la línea

B9, y el efecto de la relación de surcos hembra:macho y del ambiente en la producción de semilla básica y en la incidencia y severidad de *Claviceps africana* de la línea A9.

V.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento de campo

En Montecillo, Estado de México (2240 msnm), durante 2005 y 2006 se incrementó semilla básica de la línea A9 (A9 x B9) en tres ambientes. En 2005 se sembraron dos lotes; el Lote 1 (Ambiente 1), el 3 de mayo y el Lote 2 (Ambiente 2), el 10 de junio; en cada uno se establecieron tres sublotes que correspondieron a las relaciones de surcos hembra:macho 4:2, 6:2 y 8:2; la cosecha fue en octubre. En el Ambiente 2 la relación 8:2 se eliminó por su escasa población de plantas debido a problemas de drenaje en el suelo. Resultados preliminares de 2005 indicaron pocas diferencias del rendimiento de semilla/panoja entre las rh:m, por lo que en 2006, en el Lote 3 (Ambiente 3, sembrado el 3 de abril) se incrementó los surcos hembra, estableciéndose las relaciones 8:2, 12:2 y 16:2; la cosecha también fue en octubre. En los tres ambientes los surcos se orientaron perpendicularmente a los vientos dominantes. En todos los surcos se aclaró a una planta cada 10 cm, por lo que la densidad de población (DP) de plantas hembra ha⁻¹ en cada rh:m fue: 74,000 (4:2); 83,000 (6:2), 89,000 (8:2), 95,000 (12:2) y 99,000 (16:2). La temperatura ambiente, humedad relativa, precipitación, velocidad (registrada a 2 m de altura) y dirección del viento se registraron en una estación meteorológica ubicada a 150 m de cada lote.

En cada sublote hubo tres parcelas (surcos de 20 m de largo y 0.90 m de ancho) de cada relación hembra:macho. Cada sublote se aisló con 10 surcos de una variedad de porte alto (3.0 m) de maíz (*Zea mays*) que se desespigó al inicio de la floración. Los lotes se mantuvieron libres de maleza; se aplicaron los riegos necesarios para impedir deficiencias

hídricas y se aislaron de otras especies por tiempo y distancia para evitar la presencia de polen de otras fuentes.

En la parcela central de los sublotes correspondientes a las relaciones 4:2 de los Ambientes 1 y 2, y de la relación 8:2 del Ambiente 3 se tomaron los siguientes datos:

Progreso de la floración. En la etapa de hoja bandera se marcaron 60 plantas con competencia completa en ambas líneas. Cada tercer día se registró el número de plantas que alcanzaron 25, 50, 75 y 100% de la floración; la variable se representó en forma gráfica.

Variables fenológicas. En las mismas plantas se cuantificó los días al inicio de la floración (DIF); días a antesis (DA), desde la siembra hasta que las plantas presentaron 50% de floración; y periodo de floración (PF), días de inicio a fin de la floración.

Producción (PP) y viabilidad del polen (PV). La producción de polen se obtuvo de 15 plantas por parcela, cuyas panojas se embolsaron desde el inicio hasta el final de la floración, y cada tercer día a las 17:00 h el polen se colectó y la bolsa se reemplazó. Las muestras individuales se secaron a 75 °C durante 24 h; el polen se pesó en una balanza analítica (Acculab Mod. VI-3, precisión = 0.001 g). La viabilidad de polen se cuantificó en cinco panojas, de las cuales se tomó una rama central, la que se fijó en FAA (50% etanol, 5% ácido acético glacial y 10% formaldehído). El porcentaje de polen viable (PV) se determinó con acetocarmin, en 10 anteras por rama (cinco campos de 20 granos por antera, en promedio); se contó solamente granos de polen con forma y tamaño típico y densidad citoplásmica mayor que 75% (Osuna-Ortega *et al.*, 2003), y se expresó en porcentaje.

En la parcela central de cada relación hembra:macho y ambiente se tomó la siguiente información:

Polen depositado. Se usaron trampas de papel adhesivo de 15 x 4 cm montadas en una estructura metálica (Figura V.1A). Una de las caras se orientó hacia el norte y la otra

hacia el sur pues los vientos dominantes eran en la dirección N-S. Las trampas se colocaron en cada surco hembra (Figura V.1B), desde la emergencia de la panoja hasta el final de la floración de la línea macho, cada tercer día de 9:00 a 16:00 h, después de lo cual las cintas se retiraron y guardaron en cajas petri de plástico (8 cm de diámetro). El conteo de los granos de polen se hizo en una superficie de 7 x 4 cm (28 cm²) bajo un microscopio de luz Swift® No. 815944 con un aumento de 10X. La variable se reportó como el promedio de granos de polen cm⁻² depositado en cada muestreo d⁻¹ (PD).

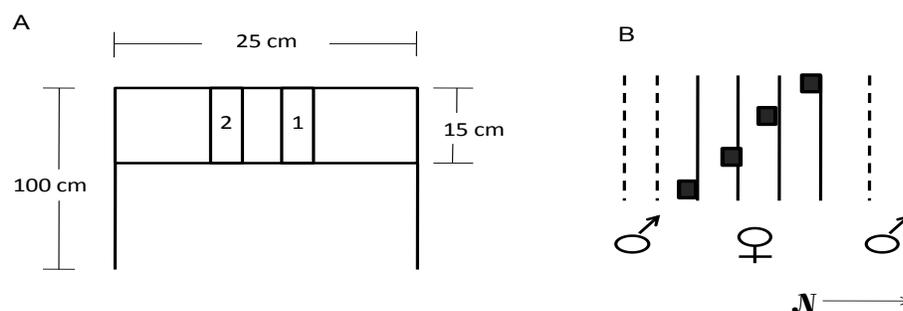


Figura V.1. Traqueo del polen de sorgo. A: Soporte metálico con sus dimensiones y ubicación de las trampas de papel adhesivo, dirección norte (1) y sur (2); B: distribución de trampas dentro de los surcos de plantas hembra en la relación 4:2.

Producción de semilla y sus componentes. A la cosecha, en 10 plantas por surco hembra se cuantificó la producción de semilla/panoja (RSP), peso de 100 semillas (P100S), número de semillas/panoja ($SP = RSP/P100S \times 100$) y rendimiento de semilla, en kg ha⁻¹ ($RSH = RSP \times DP/1000$). Las variables corresponden a los promedios por surco en cada relación.

Incidencia y severidad de la enfermedad. La incidencia (I) se obtuvo al dividir el número de panojas enfermas (con mielecilla, micelio o esclerocios) entre las 10 plantas cosechadas y se expresó en porcentaje; la severidad (S) se cuantificó con base en el

porcentaje de la panoja dañada en una escala de 1 a 100%, en múltiplos de 10. Las variables corresponden a los promedios por surco en cada relación.

