



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

PRODUCCIÓN DE SEMILLA, DISTANCIA A LA
FUENTE DE POLEN Y CARACTERIZACIÓN DE
LÍNEAS A Y DE CRUZAS AxB DIRECTAS Y
RECÍPROCAS DE SORGO

CESAR REBOLLAR AVILA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

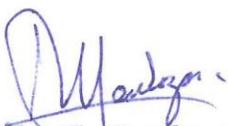
2018

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

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Cesar Rebollar Avila, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Leopoldo E. Mendoza Onofre, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Producción de semilla, distancia a la fuente de polen y caracterización de líneas A y de cruzas AxB directas y recíprocas de sorgo y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a _____ de Enero de 2018


Firma del
Alumno (a)


Dr. Leopoldo E. Mendoza Onofre
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada “**Producción de semilla, distancia a la fuente de polen y caracterización de líneas A y de cruzas AxB directas y recíprocas de sorgo**”, realizada por el alumno **Cesar Rebollar Avila**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado:

MAESTRO EN CIENCIAS

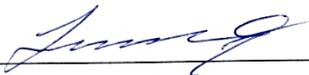
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. LEOPOLDO E. MENDOZA ONOFRE

ASESORA: 
DRA. HILDA V. SILVA ROJAS

ASESOR: 
DR. LEOBIGILDO CÓRDOVA TÉLLEZ

ASESORA: 
DRA. MA. EUGENIA CISNEROS LÓPEZ

Montecillo, Texcoco, Edo. de México, enero de 2018

**PRODUCCIÓN DE SEMILLA, DISTANCIA A LA FUENTE DE POLEN Y
CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS A Y DE CRUZAS AxB DIRECTAS Y RECÍPROCAS
DE SORGO**

Cesar Rebollar Avila, M en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

La producción de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] en la región de los Valles Altos Centrales de México (VACM) constituye una alternativa para la diversificación de los cultivos en esta zona. Los objetivos del presente estudio fueron: 1) Caracterizar morfológica y fenológicamente líneas A y cruzas directas y recíprocas AxB no isogénicas; 2) Evaluar la influencia de la distancia a la fuente de polen en el rendimiento de semilla híbrida según la proporción de surcos hembra:macho; 3) Identificar, mediante reconstrucción filogenética, las especies de hongos y bacterias aisladas de tejido foliar de líneas A y de cruzas directas y recíprocas AxB no isogénicas; y determinar la presencia de los genes de hipersensibilidad (HrcV) en las bacterias. La línea A1 fue la más tardía, con mayor periodo de la floración, mayor número de semillas por panoja y panojas más largas. La línea A2 presentó el mayor rendimiento de semilla híbrida, menor porte y menor diámetro de tallo. La línea A5 fue la más precoz, con mayor excursión, menor longitud y ancho de panoja y menor rendimiento de semilla híbrida. La línea A9 tuvo el menor período de floración y menor número de semillas, mayor porte y diámetro de tallo. La producción de polen de la línea R19 fue suficiente para polinizar a las plantas de los surcos hembra aún en proporciones de 16:2. En general, la respuesta agronómica de las cruzas directas y recíprocas fue similar, aunque el rendimiento de semilla híbrida

de las cruzas fue mayor que el de las líneas. En los hongos se obtuvo un árbol filogenético; la especie *F. thapsinum* fue la más frecuente en todas las cruzas y líneas, y estuvo presente en limbos y vainas; *F. circinatum*, *F. temperatum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum* y *Curvularia trifolii* solo en limbos. Con las secuencias de bacterias se construyeron dos árboles, uno para *Pseudomonas* y otro para las demás especies. La especie más frecuente fue *Pseudomonas* sp., en limbos, brotes laterales y limbos ondulados. Se identificó una posible nueva especie de *Pseudomonas*. Se detectó el gen HrcV en once aislamientos de sorgo. Ninguna de estas especies ha sido reportada en sorgo en la región de VACM por lo que se recomienda evaluar su potencial patogénico en el programa de mejoramiento genético de sorgo tolerante al frío.

Palabras clave: *Sorghum bicolor* (L) Moench, bacterias, cruzas directas y recíprocas, hongos, proporciones hembra:macho, rendimiento de semilla.

**SEED PRODUCTION, DISTANCE TO THE SOURCE OF POLLEN AND
CHARACTERIZATION OF A_LINES AND AxB DIRECT AND RECIPROCAL
CROSSES OF SORGHUM**

Cesar Rebollar Avila, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Grain sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] production in the Mexican Highlands is an alternative for the diversification of crops in this area. The objectives of the present study were: 1) To characterize A_lines and direct and reciprocal non-isogenic AxB crosses for morphological and phenological traits; 2) To evaluate the effect of the distance to the pollen source on hybrid seed yield according to the proportion of female:male rows; 3) To identify, through phylogenetic reconstruction, fungal and bacterial species isolated from leaf tissue of A_lines and direct and reciprocal non-isogenic AxB crosses; as well as to determine the presence of hypersensitivity genes (HrcV) in bacteria. Line A1 was a late flowering line, with the longest period of flowering, the greatest number of seeds per panicle and longest panicle length. Line A2 produced the highest hybrid seed yield, with small plant height and reduced stem diameter. The A5 line was an early flowering line, with long exertion, panicles were small and narrow and its hybrid seed yield was low. Line A9 had the shortest flowering period and the lowest number of seeds, largest plant height and wide stem diameter. The pollen production of the R19 line was high enough to pollinate the female plants even in a 16:2 proportion of female:male rows. In general, the agronomic response of the direct and reciprocal crosses was similar, although hybrid seed yield of the crosses was greater than that of

the lines. As for the fungi, only one phylogenetic tree was obtained; the species *F. thapsinum* was the most frequent in all the crosses and lines, and it was present in leaf blades and leaf sheaths; *F. circinatum*, *F. temperatum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum* and *Curvularia trifolii* were present only in leaf blades. Sequences of bacteria produce two trees; one was for *Pseudomonas* and the other for the other species. The most frequent species was *Pseudomonas* sp., in leaf blades, lateral shoots and in the undulations in the edges. A possible new species of a *Pseudomonas* was identified. The HrcV gene was detected in eleven sorghum isolates. None of these species has been reported in sorghum in the Mexican Highlands, so it is recommended to evaluate their pathogenic potential in the sorghum breeding program for cold tolerance.

Key words: *Sorghum bicolor* (L) Moench, bacteria, direct and reciprocal crosses, fungi, female proportions female:male, seed yield.

AGRADECIMIENTOS

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

Al **Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo** por haberme dado la oportunidad de realizar esta investigación y formarme como profesionista.

Al **Pueblo de México**, ya que hace posible la existencia y permanencia de instituciones públicas de educación superior.

Al **Dr. Leopoldo E. Mendoza Onofre** que me brindó su apoyo profesional y humano durante todo este proceso, por sus consejos que me han servido de mucho y sé que lo seguirá haciendo; gracias por la paciencia, el empeño y sobre todo el tiempo que puso en mí para que este trabajo se llevara a cabo.

Al **Dr. Leobigildo Córdova Téllez** y a la **Dra. Ma. Eugenia Cisneros López** por sus aportes realizados a mi tesis y sus consejos que mucho ayudaron a la culminación de dicho trabajo.

A la **Dra. Hilda V. Silva Rojas** por brindarme su apoyo en la realización de esta tesis, por sus aportaciones, comentarios y su dedicación por enseñar a los demás.

Al equipo de trabajo del **Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del Colegio de Postgraduados: Ing. José Manuel Aguirre Rayo, Biól. Jazmín Lavín Castañeda, Biól. María Concepción**, Gracias.

Al **Ing. Eduardo E. Domínguez Caballero**, por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

A la Sra. **Rita Elizabeth Velázquez Castro**, por su apoyo incondicional durante todo este tiempo compartido y por formar parte de esta tesis.