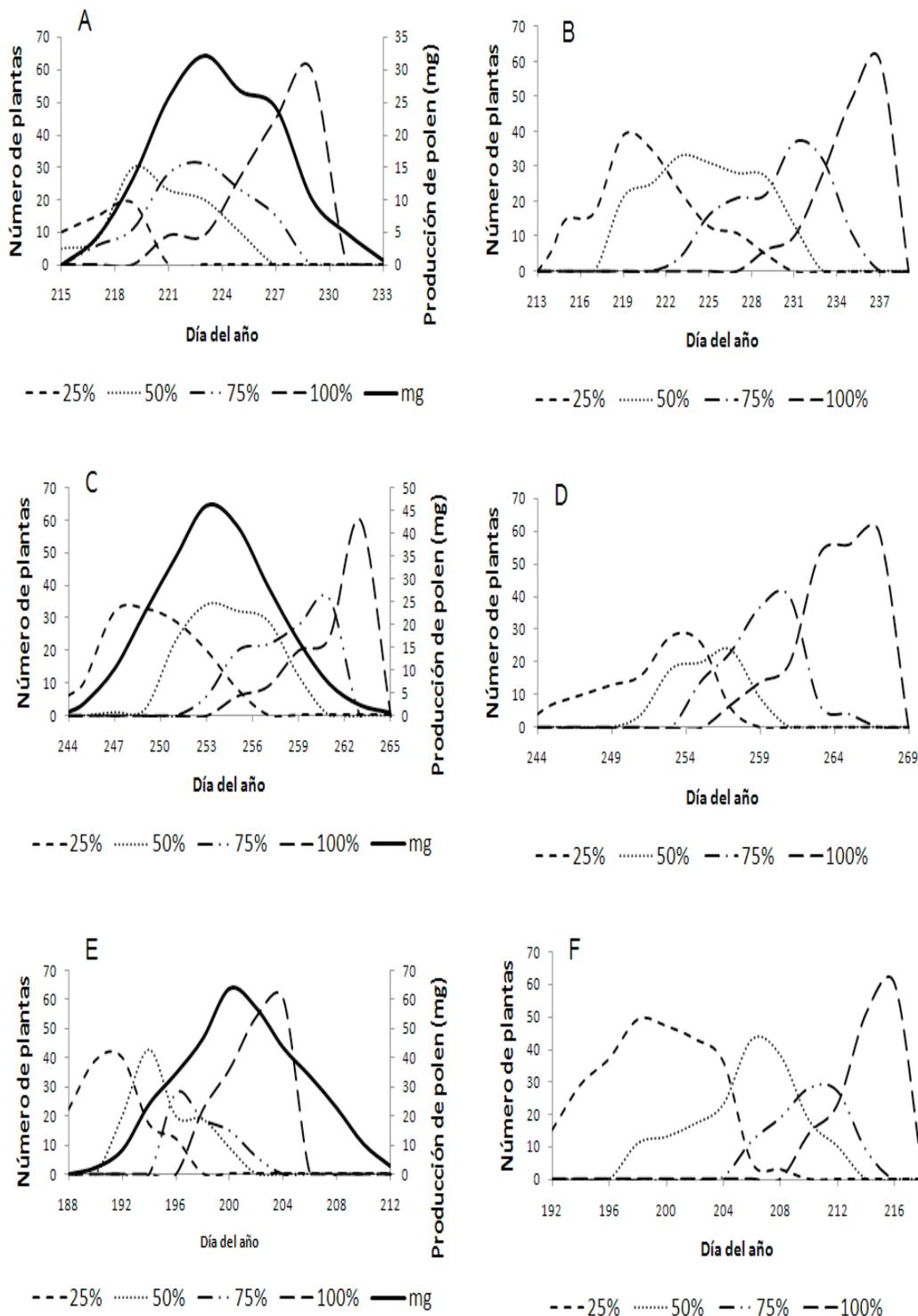
Análisis estadístico. Se aplicó la prueba de “t” de Student con datos de 60 observaciones, para días a antesis, inicio y periodo floración de ambos progenitores en los tres ambientes (A1 *vs.* A2, A1 *vs.* A3 y A2 *vs.* A3); 15, para producción de polen; y 25 observaciones para viabilidad del polen de la línea B. Las evaluaciones entre ambientes y entre las cinco relaciones h:m para la cantidad de polen depositado d^{-1} durante el periodo de floración, rendimiento de semilla ha^{-1} , producción de semilla/panoja y sus componentes, incidencia y severidad de *C. africana*, se realizaron mediante análisis de la varianza con un diseño completamente al azar desbalanceado. Los datos de las relaciones 4:2 y 6:2 correspondieron a los Ambientes 1 y 2; los de la relación 8:2, a los Ambientes 1 y 3; y los de las relaciones 12:2 y 16:2, al Ambiente 3. Cada planta se consideró una repetición para las variables de producción de semilla, incidencia y severidad de *C. africana*, y en el caso de polen depositado las repeticiones fueron los muestreos. Además, con base en los promedios de las cinco relaciones y tres ambientes, se hicieron correlaciones simples de Pearson entre las variables DP, PD, RSH, RSP, SP, P100S, I y S. También se aplicaron regresiones entre la distancia a la fuente de polen (0.9, 1.8, 2.7, 3.6, 4.5, 5.4, 6.3 y 7.2 m), con base en el promedio de los dos surcos equidistantes de los ambientes comunes, para PD, RSP, SP, P100S e I, en las relaciones 6:2, 8:2, 12:2 y 16:2. Finalmente, se aplicó análisis de varianza para cada variable registrada en los surcos situados a la misma distancia de la fuente de polen de las relaciones h:m pertinentes; y un análisis de varianza específico para el polen depositado promedio de los tres muestreos continuos de máxima deposición de polen. La comparación de medias se efectuó con la prueba de Tukey-Kramer ($p = 0.05$). Todos los análisis se efectuaron con el programa SAS 9.1 (SAS, 2002).

V.4. RESULTADOS

Características de la floración

El progreso de la floración de ambos progenitores varió y fue heterogéneo en los tres ambientes de producción de semilla (que combinan años y fechas de siembra), ya que no todas las plantas hembras (Figura V.2A, C, E) y machos (Figura V.2B, D, F) iniciaron la floración el mismo día, ni avanzaron con la misma velocidad durante el periodo de floración. La línea hembra fue más precoz que su isogénica macho, pues a 8 d de iniciada la floración en los tres ambientes, todas las plantas hembra presentaban entre 25 y 50% de floración mientras que en la línea macho sólo 15% estaba en antesis. La producción de polen durante el periodo de floración tuvo una distribución normal en todos los ambientes, por lo que hubo plantas hembras con menor probabilidad de disponer de suficiente polen al inicio o al final del periodo de floración (Figura V.2A, C, D); *i. e.*, en los Ambientes 1 y 2, 67% de las plantas hembra estuvieron receptivas pero sin polen disponible durante 3 a 6 d al final de su floración (Figura V.2A, B), y en el Ambiente 3 había 60% de plantas hembra sin polen disponible durante 5 d al inicio de la floración (Figura V.2D). Inclusive la máxima producción de polen ocurrió 5 d (Ambiente 1) y 7 d (Ambiente 3) después de que el mayor número de plantas hembra llegó a antesis (Figura 2A, D).

Los contrastes entre los tres ambientes para las cinco variables fenológicas y del polen indicaron que hubo diferencias ($p \leq 0.05$) para días al inicio de floración, días a antesis y producción de polen; pero no para el periodo de floración entre Ambiente 2 *vs.* 3, ni viabilidad del polen entre Ambiente 1 *vs.* 3 (Cuadro V.1). El inicio de floración y de antesis, en promedio de ambas líneas, en el Ambiente 2 fue 7 d más temprano que en el Ambiente 1, y de 9 a 15 d antes que en el Ambiente 3; aunque en el Ambiente 2 el periodo floral fue 3 d más largo que en el Ambiente 1 pero similar al del Ambiente 3. La



FiguraV.2. Progreso de la floración de las líneas A9 (A, C, E) y B9 (B, D, F), en el Ambiente 1, siembra del 3 de mayo de 2005 con relación 4:2 (A, B); Ambiente 2, siembra del 10 de junio de 2005 con relación 4:2 (C, D); y Ambiente 3, siembra del 3 de abril de 2006 con relación 8:2 (E, F). Producción de polen (A, C, E).

producción de polen de la línea B9 en el Ambiente 3 superó en 74% a la del Ambiente 2 y en 122% a la del Ambiente 1. La viabilidad del polen osciló entre 81 y 83% entre ambientes (Cuadro V.1).