A todos ellos y demás personas que participaron de manera directa e indirecta en la elaboración de esta tesis **¡¡¡Muchas Gracias!!!**

DEDICATORIA

A **María de Jesús López Luis**, por lo dulce que se volvió la vida cuando llegaste, por mostrarme que hay cosas en la vida que no debo de perderme, por tu compañía, por ser esa chispa que hace que todo tu entorno cambie a pesar de los malos momentos, por eso y muchas cosas más que de ti he aprendido...

A mi mamá **Imelda Avila Flores**, por darme la vida, porque siempre has estado conmigo en las buenas y en las malas, por tener una palabra de aliento para mí...

A mis hermanos **Zuleima, Jorge y Adelina** que son la fortaleza de mis logros...

A todos ellos **!!!Gracias!!!**

**La agricultura es la profesión propia del sabio,
la más adecuada al sencillo, y la ocupación
más digna para todo hombre libre.**

Marco Tulio Cicerón

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE CUADROS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
REVISIÓN DE LITERATURA	2
1. El cultivo de sorgo.....	2
2. Aspectos básicos de la genotecnia del sorgo	3
3. Líneas de sorgo	3
4. Producción de híbridos	4
5. Enfermedades.....	4
JUSTIFICACIÓN	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
OBJETIVO GENERAL	6
Objetivos particulares	6
HIPÓTESIS GENERAL	6
Hipótesis particulares.....	6
LITERATURA CONSULTADA	7
CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS A, CRUZAS DIRECTAS Y RECÍPROCAS Ax_B, E INFLUENCIA DE LA DISTANCIA A LA FUENTE DE POLEN EN EL RENDIMIENTO DE SEMILLA DE SORGO[†]	9
I.1 RESUMEN	9
I.2 SUMMARY	10
I.3 INTRODUCCIÓN	11
I.4 MATERIALES Y MÉTODOS	13
I.4.1 Año 2015	13
I.4.1.1 Caracterización agronómica de los progenitores femeninos.....	13
I.4.1.2 Influencia de la distancia a la fuente de polen	14

I.4.1.3 Producción de polen de la línea restauradora.....	15
I.4.2 Año 2016	15
I.4.3 Análisis estadísticos.....	16
I.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
I.5.1 Caracterización de los progenitores femeninos en el año 2015	17
I.5.1.1 Días a floración y periodo de la misma	17
I.5.1.2 Altura de planta y diámetro del tallo	19
I.5.1.3 Longitud de panoja, ancho de panoja y excursión.	20
I.5.1.4 Rendimiento de semilla y número de semillas por panoja	23
I.5.1.5 Influencia de la distancia a la fuente de polen	25
I.5.1.6 Rendimiento de semilla de genotipos y de las proporciones de surcos H:M en el año 2015.....	25
I.5.1.7 Producción de polen diario y acumulado	26
I.5.2 Rendimiento y número de semillas por panoja por surco en el año 2016.....	27
I.5.2.1 Producción de polen diario y acumulado en el año 2016.....	29
I.6 CONCLUSIONES	30
I.7 AGRADECIMIENTOS.....	30
I.8 LITERATURA CONSULTADA	30
CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE HONGOS ASOCIADOS A ENFERMEDADES FOLIARES EN LÍNEAS A y EN CRUZAS DIRECTAS y RECÍPROCAS AxB DE SORGO.....	33
II.1 RESUMEN	33
II.2 SUMMARY.....	34
II.3 INTRODUCCIÓN	35
II.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
II.4.1 Año 2015	37
II.4.1.1 Colecta de plantas sintomáticas	38
II.4.2 Año 2016	39
II.4.3 Identificación filogenética: Siembra y aislamiento de hongos	39
II.4.3.1 Extracción de DNA.....	39
II.4.3.2 Amplificación por PCR del operón ribosomal.....	40

II.4.3.3 Secuenciación Sanger	41
II.4.3.4 Análisis filogenético.....	42
II.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
II.5.1 Hongos aislados por genotipo en el año 2015	43
II.5.2 Hongos aislados por genotipo en el año 2016	44
II.5.3 Árbol filogenético.....	47
II.6 CONCLUSIONES	48
II.7 AGRADECIMIENTOS.....	50
II.8 LITERATURA CONSULTADA	50
CAPÍTULO III. IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A ENFERMEDADES FOLIARES EN LÍNEAS A y EN CRUZAS DIRECTAS y RECÍPROCAS AxB DE SORGO	57
III.1 RESUMEN	57
III.2 SUMMARY.....	58
III.3 INTRODUCCIÓN	59
III.4 MATERIALES Y MÉTODOS	61
III.4.1 Año 2015	61
III.4.1.1 Colecta de plantas sintomáticas	62
III.4.2 Año 2016	62
III.4.3 Identificación filogenética	62
III.4.3.1 Siembra y aislamiento de bacterias	62
III.4.3.2 Extracción de DNA.....	63
III.4.3.3 Amplificación por PCR del operón ribosomal.....	63
III.4.3.4 Detención del gen de hipersensibilidad HrcV.....	64
III.4.3.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	64
III.4.3.6 Secuenciación Sanger	65
III.4.3.7 Análisis filogenético.....	65
III.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
III.5.1 Bacterias aisladas por genotipo en el año 2015	66
III.5.2 Año 2016	67
III.5.3 Árbol filogenético.....	69

III.6 CONCLUSIONES	74
III.7 AGRADECIMIENTOS	74
III.8 LITERATURA CONSULTADA	75
CONCLUSIONES GENERALES	80

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO I		Página
Cuadro I.1	Medias y desviación estándar de variables fenológicas, morfológicas y rendimiento de semilla de 14 genotipos de sorgo en el año 2015.....	18
Cuadro I.2	Promedio de los días a la floración y periodo de la misma, de líneas A y de cruzas AxB no isogénicas directas y recíprocas de sorgo en año 2015.....	18
Cuadro I.3	Altura y diámetro promedio de líneas A y de cruzas AxB no isogénicas directas y recíprocas de sorgo en el año 2015.....	21
Cuadro I.4	Promedio de la longitud (cm), ancho (cm) y excursión (cm) de las panojas de líneas A y de cruzas AxB no isogénicas directas y recíprocas de sorgo en al año 2015.....	23
Cuadro I.5	Rendimiento de semilla y número de semillas por panoja (g) de líneas A y de cruzas AxB no isogénicas directas y recíprocas de sorgo en el año 2015.....	24
Cuadro I.6	Significancia de las fuentes de variación (FV) para el rendimiento de semilla por panoja por surco (RSPS) en al año 2015.....	25
Cuadro I.7	Promedio del rendimiento de semilla por panoja y por surco (g) de cada genotipo en cuatro proporciones de surcos hembra:macho (PSHM) en el año 2015.....	27
Cuadro I.8	Significancia de las fuentes de variación (FV) para el rendimiento de semilla (RSPS) y número de semillas (NSPS) por panoja por surco en el año 2016.....	28
Cuadro I.9	Rendimiento de semillas por panoja (g) de tres genotipos y dos densidades de plantas de sorgo en el año 2016.....	29
CAPÍTULO II		
Cuadro II.1	Hongos fitopatógenos aislados en líneas A y en cruzas recíprocas y directas AxB de sorgo en el año 2015.....	44

	Página
Cuadro II.2 Hongos fitopatógenos aislados en limbos foliares en líneas A de sorgo evaluadas en los Valles Altos Centrales de México en el año 2016.....	45
CAPÍTULO III	
Cuadro III.1 Bacterias fitopatógenas aisladas en los genotipos de sorgo en el año 2015.....	68
Cuadro III.2 Bacterias fitopatógenas aisladas en limbos de hojas de líneas A de sorgo en el año 2016.....	69

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I		Página
Figura I.1	Producción de polen diario (PD) y acumulado (PA) del progenitor masculino R19 en el año 2015.....	28
Figura I.2	Producción de polen diario (PD) y acumulado (PA) del progenitor masculino en el año 2016.....	29
CAPÍTULO II		
Figura II.1	Síntomas observados en progenitores femeninos de sorgo sembrados en Montecillo, Estado de México. A) Estrías de color rojo o púrpura en limbos; B) Presencia de puntos negros o rojos; o lesiones con bordes irregulares en vainas foliares.....	38
Figura II.2	Árbol filogenético construido con secuencias correspondientes a la región del Espacio Transcrito Interno del rDNA mediante inferencia bayesiana.....	49
CAPÍTULO III		
Figura III.1	Síntomas observados en híbridos de sorgo sembrados en la región de Valles Altos Centrales de México. A) Síntomas de estrías cloróticas en limbos, B) Proliferación de brotes laterales y ondulamientos en el borde de los limbos.....	62
Figura III.2	Árbol filogenético construido con el método de Maximum-likelihood con secuencias correspondientes a la subunidad pequeña del DNA ribosomal 16S rDNA de <i>Pseudomonas</i> spp. Los valores de la probabilidad Bayesiana superior a 0.90, se muestran en las ramas. La desviación estándar después de 5 millones de generaciones fue de 0.007568. <i>Acinetobacter oryzae</i> se considera fuera de grupo.....	72
Figura III.3	Árbol filogenético construido con el método de Maximum-likelihood con secuencias correspondientes a la subunidad pequeña del DNA ribosomal 16S rDNA de <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Bacillaceae</i> , <i>Sanguibacteraceae</i> , <i>Alcaligenaceae</i> , <i>Stenotrophomonas</i> y	

Sphingobacteriaceae. Los valores de la probabilidad Bayesiana superior a 0.90, se muestran en las ramas. La desviación estándar después de 5 millones de generaciones fue de 0.006392. *Halobacterium rubrum* se considera fuera de grupo..... 73

INTRODUCCIÓN GENERAL

El sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench) es el quinto cultivo más importante entre los cereales del mundo después del arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), maíz (*Zea mays* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) (FAOSTAT, 2017). En México, el sorgo es un cereal de importancia económica, ya que es fuente alimenticia del sector pecuario. Entre los principales estados productores se encuentran Tamaulipas, Guanajuato, Sinaloa, Nayarit y Jalisco (SIAP, 2017).

En el mejoramiento genético del sorgo se utiliza el sistema de androesterilidad genético-citoplásmica para generar híbridos simples e híbridos trilineales. En este sistema intervienen tres tipos de líneas, denominadas A, B y R. Las líneas A y B son isogénicas excepto que la línea A es androestéril (su citoplasma induce la androesterilidad) y la línea B es androfértil. La línea R (denominada “restauradora”) también es androfértil con citoplasma normal y con genes nucleares que restauran la fertilidad de la F1 de la cruce AxR (House, 1982). Los progenitores femeninos de los híbridos simples son las líneas A. En los híbridos trilineales los progenitores femeninos son híbridos simples androestériles producto del cruzamiento entre una línea A x una línea B no isogénica (Patanothai y Atkins, 1974).

La producción de semilla híbrida simple y trilineal de sorgo se efectúa en lotes aislados en los que se siembran alternadamente surcos del progenitor femenino (línea A o la cruce simple AxB no isogénica) con surcos del progenitor masculino (línea R). La proporción de surcos de líneas hembra:macho depende de varios factores, como: la capacidad de producción de polen de la línea R, la sincronía y duración de las floraciones

de ambos progenitores, el porte de las líneas, y la dirección y velocidad del viento (Zanovello, 2008; Milton y Sleper, 2002).

Los híbridos de sorgo pueden ser susceptibles a ciertos patógenos o enfermedades, lo que provoca la disminución en el rendimiento de semilla o demerita la calidad de la misma. En los Valles Altos Centrales de México aún no existen siembras comerciales de sorgo; sin embargo, en las siembras experimentales de sorgo en esta región, se ha detectado la presencia de *Fusarium verticillioides* (Cisneros *et al.*, 2007), y *Claviceps africana* (Cisneros-López y Mendoza-Onofre, 2010). También se han observado plantas con presencia de royas, tizones, bordes de limbos arrugados y proliferación de ramas axilares que se supone están relacionados con enfermedades causadas por hongos; otros síntomas se relacionan con una bacteria denominada *Pantoea agglomerans* (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007), sin embargo, se desconoce la incidencia y severidad de otras enfermedades en genotipos tolerantes al frío sembrados en Valles Altos.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. El cultivo de sorgo

El sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench) es el sexto cultivo más importante entre los cereales del mundo después del arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), soya (*Glicine max* L.), maíz (*Zea mays* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.). Los principales países productores de esta especie son Estados Unidos de América (EUA), India, Argentina, China, México, Nigeria y Sudán. La producción de sorgo en México se destina principalmente para alimento animal; mientras que en Asia y África el grano es importante como alimento humano (FAOSTAT, 2014).

En México, el sorgo representa uno de los granos y forrajes más importantes, ya que es el principal ingrediente en raciones alimenticias en el sector pecuario. En el año 2016 se sembraron 1.5 millones de hectáreas aproximadamente, con un volumen cercano a 2.9 millones de toneladas anuales, y un rendimiento promedio entre 3.7 y 3.9 t ha⁻¹ (SIAP, 2017).

2. Aspectos básicos de la genotecnia del sorgo

El sorgo es una especie autógama, es decir, de manera natural la semilla producida por una panoja proviene de autofecundación. Sin embargo, los agricultores sorgueros generalmente disponen de dos tipos de variedades para su siembra: las variedades de polinización libre y los híbridos. Las primeras son aquellas cuya semilla se obtiene mediante la cosecha de plantas de la misma población inicial, cuya identidad genética se mantendrá de generación en generación, pues esa semilla proviene de autofecundación. En cambio, la semilla de los híbridos corresponde a la F1 resultado del cruzamiento “dirigido” entre progenitores de constitución genética diferente, por lo que en cada ciclo agrícola deberá adquirirse semilla F1.

3. Líneas de sorgo

Para producir semilla híbrida de sorgo, de manera económicamente comercial, se utiliza el sistema de androesterilidad genético-citoplásmica. En este sistema intervienen tres líneas, denominadas A, B y R. Las líneas A y B son isogénicas excepto que la línea A es androestéril (su citoplasma induce la androesterilidad) y la B es androfértil (su citoplasma es normal y el núcleo no contiene genes de restauración de la fertilidad); de tal forma que la progenie de la cruce A x B es androestéril, lo que permite incrementar la

semilla de la línea A. La semilla de la línea B (llamada “mantenedora”) se incrementa mediante autopolinización. La línea R (denominada “restauradora”) es androfértil con citoplasma normal y con genes nucleares que restauran la fertilidad en la F1 de la cruce A x R; la semilla de este tipo de línea también se incrementa mediante autofecundaciones (House, 1982).

4. Producción de híbridos

Los híbridos simples se producen mediante el cruzamiento de una línea A con una línea R que posea una buena capacidad de combinación. Los híbridos trilineales resultan de la intervención de tres líneas; en sorgo son el resultado del cruzamiento entre una línea A x una línea B no isogénica, lo que produce un híbrido simple AxB androestéril, que después se cruza con una línea R (Patanothai y Atkins, 1974).

La producción comercial de semilla de los híbridos simples y trilineales de sorgo, se efectúa en lotes aislados en los que se siembran alternadamente surcos del progenitor femenino (androestéril, sea línea A o la cruce simple de líneas AxB no isogénicas) con surcos del progenitor masculino (la línea R).