Cuadro V.1. Contrastes entre ambientes para las variables fenológicas promedio de ambos progenitores, y de producción de polen viable de la línea B.

Variable	Ambientes			Contrastes entre ambientes (\pm)		
	1	2	3	1 vs. 2	1 vs. 3	2 vs. 3
DIF	91	84	95	7*	4*	9*
DA	99	92	107	7*	8*	15*
PF	17	20	20	3*	3*	0 ns
PP (mg)	14.4	18.4	32.0	4*	17.6*	18*
VP (%)	84	81	83	3*	1 ns	2*

Ambiente 1: siembra del 3 de mayo de 2005; Ambiente 2: siembra del 10 de junio de 2005; Ambiente 3; siembra del 5 de abril de 2006; DIF = días a inicio de floración; DA = días a antesis; PF = periodo de floración; PP = producción de polen; VP = viabilidad del polen. *Significancia según la prueba t de Student. Número de observaciones en cada contraste: Ambiente 1 vs. 2 = 27; Ambiente 1 vs. 3 = 30; Ambiente 2 vs. 3 = 27.

Al comparar la línea A9 vs. B9, sólo en el Ambiente 3 la línea hembra adelantó el inicio de la floración en 5 d, aunque en los tres ambientes fue más precoz (días a antesis) que su mantenedora B en 4 ó 5 d y su periodo de floración fue de 4 a 9 d más corto.

Condiciones climáticas

Treinta días antes de iniciar la antesis las temperaturas máxima, mínima y media promedio para los Ambientes 1, 2 y 3 fueron 30.1, 9.0 y 19 °C; 30.0, 8.6 y 19.4 °C; y 30.5, 5.3 y 17.9 °C. El periodo total de floración (días desde el inicio de la floración de la planta más precoz hasta el final de la floración de la más tardía, independientemente de si fuera la línea hembra o el macho) abarcó 22 d en el Ambiente 1 (3 al 25 de agosto), 24 d (1 al 24 de septiembre) en el Ambiente 2, y 28 d (7 de julio al 03 de agosto) en el Ambiente 3. Aunque entre las dos fechas de siembra de 2005 hubo 39 d de diferencia, en ambos ambientes la temperatura mínima durante la floración osciló entre 4 y 12 °C, mientras que la máxima

varió de 28 a 32 °C; además, las humedades relativas mínima y máxima y la precipitación en promedio del mes de agosto de 2005 fueron 43 y 99% con 4.4 mm de lluvia (6 d); mientras que en septiembre fueron 48.4 y 99% con 1.7 mm de lluvia (4 d). De julio a agosto de 2006 las condiciones fueron similares: temperaturas mínimas entre 3.5 y 11 °C y máximas entre 29 y 34°C, con valores de humedad relativa mínima de 49.0%; máxima de 99.5%; y 8 d de precipitación (3.2 mm).

La dirección del viento no fue estable durante la floración. Aunque los vientos predominantes provinieron del norte, en el mes de agosto de 2005 hubo 2 d de calma y 8 d con dirección sur y velocidad de 0.3 m s⁻¹; mientras que en el mes de septiembre del mismo año aumentaron los días de calma (6 d) equivalente a la cuarta parte del periodo de floración (24 d) con 2 d en dirección sur y una velocidad de 0.5 m/s; situación contrastante entre ambos meses. Entre el 7 de julio y el 3 de agosto de 2006, las condiciones fueron similares a las de agosto de 2005, excepto para la velocidad del viento que fue de 0.9 m s⁻¹.

Durante la etapa post-antesis y hasta la cosecha, las temperaturas máximas, mínimas y medias respectivas fueron: 29.5, 6.8 y 18.2 °C (Ambiente 1); 28.7, 4.8 y 16.9 °C (Ambiente 2) y 29.5, 3.5 y 16.5 °C (Ambiente 3).

Polen depositado, producción de semilla e incidencia y severidad de *C. africana*

Hubo efecto significativo ($p \leq 0.05$) del ambiente y de las rh:m en el polen depositado cm⁻² d⁻¹ en los surcos hembra, rendimiento de semilla ha⁻¹, producción de semilla/panoja y sus componentes, e incidencia y severidad del hongo (Cuadro V.2).

El mejor ambiente para la producción de semilla fue la combinación de la siembra del 3 de mayo de 2005 con rh:m de 4:2, 6:2 y 8:2 (Ambiente 1), pues superó al ambiente de menor producción (Ambiente 2, 10 de junio de 2005, con rh:m de 4:2 y 6:2) en rendimiento de semilla ha⁻¹ (25%), producción/panoja (19%) y P100S (29%) y a la fecha del 3 de abril

Cuadro V.2. Cuadrados medios para polen depositado, producción de semilla, incidencia y severidad de *Claviceps africana* para ambientes y relaciones de surcos hembra:macho.

Variable	Ambientes		Relaciones h:m	
	CM	CV (%)	CM	CV (%)
Polen depositado cm ⁻² día ⁻¹	2.67*	47	2.47*	45
Rendimiento de semilla (kg ha ⁻¹)	25408380.26*	29	25048621.0*	28
Rendimiento semilla/panoja (g)	4578.40*	29	3212.27*	28
Número de semillas/panoja (g)	3756208.24*	28	4013827.84*	27
Peso de 100 semillas (g)	47.49*	15	11.90*	16
Incidencia (%)	12715.14*	58	4508.68*	63
Severidad (%)	169.59*	60	8.10*	41

CV = coeficiente de variación;* p ≤ 0.05.

de 2006 (Ambiente 3, con rh:m de 8.2, 12:2 y 16:2) en las mismas variables, así como en cantidad de polen depositado cm⁻² d⁻¹ (33%). Además, la incidencia y severidad del hongo en el Ambiente 1 fue de 3.5 a 5 veces menor que en el Ambiente 3 (Cuadro V.3).

Cuadro V.3. Comparación de ambientes en la cantidad de polen depositado, producción de semilla, incidencia y severidad de *Claviceps africana*.

Ambiente	PD (cm ⁻² d ⁻¹)	RSH (kg ha ⁻¹)	RSP (g)	SP	P100S (g)	I (%)	S (%)
A1 (3/05/05)	1.5 a	2825 a	33.0 a	1102 b	3.096 a	11.1 c	0.2 c
A2 (10/06/05)	1.4 a	2108 c	26.6 b	1269 a	2.191 c	27.2 b	1.9 a
A3 (3/04/06)	1.0 b	2567 b	27.0 b	1026 c	2.604 b	38.5 a	1.0 b
\bar{X}	1.3	2500	28.9	1132	2.630	25.6	1.0

PD = polen depositado; RSH = rendimiento de semilla ha⁻¹; RSP= rendimiento y SP = número de semillas/panoja; P100S = peso de 100 semillas; I=incidencia y S= severidad de *Claviceps africana*. Valores con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer, p = 0.05).