5. Enfermedades

El cultivo es susceptible a numerosas enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus; House (1982) y Compton (1990) mencionan las principales afecciones foliares como: roña de la hoja (*Exserohilum turcicum*), listado bacteriano (*Xanthomonas holcicola*), rayado bacteriano (*Pseudomonas andropogoni*), mildiú veloso (*Peronosclerospora sorghi*), mancha gris de la hoja (*Cercospora sorghi*), mancha zonada de la hoja (*Gloeocercospora sorghi*), roya (*Puccinia purpurea*), antracnosis

(*Colletotrichum graminicola*), tizón bandeado de la hoja y de la vaina (*Rhizoctonia* spp.), la sintomatología de manera general se caracteriza por: pudriciones, manchas, quemaduras, achaparramiento, clorosis, hongos, pústulas, carbones, etc.; estas enfermedades pueden reducir los rendimientos de grano, lo que afecta a la economía de los productores.

JUSTIFICACIÓN

Se desconoce la relación de surcos hembra-macho adecuada para producir semilla híbrida de líneas A y cruzas AxB no isogénicas de sorgo adaptados a los Valles Altos de México. La caracterización con base en variables morfológicas es necesaria para diferenciar las líneas A de sus cruzas AxB no isogénicas. La identificación de especies fitopatológicas es importante para conocer los síntomas que ocasionan cuando las plantas se encuentran en campo, las posibles soluciones para combatir a los patógenos y de qué manera afectan en el rendimiento de semilla.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los Valles Altos Centrales de México (2200 msnm) se desconoce la relación de surcos hembra:macho adecuada para producir semilla básica de los híbridos experimentales de sorgo adaptados a esta zona. Para poder liberar variedades es necesario el registro de las mismas, de acuerdo con las normas de la UPOV ante SNICS. Entre las líneas A y las cruzas AxB no isogénicas, la identificación de especies fitopatológicas obtenidas de tejido vegetal, son importantes para describir los efectos que provocan en el rendimiento del cultivo y sus componentes.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia de la distancia a la fuente de polen en la producción de semilla híbrida de líneas A y cruzas AxB no isogénicas; así como determinar las características morfológicas, sanitarias y de producción de semillas.

Objetivos particulares

- 1.- Caracterizar morfológica y fenológicamente progenitores androestériles (líneas A y cruzas directas y recíprocas AxB no isogénicas)
- 2.- Estimar la influencia de la distancia a la fuente de polen en la producción de semilla híbrida según la proporción de surcos hembra:macho
- 3.- Cuantificar la producción del polen de la línea restauradora R19 como progenitor paterno.
- 4.- Identificar, mediante reconstrucción filogenética, las especies de hongos y bacterias aisladas de líneas A y de cruzas AxB no isogénicas de sorgo.

HIPÓTESIS GENERAL

Existen diferencias morfológicas, sanitarias y de producción de semillas entre las líneas A y las cruzas AxB (directas y recíprocas). El rendimiento de semilla en líneas, cruzas directas y recíprocas será menor en los surcos más alejados de la fuente de polen.

Hipótesis particulares

- 1) Existen diferencias morfológicas y de producción de semilla entre los genotipos androestériles.

- 2) El rendimiento de semillas en líneas, cruzas directas y recíprocas será menor en los surcos más alejados de la fuente de polen.
- 3) La dinámica de producción de polen fresco es similar al acumulado de la línea R19.
- 4) Existen diferencias sanitarias entre los genotipos androestériles.

LITERATURA CONSULTADA

Cisneros-López M. E., L. E. Mendoza-Onofre, G. Mora-Aguilera; L. Córdova-Téllez

and M. Livera-Muñoz (2007) Cold tolerant sorghum hybrids and parental lines. I: Seed quality and its effects on seedling establishment. *Agrociencia* 41:45-55.

Cisneros-López M. E. and L. E. Mendoza-Onofre (2010) Genotype and planting date

effects on the quality of sorghum seeds infected with ergot. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33:69-77.

Compton L. P. (1990) Agronomía del Sorgo. Instituto Internacional para el Mejoramiento en Cultivos para los Trópicos Semiáridos (ICRISAT). India. pp: 184-199.

FAOSTAT (2017) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Consultada en <http://faostat.fao.org>. (Abril 2017).

House L. R. (1982) El Sorgo, Guía para su Mejoramiento Genético. Universidad Autónoma Chapingo. México. 233 p.

Milton Poehlman J. y A. Sleper D. (2002) Mejoramiento Genético de las Cosechas. México, Limusa. 506 p.

Morales-Valenzuela G., H. V. Silva-Rojas, D. Ochoa-Martínez, E. Valadez-Moctezuma, B. Alarcón-Zúñiga, L. X. Zelaya-Molina, L. Córdova-Téllez, L. Mendoza-Onofre, H. Vaquera-Huerta, A. Carballo-Carballo, A. Farfán-Gómez and G. Ávila-Quezada (2007) First Report of *Pantoea agglomerans* Causing Leaf

Blight and Vascular Wilt in Maize and Sorghum in México. *The American Phytopathological Society* 91:1365.

Patanothai A. and R. E. Atkins (1974) Yield stability of single crosses and three-way hybrids of grain sorghum. *Crop Science* 14:287-290.

SIAP (2017) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultada en www.siap.gob.mx. (Abril 2017).

Zanovello De Godoi R. E. (2008) Producción de semillas híbridas de maíz. *Seed News* 5:1-5.

CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS A, CRUZAS DIRECTAS Y RECÍPROCAS AxB, E INFLUENCIA DE LA DISTANCIA A LA FUENTE DE POLEN EN EL RENDIMIENTO DE SEMILLA DE SORGO†

CHARACTERIZATION OF A_LINES, AxB DIRECT AND RECIPROCAL CROSSES, AND INFLUENCE OF SOURCE OF POLLEN DISTANCE IN SORGHUM SEED YIELD

I.1 RESUMEN

Se caracterizó morfológica y fenológicamente líneas A, cruzas directas y recíprocas AxB no isogénicas de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], y se evaluó la influencia de la distancia a la fuente de polen en el rendimiento de semilla híbrida según la proporción de surcos hembra:macho. En el año 2015, se evaluaron 14 genotipos (cinco cruzas AxB directas, cinco cruzas recíprocas y cuatro líneas A), en cuatro proporciones (4:2; 8:2; 12:2 y 16:2). La línea R19 fue el macho común. Las variables fenológicas y morfológicas, se compararon mediante pruebas de “t” de Student. La Influencia de la distancia a la fuente de polen, se evaluó en un diseño de bloques completos al azar con dos repeticiones. En la línea R19 se registraron los días a floración y la producción de polen diario y acumulado. En el año 2016 se registró el rendimiento de semilla de tres líneas A en la proporción 8:2 con el mismo macho común. La línea A1 fue la más tardía,

†: **Versión en el formato requerido por la Revista Fitotecnia Mexicana, donde se ha iniciado el proceso editorial.**

con el mayor periodo de la floración, mayor número de semillas por panoja y panojas más largas. La línea A2 presentó el mayor rendimiento de semilla, menor porte y menor diámetro de tallo. La línea A5 fue la más precoz, con mayor excursión, menor longitud y ancho de panoja y menor rendimiento de semilla. La línea A9 tuvo el menor período de floración y menor número de semillas, mayor porte y diámetro de tallo. La producción de polen de la línea R19 fue suficiente para polinizar a las plantas hembra aún en una proporción de surcos hembra-macho de 16:2. En general, la respuesta agronómica de las cruzas directas y recíprocas fue similar, aunque el rendimiento de semilla de las cruzas fue mayor que el de las líneas.

Palabras clave: *Sorghum bicolor* (L) Moench, producción de polen, proporciones hembra:macho, rendimiento de semilla.