La mayor (p ≤ 0.05) producción de semilla/panoja se obtuvo en las relaciones 4:2, 8:2 y 12:2 (promedio de 31.2 g) y la menor en las relaciones 6:2 y 16:2 (24.8 g) (Cuadro V.4). En cuanto al rendimiento ha⁻¹, las relaciones 8:2 y 12:2 estuvieron en el grupo superior con un promedio de 2812 kg ha⁻¹. En general, la relación 4:2 destacó por su alto rendimiento/panoja, número de semillas/panoja, polen depositado/cm²/día en los surcos

hembra y baja incidencia de la enfermedad; en contraste con la relación 16:2 que mostró la mayor incidencia y los menores valores de producción de semilla y sus componentes. Por otra parte, no hubo diferencias significativas en la severidad del hongo entre relaciones (Cuadro V.4).

Cuadro V.4. Comparación entre las relaciones hembra:macho para la disponibilidad de polen, producción de semilla, incidencia y severidad de *Claviceps africana*.

Relaciones	DP	PD (cm ⁻² d ⁻¹)	RSH (kg ha ⁻¹)	RSP (g)	SP	P100S (g)	I (%)	S (%)
4:2	74,000	1.4 a	2402 b	32.5 a	1419 a	2.401 d	9.7 c	0.7 a
6:2	83,000	1.6 a	2114 c	25.5 b	1024 c	2.621 c	24.0 b	1.2 a
8:2	89,000	1.3 a	2725 a	30.6 a	1050 c	2.924 a	25.4 b	0.9 a
12:2	95,000	1.1 ab	2899 a	30.5 a	1111 b	2.728 b	35.0 a	0.8 a
16:2	99,000	0.8 b	2375 b	24.0 b	969 c	2.458 d	43.1 a	1.0 a
\bar{X}	88,000	1.2	2503	28.7	1115	2.626	27.4	0.9

DP = densidad de población; PD= polen depositado, RSH = rendimiento de semilla ha⁻¹; RSP= producción de semilla/panoja; SP = semillas/panoja; P100S = peso de 100 semillas; I = incidencia y S= severidad de *Claviceps africana*. Valores con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer, p = 0.05).

El incremento en la densidad de población de las plantas hembra se asoció con la disminución en el polen depositado cm⁻² d⁻¹ (r = -0.81*) y semillas/panoja (r = -0.78*) y con el aumento de la incidencia de *C. africana* (r = 0.98*) (Cuadro V.5). La disminución de polen depositado cm⁻² d⁻¹ en los surcos hembra estuvo asociada con el incremento de la incidencia del patógeno (r = -0.80*). A mayor rendimiento de semilla y de semillas/panoja la incidencia y severidad fueron menores (r = -0.65 y -0.84* para RSP; y r = -0.81* y -0.75*, para SP). Al aumentar el daño a la panoja (Cuadro V.5) disminuyeron el rendimiento de semilla ha⁻¹ (r = -0.62), producción/panoja (r = -0.84*) y el número de semillas (r = -0.75*). Las correlaciones entre severidad y densidad de población, cantidad de polen depositado, P100S e incidencia variaron entre 10 y 34%.

Cuadro V.5. Matriz de correlaciones entre densidad de población, disponibilidad de polen, producción de semilla, incidencia y severidad de *Claviceps africana*. Promedio de ambientes y relaciones.

Variables	PD	RSH	RSP	SP	P100S	I	S
DP	-0.81*	0.40	-0.51	-0.78*	0.28	0.98*	0.22
PD		0.38	0.31	0.35	0.15	-0.80*	0.19
RSH			0.58	0.03	0.58	0.23	-0.62
RSP				0.77*	0.23	-0.65	-0.84*
SP					-0.42	-0.81*	-0.75*
P100S						0.14	0.10
I							0.34

DP = densidad de población; PD = polen depositado; RSH = rendimiento de semilla por hectárea; RSP= rendimiento de semilla y SP = número por panoja; P100S = peso de 100 semillas; I = incidencia y S= severidad de *Claviceps africana*. *Significancia $p \leq 0.05$.

Los análisis de regresión indicaron (Figura V2) que: 1) A mayor distancia de la fuente de polen hubo menor polen depositado $\text{cm}^{-2} \text{d}^{-1}$ y semillas/panoja, aunque la tendencia de esta variable no fue lineal en la relación 16:2; 2) La producción de semilla/panoja sólo se redujo a medida que la distancia a la fuente de polen aumentó hasta la relación 8:2, pues en las relaciones 12:2 y 16:2 se mantuvo constante; y 3) La tasa de cambio de la enfermedad (incidencia) se incrementó con la distancia, y en las relaciones 12:2 y 16:2 fue dos veces mayor que en la relación 8:2. En la relación 6: 2 se obtuvo una respuesta atípica pues la producción de semilla/panoja aumentó con la distancia ($R^2 = 0.83$).

Las diferencias de 1.1 a 1.7 granos de polen depositado $\text{cm}^{-2} \text{d}^{-1}$ de los surcos ubicados a la misma distancia de la fuente de polen entre las relaciones 6:2, 8:2, 12:2 y 16:2 (Figura V.3A, B) no fueron significativas (datos no presentados), probablemente porque se consideró todo el periodo de floración en el que hubo días con contrastante grado de deposición y con diferente número de muestreos durante ese periodo. En cambio, cuando se empleó la información de los tres muestreos continuos de máxima deposición de polen para