I.2 SUMMARY

A_lines and direct and reciprocal A x non-isogenic B sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] crosses were characterized in terms of morphological and phenological traits. The influence of the distance to the pollen source in hybrid seed yield was evaluated by the proportion of female:male rows. In 2015, 14 genotypes were evaluated (five direct AxB crosses, five reciprocal crosses and four A_lines) in four proportions (4:2; 8:2; 12:2 and 16:2). Line R19 was the common male. Phenological and morphological traits were compared by Student's "t" tests. The influence of the distance to the pollen source was evaluated in a complete randomized blocks design with two replications. In the line R19 days to flowering, and daily and accumulated pollen production were recorded. In 2016, seed yield of three A_lines in the 8:2 proportion with the same common male was

registered. Line A1 flowered the last, and it showed the longest period of flowering, the highest number of seeds per panicle and longest panicles. Line A2 showed the highest seed yield, smallest plant height with a narrow stem diameter. Line A5 was the earliest flowering, with long excersión, less length and width of panicles and lowest seed yield. Line A9 had the shortest flowering period and lowest seeds number, but the highest plant height and stem diameter. Pollen production of the R19 line was enough to pollinate the female plants even in a female:male ratio of 16:2. Direct and reciprocal crosses had similar agronomic responses although their seed yield was higher than that of the lines.

Index words: *Sorghum bicolor* (L) Moench, pollen production, female:male rows proportion, seed yield.

I.3 INTRODUCCIÓN

El sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench) es el quinto cultivo más importante entre los cereales del mundo después del arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), maíz (*Zea mays* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) (FAOSTAT, 2017). En México, el sorgo es un cereal de importancia económica, pues es una fuente alimenticia del sector pecuario. Los principales estados productores son: Tamaulipas, Guanajuato, Sinaloa, Nayarit y Jalisco (SIAP, 2017).

En la producción de semilla híbrida comercial de sorgo, se utiliza el sistema de androesterilidad genético-citoplásmica, en el que intervienen tres líneas denominadas A, B y R. Las líneas A y B son isogénicas excepto que la línea A es androestéril (su citoplasma induce la androesterilidad) y la línea B es androfértil. La línea R (denominada

“restauradora”) también es androfértil con citoplasma normal y con genes nucleares que restauran la fertilidad de la F1 de la cruce AxR (Mendoza-Onofre *et al.*, 2017).

Los híbridos simples de sorgo se producen mediante el cruzamiento de una línea A con una línea R que posea una buena capacidad de combinación. Los híbridos trilineales de esta especie son el resultado del cruzamiento entre una línea A x una línea B no isogénica, lo que produce un híbrido simple AxB androestéril, el cual se cruza con una línea R para generar un híbrido trilineal fértil (Galicia-Juárez *et al.*, 2017a).

La producción comercial de semilla de los híbridos simples y trilineales de sorgo, se efectúa en lotes aislados en los que se siembran alternadamente surcos del progenitor femenino (androestéril, sea línea A o la cruce simple AxB no isogénica) con surcos del progenitor masculino (la línea R). La proporción de surcos de líneas hembra y macho (PSHM) y consecuentemente, la producción de semilla híbrida, depende de varios factores, como: la capacidad de producción de polen de la línea R, la sincronía y el período de las floraciones de ambos progenitores, el porte de las líneas, y la dirección y velocidad del viento, entre otros. Es conveniente sembrar la mayor PSHM pues la semilla híbrida se cosecha solamente de los surcos de los progenitores femeninos (Poehlman y Sleper, 2003).

Los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Caracterizar morfológica y fenológicamente progenitores androestériles (líneas A y cruces directas y recíprocas AxB no isogénicas); 2) Estimar la influencia de la distancia a la fuente de polen en la producción de semilla híbrida según la proporción de surcos hembra:macho; 3) Cuantificar la producción de polen de la línea restauradora R19 como progenitor paterno.

I.4 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó durante los años 2015 y 2016 en el Campo Agrícola Experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México (2243 msnm, 19° 27' 49" N y 98° 54' 20" O).

I.4.1 Año 2015

En este año se evaluaron 14 genotipos (progenitores femeninos), de los cuales 10 correspondían a la F1 de cruzas entre líneas A con líneas B no isogénicas (cinco cruzas AxB directas: A1xB2, A1xB5, A2xB5, A2xB9 y A5xB9; y cinco cruzas AxB recíprocas: A2xB1, A5xB1, A5xB2, A9xB2 y A9xB5). Los otros cuatro progenitores femeninos fueron las líneas A1, A2, A5 y A9. Cada progenitor femenino se sembró en cuatro PSHM: 4:2; 8:2; 12:2 y 16:2; con dos repeticiones. Se utilizó la línea restauradora R19 como macho común.

La fecha de siembra fue el 23 de abril de 2015. Las parcelas del progenitor femenino fueron de 3 m de largo con 0.80 m de distancia entre surcos. Las prácticas culturales que se aplicaron incluyeron una escarda a los 30 días de la emergencia y un raleo de 10 cm entre plantas. Se fertilizó con las dosis de 120-80-00 en la siembra y 80-00-00 en el aporque (segundo cultivo). Durante el ciclo del cultivo se aplicaron 6 riegos, 3 deshierbes manuales y 2 aplicaciones de atrazina (2 L ha^{-1}) para el control de malezas.

I.4.1.1 Caracterización agronómica de los progenitores femeninos

En cada progenitor femenino, en una repetición, se identificaron 25 plantas representativas en la etapa de hoja bandera. En la floración se registraron las siguientes variables: 1) Días a floración (DF).- Días desde la siembra hasta que la mitad de la

inflorescencia presentaba estigmas expuestos; 2) Período de la floración (PF).- Se anotó el inicio y término de la floración y se calcularon los días transcurridos entre ambas etapas; 3) Altura de la planta (AP).- Distancia (cm) desde el ras del suelo hasta el ápice de la panoja; 4) Longitud de la panoja (LP).- Distancia (cm) desde la base hasta el ápice de la panoja; 5) Ancho de la panoja (ANP).- Distancia máxima (mm) entre los extremos laterales de la panoja; 6) Diámetro del tallo (DT).- Se midió con un vernier digital en la parte media del tercer entrenudo basal (mm); 7) Excursión (EXC).- Distancia (cm) desde la inserción de la hoja bandera hasta la base de la panoja; 8) Rendimiento de semilla por panoja (RSP).- A la cosecha (15 d después de que la semilla llegó a la madurez fisiológica), se cortaron las 25 panojas, las que se desgranaron individualmente y se pesó el rendimiento de semilla (g); 9) Número de semillas por panoja (NSP).- Se pesaron 100 semillas de cada panoja (PCS, g) y se estimó el número de semillas por panoja mediante la ecuación: $NSP = (RSP \times 100) / PCS$.

I.4.1.2 Influencia de la distancia a la fuente de polen

En las dos repeticiones se cubrieron cinco panojas con bolsas de papel una semana después del final de la floración, en cada uno de los surcos hembra de cada progenitor femenino. A la cosecha (15 d después de que la semilla llegó a la madurez fisiológica) se cortaron las 5 panojas, las que se desgranaron en conjunto manualmente y se pesó el rendimiento total de semilla obteniéndose el rendimiento de semilla por panoja y por surco (RSPS) promedio de 5 panojas por repetición en cada proporción de surcos hembra:macho. Además, se estimó el número de semillas por panoja por surco (NSPS) mediante la ecuación: $NSPS = (RSPS \times 100) / PCS$.

I.4.1.3 Producción de polen de la línea restauradora

En el progenitor masculino se registraron las siguientes variables: 1) Días a floración (DF).- Días desde la siembra hasta que la mitad de la inflorescencia presentaba anteras expuestas; 2) Producción de polen diario (PD).- Al inicio de la floración se identificaron 20 plantas representativas de la línea restauradora. Cada tercer día, se embolsaron las 20 panojas a las 8:00 am, antes de la dehiscencia; a las 3:00 pm cada panoja se sacudió levemente y se retiró la bolsa de modo que en su interior permaneció el polen producido ese día. Este procedimiento se efectuó hasta el final de la floración, obteniéndose nueve muestreos, todos ellos de las mismas 20 plantas; 3) Producción de polen acumulado (PA).- En este caso se obtuvo la sumatoria consecutiva de la producción de polen diario. Las bolsas individuales de las colectas de polen se secaron a 72 °C durante 24 h; después de lo cual se extrajo el polen el que se pesó en una balanza analítica en miligramos (mg).