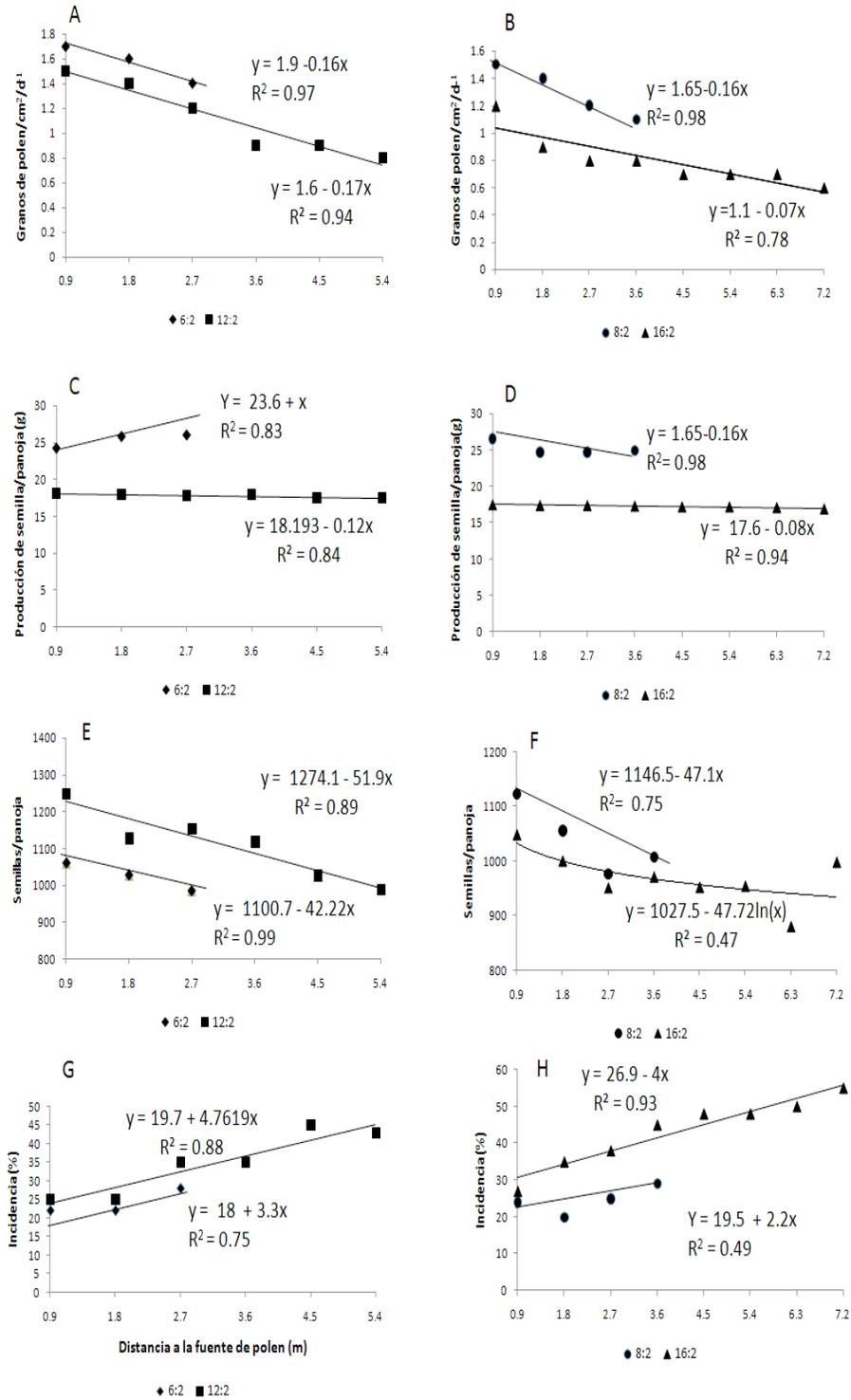


Figura V.3. Distancia a la fuente de polen durante el incremento de la línea A9 x B9 con las relaciones 6:2, 8:2, 12:2, y 16:2. Cantidad de polen depositado/cm²/día (A, B), producción de semilla/panoja (C, D), semillas/panoja (E, F) e incidencia del ergot (G, H). Los valores de 6:2 son el promedio de las fechas de siembra del 3 de mayo y 10 junio de 2005 y los de 8:2 son promedio de las fecha de siembra del 3 de mayo del 2005 y 5 de abril de 2006.

para uniformar el número de muestreos y reducir la variabilidad entre éstos, los resultados indicaron que hubo diferencias ($p \leq 0.05$) de los surcos ubicados a la misma distancia de la fuente polen entre las proporciones 4:2, 6:2, 8:2, 12:2 y 16:2 desde 0.90 m hasta 5.4 m (Cuadro V.6), en las variables: producción/panoja, número y tamaño de semilla e incidencia de *C. africana*; excepto que las diferencias no fueron estadísticas cuando la distancia fue de 5.4 m. La mayor producción/panoja (32.5 y 32.3 g), número de semillas/panoja (1397 y 1436) y la menor incidencia del patógeno (10%) se obtuvo cuando la distancia a la fuente de polen fue de 0.90 y 1.8 m en la proporción 4:2 (Cuadro V.6). Los resultados indicaron que hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de los surcos ubicados a la misma distancia de la fuente polen entre las proporciones 4:2, 6:2, 8:2, 12:2 y 16:2 desde 0.90 m hasta 5.4 m (Cuadro V6).

Cuadro V.6. Comparación de distancias a la fuente de polen dentro de cada relación A9:B9 (R) de surcos hembra:macho, para la cantidad de polen en los tres muestreos continuos de máxima deposición, rendimiento y sus componentes e incidencia de *C. africana*.

R	PDM (cm ⁻² d ⁻¹)	RSP (g)	SP	P100S (g)	I (%)	P	PDM (cm ⁻² d ⁻¹)	RSP (g)	SP	P100S (g)	I (%)
0.90 m						3.6 m					
4:2	3.8 a	32.5 a	1397 a	2.410 b	10 b	8:2	2.3 a	25.3 a	1007 b	2.711 a	29 b
6:2	3.6 a	24.3 b	1061 b	2.460 b	22 a	12:2	2.3 a	17.9 b	1118 a	2.791 a	35 b
8:2	2.9 b	26.6 b	1122 b	2.984 a	24 a	16:2	1.9 b	17.0 b	971 b	2.434 b	45 a
12:2	2.5 b	18.1 c	1248 a	2.850 a	25 a						
16:2	2.4 b	17.2 c	1048 b	2.580 b	27 a						
1.80 m						4.5 m					
4:2	3.3 a	32.3 a	1436 a	2.390 c	10 c	12:2	2.2 a	17.5 c	1027 a	2.684 a	45 a
6:2	2.9 ab	25.9 b	1028 b	2.675 b	22 b	16:2	1.5 b	17.4 a	952 b	2.419 b	48 a
8:2	2.8 ab	24.7 b	1056 b	2.911 a	20 b						
12:2	2.4 ab	18.0 c	1128 b	2.892 a	25 b						
16:2	2.2 b	17.0 c	1000 b	2.474 c	35 a						
2.27 m						5.4 m					
6:2	2.8 a	26.1 a	985 b	2.722 b	28 b	12:2	2.5 a	17.5 a	989 b	2.483 b	43 a
8:2	2.6 ab	24.7 a	977 b	2.914 a	28 b	16:2	1.5 b	17.2 a	954 b	2.391 b	48 a
12:2	2.3 b	17.8 b	1154 a	2.671 b	35 a						
16:2	2.0 b	17.4 b	951 b	2.560 b	38 a						

PDM = polen depositado en los tres muestreos de máxima deposición; RSP = rendimiento de semilla/panoja, SP = semillas/panoja; P100S = peso de 100 semillas. Valores con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer, $p = 0.05$).

V.5. DISCUSIÓN

Características de la floración del par isogénico y sincronía floral

Los genotipos de sorgo difieren en su fenología floral (Osuna-Ortega *et al.*, 2001) y patrones florales (Frederickson *et al.*, 1993) debido a la duración de la floración intra-panícula (Heiniger *et al.*, 1993) asociadas con diferencias en tipo y longitud de panoja (Pendleton *et al.*, 1994). La iniciación floral (Craufurd *et al.*, 1998), el periodo de floración y la cantidad de polen viable (McLaren, 1997) son caracteres afectados por el ambiente, en particular, por la temperatura; Morgan *et al.* (2002) clasificaron al sorgo como sensible a este factor.

Las diferencias climáticas durante los 30 d previos a la floración entre los Ambientes 1 y 2 fueron pequeñas y el Ambiente 3 fue más frío, pues en 2006 (Ambiente 3) se sembró 29 d antes que la fecha de siembra más temprana del 2005 (Ambiente 1). El Ambiente 2 se caracterizó por iniciar la floración y la antesis 7 d antes que en el Ambiente 1, y entre 9 y 15 d antes que en el Ambiente 3 (Cuadro V.1). Estas diferencias fenológicas se pueden atribuir al efecto de la temperatura, especialmente a la mínima (Osuna-Ortega *et al.*, 2001), pues es probable que el descenso de 4 °C registrado durante el periodo de 30 d pre-antesis en el Ambiente 3 haya retrasado el desarrollo floral. Sin embargo, en el Ambiente 3 la línea B produjo más polen (32 mg) que en los otros dos ambientes (16.4 mg, en promedio). Las otras diferencias que se observaron en el Ambiente 3 fueron que hubo mayor precipitación y 2 d más de lluvia, que ocasionaron que las plantas macho fueran más robustas.

La viabilidad del polen se mantuvo en 83% (Cuadro V.1) en los tres ambientes, a pesar de que en esos ambientes la temperatura mínima promedio durante 30 d pre-antesis fue 5.3 °C, con valores entre 0 y 5 °C durante 15 d, lo que ratifica la adaptación de la línea

B9 a las condiciones de los Valles Altos Centrales de México. La tolerancia del sorgo al frío pre-floración varía con el genotipo, pues la viabilidad del polen puede ser inferior a 60% aún con temperaturas superiores a 17 °C (McLaren, 1997).

En cuanto al progreso de la floración, Frederickson *et al.* (1993) clasificaron a las líneas A de sorgo, a 8 d de su inicio, en rápida (80 y 90%), moderada (75-79%) o lenta (60 a 70%); además señalaron que en el grupo de floración rápida, más del 50% de las plantas debe empezar a florecer el mismo día. En consecuencia, la línea A9 puede catalogarse de rápida floración porque a los 8 d después de iniciada todas las plantas habían florecido; en contraste, la línea B9 sería de lenta floración.

La sincronía floral es la diferencia de días a antesis entre el receptor y el donador de polen. Las mayores tasas de cruzamiento en maíz (*Zea mays* L.) han ocurrido cuando la hembra floreció 3 d antes que el macho (Bannert *et al.*, 2008). En el presente experimento, hubo diferencias entre ambas líneas en días al inicio de la floración, días a floración y periodo de floración, y aunque la magnitud dependió del ambiente, en general la línea hembra fue más precoz. Además, la máxima producción de polen no siempre coincidió con el mayor número de plantas receptoras de la línea hembra (Figura V.2). Si bien existe una alta correlación entre los días a antesis de líneas A y B ($r = 0.88^*$) (Moran *et al.*, 2002), en México no existen reportes de cuál de ellas florece primero ni información de la dinámica de la producción de polen en líneas androfértiles. En lotes de producción de semilla híbrida de sorgo puede haber de 2 a 15 d de diferencia entre floraciones (Uppuluri, 1999). En arroz (*Oryza sativa*) se considera que hay sincronización óptima cuando la línea hembra se adelanta de 2 a 3 d a la línea R (Sindhu y Kumar, 2002). En estos casos se considera deseable que la hembra esté floreciendo cuando el macho empiece a soltar polen. En el norte de Tamaulipas (30 msnm), donde las condiciones ambientales son propicias para

producir semilla híbrida de sorgo y cuando el ergot aún no se presentaba en México, el polinizador debía estar produciendo polen cuando el 5% de las flores femeninas estaban receptivas (Williams *et al.*, 1980). En consecuencia y ante los problemas que *C africana* ocasiona, es indispensable actualizar las estrategias de manejo para producir semilla híbrida. En el caso de Valles Altos los resultados indican que a pesar de ser isogénicas, es necesario adelantar la siembra de la línea macho una semana para aumentar la sincronía floral de este par A9/B9 (Figura 2).

Producción de polen (PP) y polen depositado (PD)

Entre los factores que influyen en el éxito de la polinización destacan: sincronía floral; densidad de población; producción, tamaño, transporte y supervivencia del polen (Aylor *et al.*, 2003); y compatibilidad polen-pistilo.

En este experimento la cantidad de polen se consideró suficiente para polinizar todas las flores (promedio 2000/panoja) (Capítulo I de esta tesis) de la línea A9, pues la línea B9 tuvo un periodo largo de floración (22 d), incluso superior en 10 d al de líneas restauradoras adaptadas a esta región (León *et al.*, 1998), y producir aprox. 250 mil de granos de polen diariamente por panoja (2700 granos por flor x 2000 flores por panoja/22 d). Sin embargo, la producción de polen/panoja y polen depositado contrastó entre ambientes: 14 mg y 1.5 granos $\text{cm}^{-2} \text{d}^{-1}$ en el Ambiente 1, 18 mg y 1.4 granos $\text{cm}^{-2} \text{d}^{-1}$ en el Ambiente 2 granos $\text{cm}^{-2} \text{d}^{-1}$, y 32 mg y 1.0 granos $\text{cm}^{-2} \text{d}^{-1}$ en el Ambiente 3 (Cuadros V.1 y 3); además, la mayor producción de polen no coincidió con la mayor cantidad de polen depositado.

En híbridos de maíz la cantidad de polen en polinización abierta no limita la producción de semilla pues con 100 granos de polen cm^{-2} trampeado d^{-1} se forma 95% de semillas, por lo que generalmente las fallas en la producción de semilla se deben a

problemas de sincronía floral dentro de la misma planta (Bassetti y Westgate, 1994). En el presente experimento, a pesar de que se produjo suficiente polen sólo se logró capturar de 1 a 4 granos $\text{cm}^{-2} \text{d}^{-1}$. Durante la polinización se presentaron condiciones que pudieron influir en la cantidad de polen depositado y que difieren entre ambientes, como los días de calma (hasta 6 d), los cambios de dirección del viento y el número de días con lluvia (4 a 8 d), que ocasionó que las horas efectivas de polinización se iniciaran entre 10:00 y 11:00 h y cesaran de 16:00 a 17:00 h. La velocidad de 0.4 a 0.9 m s^{-1} entre ambientes fue suficiente para mover el polen (Aylor *et al.*, 2003), pues la polinización del sorgo es anemófila. Se puede concluir que la disponibilidad de polen fue baja en relación a la cantidad producida, aunque no hay antecedentes documentales en sorgo para hacer comparaciones precisas.

A una misma distancia de la fuente de polen entre relaciones de surcos A9:B9 no hubo diferencias ($p \leq 0.05$) en la cantidad de polen depositado, cuando se evaluó todo el periodo de muestreo, lo cual puede atribuirse a la variación estacional del periodo de floración, al efecto del ambiente en la producción (McLaren, 1997), y a la dispersión y deposición del polen (Aylor, 2003), motivo por el cual resultó de mayor valor estadístico usar sólo los tres muestreos continuos con la máxima deposición en los surcos hembra.

Producción de semilla, distancia a la fuente de polen e incidencia de *C. africana*

La producción de semilla híbrida de sorgo mediante la aplicación de los sistemas de androesterilidad génico-citoplásmica requiere conocer las respuestas de las líneas progenitoras a los cambios climáticos (Uppuluri, 1999).

En el presente experimento, la combinación de siembra del 3 de mayo de 2005 con rh:m de 4:2, 6:2 y 8:2, superó en 25% a la del 10 de junio de 2005 con rh:m de 4:2 y 6:2; y en 9% a la del 3 de abril de 2006 con rh:m de 8:2, 12:2 y 16:2, en el rendimiento de semilla ha^{-1} , pues en el Ambiente 1 hubo mayores valores de producción/panoja (33 g) y tamaño de

semilla (3.096 g) con la menor (11%) incidencia de *C. africana* (Cuadro 3). Las diferencias debidas a fechas de siembra, años y relaciones de surcos hembra:macho, no son cuantificables pues sus efectos particulares están confundidos. Al analizar fechas de siembra y rh:m comparables (5 de mayo *vs.* 10 de junio de 2005 con rh:m de 4:2 y 6:2) el promedio del rendimiento ha⁻¹ de la siembra del 5 de mayo superó ($p \leq 0.05$) en 265 kg ha⁻¹ a la del 10 de junio, con tres veces menos incidencia de *C. africana* (datos no mostrados), atribuibles a que en la segunda fecha la estación de crecimiento se alargó 20 d pues durante la post-floración se registraron temperaturas mínimas promedio de 3.5°C *vs.* 6.8 °C de la primera fecha. El efecto del año con rh:m también comparables, fue más evidente en la incidencia de *C. africana*: 13% en 2005 *vs.* 37% en 2006, quizás debido a la conjunción de tres factores en 2006 respecto al 2005: menor cantidad de polen depositado, mayor diferencial de floración entre progenitores (7 d) y menor temperatura prefloración.