I.4.2 Año 2016

En este año se registró el rendimiento de semilla de tres líneas androestériles (A1, A2, A3). El progenitor masculino común fue nuevamente la línea restauradora R19. En cada línea se utilizaron dos distancias entre plantas (10 y 20 cm equivalentes a 125,000 y 62,500 plantas ha⁻¹) y solamente se sembró la proporción de surcos hembra:macho de 8:2. En cada progenitor femenino se registró el rendimiento de semilla (RSPS) y el número de semillas (NSPS) por surco y por panoja de cinco plantas representativas, aplicándose la misma metodología del año 2015. En el progenitor masculino se aplicó un procedimiento similar al del año anterior, pero la producción de polen diario por panoja

se obtuvo de 10 plantas representativas de la línea R; y la producción de polen acumulado se basó en muestra inicial de 100 plantas.

I.4.3 Análisis estadísticos

En el año 2015, en el estudio de caracterización, las variables fenológicas y morfológicas de los 14 genotipos se compararon con base en sus medias ($n=25$) y desviaciones estándar mediante pruebas de “t” de Student. La comparación de cruzas directas vs. cruzas recíprocas también se efectuó mediante pruebas de “t” entre las medias de ambos grupos de cruzas.

Los datos del RSPS y con el NSPS de los 14 genotipos sembrados en las cuatro PSHM se analizaron con base en un diseño experimental de bloques completos al azar con dos repeticiones. La comparación de medias entre genotipos y entre PSHM se efectuó mediante la prueba de Tukey.

Los datos de polen diario y acumulado se graficaron de acuerdo con las fechas en las que se obtuvieron las muestras. Con esos datos se corrieron modelos de regresión para caracterizar la dinámica de la producción de polen de la línea restauradora.

En el año 2016, las variables relacionadas con el rendimiento de semilla por panoja por surco de los cuatro genotipos y con las densidades de población se analizaron con base en un diseño factorial; la comparación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey.

I.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.5.1 Caracterización de los progenitores femeninos en el año 2015

I.5.1.1 Días a floración y periodo de la misma

Los días a floración tanto de las líneas A como de las cruzas directas y recíprocas fueron relativamente similares. El intervalo en los días a floración varió de 111 d (línea A5 y cruzas A2xB5, A2xB9, A5xB1, A5xB2, A9xB2) a 114 d (líneas A1 y A9) (Cuadro I.1). Entre las cuatro líneas, A5 y A2 fueron más precoces (111 y 112 d) que A1 y A9 (114 d) (Cuadro I.1). El promedio de los días a floración de las cinco cruzas directas fue similar al de las cinco cruzas recíprocas (112 vs. 111 d) (Cuadro I.2). No hubo evidencias de heterosis para esta característica. El promedio de los días a floración de las líneas A1, A2, A5 y A9 evaluadas por León-Velasco (2007)¹ en Montecillo, en condiciones de riego, fueron: 102, 101, 98 y 99, respectivamente; y en condiciones de secano: 98, 95, 96, 100 d; o sea, fueron en promedio 14 d más precoces que en la presente investigación. Las diferencias pueden deberse a las diferentes condiciones edáficas, climáticas y manejo de cultivo que se le proporcionó al cultivo en ambos estudios.

El periodo de la floración de los genotipos varió de 8.7 d (línea A9) a 12.5 d (cruza A1xB5). El periodo de las líneas A1, A2 y A5 fue similar (promedio de 12 d) y la línea A9 tuvo el periodo más corto (Cuadro I.2). En un estudio que incluyó tres fechas de siembra, el promedio de los días a floración de la línea A9 fue 101 d y el periodo de la floración

¹León-Velasco H. Información personal. Tesis Doctoral. 2007. Evaluación de dos generaciones de híbridos y progenitores tolerantes al frío. Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo. Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética. 101 p.

Cuadro I.1 Medias y desviación estándar de variables fenológicas, morfológicas y rendimiento de semilla de 14 genotipos de sorgo en el año 2015.

GEN	DF	PF	AP	DT	LP	ANP	EXC	RSP	NSP
A1	114 ±1.61	12.4 ±1.61	101 ±6.65	1.57 ±0.34	25.7 ±1.59	6.2 ±0.93	11.8 ±4.09	29.2 ±9.54	1418 ±324
A1xB2	112 ±1.35	9.8 ±1.92	104 ±5.29	1.46 ±0.34	22.6 ±2.42	7.7 ±3.04	16.1 ±3.42	38.2 ±13.22	1576 ±448
A1xB5	112 ±1.14	12.5 ±1.16	110 ±7.88	1.43 ±0.24	23.9 ±1.52	6.9 ±1.08	18.5 ±4.12	32.5 ±9.72	1362 ±285
A2	112 ±1.08	11.9 ±1.35	93 ±9.59	1.26 ±0.29	18.9 ±2.14	5.4 ±0.86	7.5 ±4.26	27.3 ±8.69	1153 ±302
A2xB1	112 ±1.21	9.2 ±2.92	104 ±12.15	1.68 ±0.31	24.1 ±2.19	8.8 ±1.58	9.9 ±4.69	36.5 ±10.01	1612 ±561
A2xB5	111 ±0.96	11.6 ±1.99	107 ±7.66	1.19 ±0.17	20.4 ±1.42	5.3 ±0.70	12.5 ±4.42	28.4 ±9.79	1214 ±294
A2xB9	111 ±0.82	12.2 ±1.18	108 ±9.05	1.96 ±0.29	19.7 ±1.81	7.2 ±0.74	7.7 ±3.98	25.7 ±8.12	1081 ±320
A5	111 ±0.79	11.8 ±0.66	97 ±5.58	1.34 ±0.25	18.1 ±2.90	5.1 ±0.60	13.3 ±3.31	21.0 ±7.15	941 ±228
A5xB1	111 ±1.09	11.1 ±1.22	107 ±7.88	1.84 ±0.24	23.7 ±1.86	10.1 ±1.94	7.7 ±6.04	33.7 ±12.14	1617 ±363
A5xB2	111 ±0.87	11.1 ±1.96	98 ±6.09	1.62 ±0.21	21.9 ±1.38	9.0 ±1.41	9.1 ±3.38	33.1 ±9.65	1435 ±270
A5xB9	112 ±1.32	10.3 ±1.97	109 ±12.55	1.75 ±0.24	18.1 ±2.21	5.6 ±0.66	11.1 ±3.60	27.7 ±6.83	1098 ±392
A9	114 ±1.65	8.7 ±1.82	109 ±7.93	2.03 ±0.32	21.1 ±2.75	6.7 ±0.99	9.1 ±3.88	22.5 ±14.48	888 ±631
A9xB2	111 ±1.19	10.6 ±1.22	108 ±7.51	1.72 ±0.25	19.3 ±1.64	6.7 ±0.99	10.8 ±3.85	30.1 ±12.34	1521 ±417
A9xB5	112 ±1.16	11.1 ±1.39	105 ±8.31	1.97 ±0.29	21.5 ±2.58	7.4 ±1.51	9.3 ±5.08	32.1 ±9.97	1490 ±418

Gen: Genotipos; DF: Días a floración; PF: Periodo de la floración (días); AP: Altura de planta (cm); DT: Diámetro del tallo (cm); ANP: Ancho de panoja (cm); LP: Longitud de panoja (cm); EXC: Excursión (cm); RSP: Rendimiento de semilla por panoja (g); NSP: Número de semillas por panoja. Los valores corresponden a los promedios de 25 observaciones.

Cuadro I.2 Promedio de los días a la floración y periodo de la misma, de líneas A y de cruza AxB no isogénicas directas y recíprocas de sorgo en año 2015.

♀ / ♂	B1	B2	B5	B9
Días a floración				
A1	114	112	112	NSS
A2	112	112	111	111
A5	111	111	111	112
A9	NSS	111	112	114
Periodo de la floración				
A1	12.4	9.8	12.5	NSS
A2	9.2	11.9	11.6	12.2
A5	11.1	11.1	11.8	10.3
A9	NSS	10.6	11.1	8.7

NSS: No se sembró.

fue de 20 d (Cisneros *et al.*, 2015), lo que significa que esta línea es sensible a los cambios ambientales, como temperatura y humedad pues en el presente estudio floreció más tarde (114 d) y su periodo de floración fue más corto (casi 9 d). Yanase *et al.* (2008) sugieren que la iniciación floral se acelera con una temperatura nocturna inferior a 20 °C. El promedio del periodo de la floración de las cinco cruzas directas fue 11.3 d y el de las cinco cruzas recíprocas fue 10.6 d (Cuadro I.2), es decir, las cruzas directas florecieron un día más que las recíprocas. También se observa que en general el periodo promedio de las cruzas es semejante al de las líneas progenitoras; es decir, no se detecta heterosis para esta variable, Desde el punto de vista de producción de semilla, es conveniente que el progenitor femenino tenga un mayor periodo de receptividad de polen, lo que sugiere que las líneas A1, A2 y A5, así como las cruzas directas serían mejores candidatos que los otros genotipos.

I.5.1.2 Altura de planta y diámetro del tallo

La altura promedio de los genotipos varió de 93 cm (línea A2) a 110 cm (A1xB5) cm (Cuadro I.1). La altura promedio de las cuatro líneas fue 101 cm. Las líneas A2 y A5 fueron las de menor porte (95 cm en promedio) y la línea A9 fue 14 cm más alta (Cuadro I.3). La altura promedio de las cuatro cruzas directas fue de 107 cm, estadísticamente similar a las de las cuatro cruzas recíprocas (105 cm) (Cuadro I.3). Esto indicaría que en este grupo de líneas la heterosis para altura de planta es reducida. Sin embargo, el porte de todas las cruzas en las que intervinieron las líneas A2 y A5 fue hasta 10 cm mayor que sus progenitores, lo cual no sucedió con las cruzas en la que la línea A9 intervino como progenitor (Cuadro I.3), lo que significa que la magnitud de la heterosis para altura de planta depende de los progenitores involucrados; porque este carácter es de alta

heredabilidad (94%) en sorgo (Brown *et al.*, 2006). El promedio de la altura de planta de las líneas A1, A2, A5 y A9 evaluadas por León-Velasco (2007)¹ en Montecillo en condiciones de riego, fue: 101, 99, 96 y 105 cm respectivamente; y en temporal: 103, 99, 99 y 100 cm. En la investigación de Galicia *et al.* (2017b), el promedio de las líneas A1, A2 y A5 fue: 98, 102 y 99 cm. El porte de estas líneas varió poco, por efecto de localidad, a diferencia de los días a floración y el periodo de la misma. El bajo porte de estas líneas facilita la cosecha y reduce el riesgo de acame; además se facilita la polinización porque la línea R es de mayor altura (125 cm).

El diámetro del tallo varió de 1.19 cm (A2xB5) a 2.03 cm (línea A9) (Cuadro I.1). Entre las cuatro líneas, la A9 presentó el tallo más grueso y la A2 (1.26 cm) mostró el tallo más delgado (Cuadro I.3). Los tallos de las cruzas recíprocas fueron en promedio 0.21 cm más gruesos que los de las cruzas directas (1.77 vs. 1.56 cm). Destaca que tanto las cruzas directas como recíprocas en las que intervino la línea A9 produjo tallos gruesos (Cuadro I.3), lo que sugiere que hay efectos de dominancia de esta característica. Las líneas mantenedoras B1 (1.38 cm), B2 (1.26 cm) y B5 (1.18 cm) evaluadas por Mendoza-Onofre *et al.* (2017) presentaron valores similares, lo que indica que la calidad genética se continúa conservando y que este carácter también es poco sensible a los cambios ambientales; por lo tanto, se puede considerar un buen descriptor del fenotipo.

I.5.1.3 Longitud de panoja, ancho de panoja y excursión.

La línea A5 presentó la panoja más corta (18.1 cm) y la línea A1 mostró la más larga (25.7 cm) (Cuadro I.1). Interesantemente, la longitud de panoja de ninguna crucea directa ni recíproca excedió a la línea A1 (Cuadro I.4), considerándose como un

progenitor elite que puede emplearse para generar híbridos con un alto rendimiento de semilla, por tener panojas grandes. La longitud promedio de las cinco cruzas directas fue de 20.9 cm, similar a las de cinco cruzas recíprocas (22.1 cm).

Cuadro I.3 Altura y diámetro promedio de líneas A y de cruzas AxB no isogénicas directas y recíprocas de sorgo en el año 2015.

♀ / ♂	B1	B2	B5	B9
Altura de planta (cm)				
A1	101	104	110	NSS
A2	104	93	107	108
A5	107	98	97	109
A9	NSS	108	105	108
Diámetro del tallo (cm)				
A1	1.57	1.46	1.43	NSS
A2	1.68	1.26	1.19	1.96
A5	1.84	1.62	1.34	1.75
A9	NSS	1.72	1.97	2.03

NSS: No se sembró.

En las cruzas directas y recíprocas donde intervinieron las líneas A2 y A5 las panojas fueron hasta 5 cm más de largas que los progenitores, lo que no ocurrió en las líneas A1 y A9 (Cuadro I.4). Cisneros *et al.* (2015) mencionan que la línea A9 presentó en promedio panojas de 17.9 cm de largo, en promedio de tres ambientes, mientras que, en el presente estudio, la misma línea fue 3.16 cm más larga. El promedio de la longitud de las panojas de estas cuatro líneas fue similar a los valores reportados por León-Velasco (2007)¹ y por Galicia-Juárez *et al.* (2017b).

El ancho de la panoja varió de 5.1 cm (línea A5) a 10.1 cm (A5xB1) (Cuadro I.1). Entre las cuatro líneas androestériles, la línea A9 presentó la panoja más ancha (6.7 cm)

(Cuadro I.4). Las panojas de las cruzas recíprocas fueron en promedio 1.87 cm más gruesas que las cruzas directas (8.39 vs. 6.52 cm). Sin embargo, el promedio de las líneas A es muy similar entre ellas (5.86 cm). En las cruzas en las que intervinieron las líneas A1 y A2 se presentó heterosis para esta característica. El ancho de panoja de las líneas A1 y A5 fue similar a los reportados por Galicia-Juárez *et al.* (2017b), pero en la presente investigación, el ancho de panoja de la línea A2 fue la mitad del reportado en esa referencia.

La excersión promedio de los genotipos varió de 7.5 cm (línea A2) a 18.5 cm (A1xB5) (Cuadro I.1). Entre las líneas, las líneas A2 y A9 presentaron excersión más corta que las líneas A1 y A5. La excersión promedio de las 5 cruzas directas fue 13.2 cm, mientras que las cruzas recíprocas fue 9.4 cm. Al emplear las líneas A1 y A2 hubo heterosis tanto en las cruzas recíprocas como en las directas (2.5 cm más con el progenitor A2 y 5.5 cm más con A1) (Cuadro I.4). El promedio de la excersión de las panojas de estas cuatro líneas evaluadas por León-Velasco (2007)¹ en Montecillo, en condiciones de riego, fueron similares a los del presente estudio; sin embargo, en condiciones de secano la longitud de la excersión casi duplica a la de riego (León-Velasco, 2007¹; Galicia-Juárez *et al.*, 2017b), lo que indica que esta variable interactúa con el ambiente y es sensible a los cambios en humedad y temperatura inherentes a fechas de siembra y régimen pluvial. Este es un resultado interesante, porque es un carácter de importancia agronómica, utilizado ampliamente como descriptor morfológico en sorgo (UPOV, 2012), el cual, según Brown *et al.* (2006) tiene menor heredabilidad en sorgo (84%), en comparación con altura de planta (94%), y longitud de raquis y ramas (93%).