Respecto a las relaciones de surcos hembra:macho, el objetivo práctico fue maximizar la producción de semilla con una mínima proporción del polinizador (Uribelarrea *et al.*, 2002). La relación 12:4 es una de las más usuales en lotes comerciales de producción de semilla, aunque es posible también emplear la relación 6:2 (Uppuluri, 1999), en función de los progenitores involucrados, o si se trata de incrementar también la línea A o solamente de obtener la F1 (A x R). En el primer caso suele usarse menor número de plantas hembras (8:4 ó 4:2), mientras que en el segundo la relación aumenta (12:4, 16:4 o 18:6) (Williams *et al.*, 1980). La incidencia actual del ergot obliga a aumentar el número de surcos machos o reducir la distancia a la fuente de polen. En la relación 8:4 los surcos ubicados a 3 m de la fuente de polen presentaron entre 42 y 66% de plantas enfermas con un daño a la panoja de 20%, aunque los resultados pueden variar entre líneas A (Hernández-Martínez *et al.*, 2006). En el presente experimento las relaciones 4:2 y 8:2

presentaron los mejores rendimientos de semilla de la línea A9 con la menor incidencia del patógeno (10 y 24%) (Cuadro V.4). En la relación 16:2 se obtuvieron 24 g de semilla/panoja con 969 semillas y 43% de incidencia del hongo; lo que ratifica que el aumento del número de surcos hembra disminuye la producción de semilla/panoja y aumenta la incidencia de ergot, aunque no hubo diferencias significativas en la severidad del patógeno (Cuadro V.4) entre relaciones. Los bajos niveles de severidad registrados pueden atribuirse a una baja concentración del inóculo (Frederickson *et al.*, 1993). Además, la expresión de la enfermedad en condiciones naturales difiere con la observada bajo inoculación artificial (Wang *et al.*, 2000), situación en la que la mayoría de los estudios se han efectuado.

Los rendimientos de 2114 y 2899 kg ha⁻¹ con una incidencia del 10 al 42% y una severidad de 1% (Cuadro V.4) son similares (2000 a 3000 kg ha⁻¹) a los de casos en los que la enfermedad se controló (Frederickson *et al.*, 1993); y proporcionalmente también semejantes a casos en los que se añadieron dos surcos donadores de polen (relación 8:4) (3749 kg ha⁻¹) (Hernández-Martínez *et al.*, 2006). El daño a la panoja (1 a 2%, equivalente a 10 a 20 flores enfermas/panoja) se considera un efecto agronómico pequeño, pero de amplia repercusión fitopatológica pues constituye una fuente permanente de inóculo; además, en México ya se ha detectado variación genotípica y fenotípica de *C. africana* (Pecina *et al.*, 2007), lo cual es un indicio de la creciente adaptación del patógeno.

V.6. CONCLUSIONES

Entre los progenitores A9 y B9 hubo diferencias a antesis de 1 a 11 d en función del ambiente, pero la línea hembra fue siempre más precoz. La viabilidad del polen en promedio fue 83% con temperaturas mínimas prefloración de 5 y 9°C. La mayor producción de semilla se obtuvo en las siembras de abril de 2006 y mayo de 2005 con 2.6 y

2.8 t ha⁻¹ combinadas con las relaciones 8:2 y 12:2 (2.7 y 2.9 t ha⁻¹). En la relación 4:2 se obtuvo la mayor producción de semilla/panoja (32.5 g) y la menor incidencia del patógeno (10%). La presencia del *C. africana* en las líneas A (11 a 38% entre ambientes, y 10 a 43% entre relaciones) fue favorecida por las diferencias en el progreso de la floración y por la asincronía floral entre el par A9/B9, por la baja cantidad de polen depositado (1 a 4 granos cm⁻² d⁻¹), y la mayor distancia a la fuente de polen.

V.7. LITERATURA CITADA

- Aylor, D. E., N. P. Schultes, and E. J. Shields. 2003. An aerobiological framework for assessing cross-pollination in maize. *Agric. and For. Meteorol.* 119: 111-129.
- Bandyopadhyay, R., D. E. Frederickson, N. W. McLaren, G. N. Odvody and M. J. Ryley. 1998. Ergot: A new disease threat to sorghum, in the Americas and Australia. *Plant Dis.* 82: 356-367.
- Bannert, M., A. Vogler, and P. Stamp. 2008. Short-distance cross-pollination of maize in a small-field landscape. *Eur. J. Agron.* 29: 21-29.
- Bassetti, P., and M. E. Westgate. 1994. Floral asynchrony and kernel set in maize quantified by image analysis. *Agron. J.* 86: 699-703.
- Craufurd, P. Q., A. Qi, R. H. Ellis, R. J. Summerfield, E. H. Roberts, and V. Mahalakshmi. 1998. Effect of temperature on time to panicle initiation and leaf appearance in sorghum. *Crop Sci.* 38: 942-947.
- Frederickson, D. E., P. G. Mantle, and W. A. J. de Milliano. 1993. Windborne spread of ergot disease (*Claviceps africana*) in sorghum A-lines in Zimbabwe. *Plant Pathol.* 42: 368-377.
- Heiniger, R. W., R. L. Vanderlip, and K. D. Kofoid. 1993. Influence of pollination pattern on intrapanicle caryopses weight in sorghum. *Crop Sci.* 33: 549-555.
- Hernández-Martínez, M., Mendoza-Onofre, L. E., P. Ramírez Vallejo, and E. Cárdenas-Soriano. 2006. Incidence and severity of ergot (*Claviceps africana* Frederickson, Mantle and de Milliano) in two male-sterile sorghum lines as a function of distance from pollen source and its impact on seed production and quality. *Seed Sci. Technol.* 34: 393-402.

- León V., H., L. E. Mendoza O., M. Livera M., and A. Estrada G. 1998. Phenology, seed yield and seed quality of cold tolerant sorghum restorer lines. *Agrociencia* 32: 339-347.
- McLaren, N. W. 1997. Changes in pollen viability and concomitant increase in the incidence of sorghum ergot with flowering date and implications in selection for escape resistance. *J. Phytopathol.* 145: 261-265.
- McLaren, N. W. 2002. Genotype x environment effects on the response of sorghum to ergot and repercussions for disease screening. *In: Sorghum and Millets Diseases*. Leslie, J. F (ed.). Iowa State Press. pp: 95-101.
- Meinke, H., and M. Ryley. 1997. Effects of sorghum ergot on grain sorghum production: a preliminary climatic analysis. *Aust. J Agric. Res.*, 48:1241-7.
- Mendoza-Onofre L. E, M. Hernández-Martínez, E. Cárdenas-Soriano, and P. Ramírez-Vallejo. 2006. Cold-Tolerant sorghum germplasm as a potential source to ergot (*Claviceps africana* Frederickson, Mantle & de Milliano) tolerance. *Agrociencia* 40: 593-603.
- Moran, L. J., W. L. Rooney, R. A. Frederiksen, and G. N. Odvody. 2002. Differences in ergot vulnerability among sorghum genotypes and the relationship between stigma receptivity and ergot vulnerability. *In: Sorghum and Millets Diseases*. Leslie, J. F. (ed.). Iowa State Press. pp: 113-120.
- Morgan, P. W., A. S. A. Finlayson, K. L. Childs, J. E. Mullet, and W. L. Rooney. 2002. Opportunities to improve adaptability and yield in grasses. Lessons from sorghum. *Crop Sci.* 42:1791-1799.
- Osuna-Ortega, J., L. E. Mendoza-Onofre, F. Castillo-González, V. A. González-Hernández, Ma. del C. Mendoza-Castillo, H. Williams-Alanís y M. Hernández-Martínez. 2001. Potential of cold tolerant germplasm in the adaptation and adaptability of grain sorghum in Mexico: II. Rio Bravo, Tamaulipas; and Celaya, Guanajuato. *Agrociencia* 35: 635-636.
- Osuna-Ortega, J., Ma. del C. Mendoza-Castillo, and L. E. Mendoza-Onofre. 2003. Sorghum cold tolerance, pollen production, and seed yield in the Central High Valleys of Mexico. *Maydica* 48: 125-132.

- Parh, D. K., D. R. Jordan, E. A. B. Aitken, B. J. Gogel, C. L. McIntyre, and I. D. Godwin. 2006. Genetic components of variance and role of pollen traits in sorghum ergot resistance. *Crop Sci.* 46: 2387-2395.
- Pecina Q., V., N. Montes G., H. Williams A. S. Hernández D., N. Mayek P. y L. K. Prom. 2007. Diversidad genética de aislamientos de cornezuelo (*Claviceps africana* Frederickson, Mantle y de Milliano) de sorgo [(*Sorghum bicolor* (L.) Moench.] en México. *Rev. Mex. Fitopat.* 25: 43-47.
- Pendleton, B., B. G. Teetes, and C. G. Paterson. 1994. Phenology of sorghum flowering. *Crop Sci.* 34: 1263-1266.
- Sindhu, J. S., and I. Kumar. 2002. Quality seed production in hybrid rice. *In: Sustainable Rice Production for Food Security*. Proc. 20th International Rice Commission, Bangkok, Thailand, 23-26 July 2002. 306 p.
- SAS. 2002. SAS/SAT. Versión 9.1. SAS Inst. Cary. NC. USA. Versión en línea (<http://www.colpos.mx/servicios/sas/indexs.htm>).
- Uppuluri, R. M. 1999. Hybrid seed production in sorghum. *In: Heterosis and Hybrid Seed Production in Agronomic Crops*. Basra, A. S. (ed.). Food Products Press, Chennai, India. pp: 119-145.
- Uribelarrea, M., J. Cárcova, M. E. Otegui, and M. E. Westgate. 2002. Pollen production, pollination dynamics and kernel set in maize. *Crop Sci.* 42: 1910-1918.
- Williams A., H., H. Torres M. y P. Barza, S. 1980. Producción de Semilla de Sorgo. INIFAP, México. pp: 22-46.
- Wang, E., H. Meinke, M. Ryley, D. Herde, and R. Henzell. 2000. On the relation between weather variables and sorghum ergot infection. *Aust. J. Agric. Res.* 51: 313-324.

CONCLUSIONES GENERALES

Las líneas experimentales de sorgo (*Sorghum bicolor* [Moench]) tolerantes al frío presentan diferencias en sus características florales. El grupo de líneas R, comparado con el grupo isogénico (A/B), fue más tardío y tuvo mayor número de flores por panoja, y rendimiento de semilla; además, en comparación con el grupo de líneas B, produjo más granos de polen, de menor tamaño y con mayor viabilidad. Entre el grupo de líneas A y el de las líneas B no hubo diferencias significativas para la mayoría de las características morfológicas de la panoja pero sí para las de tipo reproductivo. Las variables morfológicas interaccionaron menos con el ambiente que las reproductivas. La producción de polen viable de las líneas B utilizado en las polinizaciones manuales no fue determinante en la menor producción de semilla de las líneas A. Sin embargo, la incidencia de temperaturas mínimas (3.5 a 8.4 °C) pudieron haber disminuido la receptividad de los estigmas en los tres tipos de líneas.

La variabilidad fenotípica del pistilo y del diámetro del polen fue atribuida al genotipo; pero en la producción y viabilidad del polen también influyeron las variaciones ambientales inherentes a los años (*i. e.*, temperatura) y la interacción genotipo por ambiente. La viabilidad del polen fue la variable más relacionada con la germinación del polen y elongación el tubo polínico. La receptividad del estigma no estuvo asociada con su morfología. La compatibilidad polen-pistilo en las cruzas isogénicas (A x B) fue buena en las etapas pre- y post fertilización aún en presencia de temperaturas mínimas promedio entre 6 y 8 °C durante la polinización, pues el rendimiento de semilla varió entre 7 y 12 g/panoja. Las diferencias en la producción de semilla entre las cruzas manuales A x B no dependen de la cantidad y viabilidad del polen. Se sugiere investigar el aborto de ovarios fecundados.

En polinización e inoculación controlada, la presencia de *Claviceps africana* disminuyó la receptividad del estigma, el rendimiento y sus componentes, pero la respuesta depende del par isogénico. En promedio de las cruzas, hubo 11% de flores enfermas, 365 semillas por panoja inoculada y 498 en aquéllas sin inocular. En las plantas inoculadas, la crusa A9 x B9 sobresalió por su rendimiento (14.7 g/panoja) y baja frecuencia (9%) de flores enfermas. La crusa A3 x B3 presentó la menor reducción (17%) en las variables relacionadas con la receptividad del estigma (número de granos de polen en el estigma y número de tubos polínicos en estigma, estilo y ovario) y 11% de flores enfermas.

La interacción entre el polen-conidio determina si los ovarios serán fertilizados o colonizados, por lo que el tiempo de arribo al estigma es crítico ya que el patógeno redujo la receptividad del estigma en la crusa A9 x B9; la mayor reducción (40 a 60%) ocurrió cuando se polinizó e inoculó en forma simultánea, sin importar si el polen o el conidio llega primero. La ruta de crecimiento del tubo polínico fue la única vía de infección. Los tratamientos primero inoculados tuvieron en promedio 60% más flores enfermas y reducciones de 36, 30 y 8% en el rendimiento, número y tamaño de la semilla, respecto a los primero polinizados.

En campo y polinización abierta hubo diferencias en los días a antesis y periodo de floración entre los progenitores de la crusa A9 x B9; el progreso de la floración fue más rápido en la línea A9 que B9. La cantidad de polen producido por la línea mantenedora (fétil) varió durante el periodo de floración y el polen depositado en los surcos de la línea materna (A9) fue inversamente proporcional a la distancia a la fuente de polen. La producción de semilla/panoja; número de semillas/panoja; y el polen depositado disminuyeron a medida que la distancia a la fuente fue mayor, mientras que la incidencia de la enfermedad aumento, sin embargo la severidad se mantuvo constante en niveles

inferiores al 2%. Los mayores rendimientos se obtuvieron en las fechas de siembra de abril y mayo (2.6 y 2.8 t ha⁻¹); y en las proporciones 8:2 y 12:2 (2.7 y 2.9 t h⁻¹).

Es necesario: 1) Evaluar el efecto materno y paterno en la compatibilidad polen-estigma en la producción de semilla en cruzas A x B y A x R; 2) explorar el umbral y la tolerancia las temperaturas inferiores a 12 °C en la madurez del estigma de sorgo en los tres tipos de líneas, además de su efecto en la interacción polen-estigma, viabilidad de los conidios y el desarrollo del proceso patogénico de *C. africana*; 3) identificar el mecanismo de reconocimiento entre el polen-estigma y hospedero-patógeno, el momento de activación y si está asociado con la madurez del estigma; con base en los resultados aquí expuestos se postula que el mecanismo es común; y 4) conocer las relaciones entre la producción, dispersión y deposición del polen *vs.* los cambios diurnos de la intensidad y duración del viento; humedad relativa y temperatura ambiente durante el periodo de floración en líneas fértiles e híbridos.