Cuadro I.4 Promedio de la longitud (cm), ancho (cm) y excersión (cm) de las panojas de líneas A y de cruzas AxB no isogénicas directas y recíprocas de sorgo en el año 2015.

♀ / ♂	B1	B2	B5	B9
Longitud de la panoja (cm)				
A1	25.7	22.6	23.9	NSS
A2	24.1	18.9	20.4	19.7
A5	23.7	21.9	18.1	18.1
A9	NSS	19.3	21.5	21.1
Ancho de la panoja (cm)				
A1	6.2	7.7	6.9	NSS
A2	8.8	5.4	5.3	7.2
A5	10.1	9.0	5.1	5.6
A9	NSS	6.7	7.4	6.7
Excersión de la panoja (cm)				
A1	11.8	16.1	18.5	NSS
A2	9.9	7.5	12.5	7.7
A5	7.7	9.1	13.3	11.1
A9	NSS	10.8	9.3	9.1

NSS: No se sembró.

I.5.1.4 Rendimiento de semilla y número de semillas por panoja

El rendimiento de semilla por panoja varió de 21.0 (línea A5) a 38.2 g (A1xB2) (Cuadro I.1). Entre las cuatro líneas, la A5 fue la de menor RSP (21.0 g) y la línea A1 fue la de mayor RSP (29.2 g) (Cuadro I.5). Las panojas de las cruzas recíprocas produjeron en promedio 2.7 g de grano por panoja menos que las cruzas directas (33.1 vs. 30.4). Es importante mencionar que el RSP de todas las cruzas directas y recíprocas fue mayor que el de sus progenitores, lo que evidencia la heterosis, que puede manifestarse mediante semillas más pesadas y mayor producción de grano (Tüsüz, 1997; Yu y Tuinstra, 2001). El promedio del rendimiento de semilla por panoja de estas cuatro líneas (A1, A2, A5 y A9) evaluadas por León-Velasco (2007)¹ en Montecillo en condiciones de

riego, fue: 28.6, 24.3, 23.8 y 37.6 g respectivamente, similares a los de la presente investigación, excepto la línea A9 que produjo 15.1 g menos (37.6 vs. 22.5 g). Galicia *et al.* (2017b) mencionan que el rendimiento por panoja de las líneas A1, A2 y A5 en condiciones de riego, fue 23.7, 21.6 y 16.2 g equivalente a 5.5 g menos que en la presente investigación.

El número de semillas por panoja osciló entre 888 (línea A9) y 1617 (cruza A5xB1) semillas (Cuadro I.1). Entre las cuatro líneas, la A9 (888) es la que presentó un menor NSP, mientras que la A1 (1418) tuvo el mayor número de semillas (Cuadro I.5). En promedio las cruza recíprocas presentaron 269 semillas más por panoja que las cruza directas (1535 vs. 1266). En las cruza en las que intervinieron las líneas A5 y A9 se presentó heterosis para esta característica (Cuadro I.5). La línea A2 y A5 presentaron similares valores en el estudio de Galicia-Juárez *et al.* (2017b), mientras que en el presente estudio la línea A1 produjo 300 semillas más.

Cuadro I.5 Rendimiento de semilla y número de semillas por panoja (g) de líneas A y de cruza AxB no isogénicas directas y recíprocas de sorgo en el año 2015.

♀ / ♂	B1	B2	B5	B9
Rendimiento de semilla (g)				
A1	29.2	38.2	32.5	NSS
A2	36.5	27.3	28.4	25.7
A5	33.7	33.1	21.0	27.7
A9	NSS	30.1	32.1	22.5
Número de semillas por panoja				
A1	1418	1576	1362	NSS
A2	1612	1153	1214	1081
A5	1617	1435	941	1098
A9	NSS	1521	1490	888

NSS: No se sembró.

I.5.1.5 Influencia de la distancia a la fuente de polen

La eficiencia de la polinización puede evaluarse a través del rendimiento de semilla híbrida por panoja y por unidad de superficie. Varios factores influyen en esa variable. Tres factores de importancia son: el genotipo, la distancia a la fuente de polen (que a su vez es función de la proporción de surcos hembra:macho) y la cantidad de polen producido por el progenitor masculino en los lotes de producción de semilla.

Los resultados de los ANOVA's (Cuadro I.6) indicaron que el RSPS dependió de las fuentes de variación Genotipos (Gen) y la PSHM, mientras que la interacción entre ambos no fue significativa.

Cuadro I.6 Significancia de las fuentes de variación (FV) para el rendimiento de semilla por panoja por surco (RSPS) en el año 2015.

FV	RSPS
Genotipos (Gen)	2,036.01 *
Proporción de surcos hembra:macho (PSHM)	618.46 *
Gen x PSHM	97.41 ns
CV (%)	34

CV: Coeficiente de variación; *: Significativo; ns: No significativo.

I.5.1.6 Rendimiento de semilla de genotipos y de las proporciones de surcos H:M en el año 2015

En promedio de las cuatro PSHM, el rendimiento promedio de semilla por panoja por surco de los genotipos varió de 11.9 g (línea A1) a 36.4 g (A2xB1). Entre las cuatro líneas, la línea A2 fue la de mayor rendimiento (25.8 g), seguido de las líneas A5 y A9 con 21.4 g, y finalmente la línea A1 (11.9 g) (Cuadro I.7). Al comparar el RSP promedio de 25 panojas (Cuadro I.5), los rendimientos de semilla por panoja por surco (RSPS,

Cuadro I.7) de las líneas A2, A5, y A9 fueron similares; en cambio, el RSP de la línea A1 fue 17.23 g mayor que su RSPS.

En promedio de los 14 genotipos, el mayor RSPS se produjo en la proporción 8:2 con 28.7 g. Aunque la distancia a la fuente de polen de los surcos centrales en las proporciones 16:2 y 12:2 fue más lejana que en las proporciones 4:2 y 8:2, el rendimiento promedio de los 16 surcos hembras fue 25.6 g y el de los 12 surcos hembra fue 25.2. Se esperaba que a mayor proporción de surcos hembra:macho el rendimiento de semillas por panoja y por unidad de superficie fuera menor (Hernández-Martínez *et al.*, 2006), lo cual no sucedió en el presente estudio pues la línea R19 es un progenitor masculino eficiente en la producción de polen.

Puesto que a escala comercial se requiere la mayor proporción posible de plantas hembras por unidad de superficie, bajo el supuesto de que en Valles Altos la densidad de siembra óptima para producción de semilla sería de 111,000 plantas ha⁻¹, los rendimientos de semilla híbrida respectiva, en promedio de las cuatro líneas A serían: 1.34, 1.91, 1.87 y 2.09 t ha⁻¹ para las proporciones 4:2; 8:2; 12:2 y 16:2, respectivamente.

I.5.1.7 Producción de polen diario y acumulado

La línea R19 produjo polen durante 17 d. La producción promedio de polen por día fue de 61 mg; la producción máxima (93.4 mg) se obtuvo 8 d después del inicio de antesis. En la producción del polen acumulado la tendencia fue sigmoideal, ($y = -1.1741x^3 + 14.025x^2 + 20.47x - 38.064$; $R^2 = 0.99$) con un máximo de 426.7 mg a los 12 d después del inicio de antesis (Figura I.1). Se considera que la línea R presenta una gran producción de polen y el periodo de su floración es más amplio que las cuatro líneas del presente estudio (A1, A2, A5 y A9), lo que explica el alto grado de eficiencia en la

polinización y fecundación de los óvulos de estas líneas androestériles aún en la mayor PSHM (16:2).

Cuadro I.7 Promedio del rendimiento de semilla por panoja y por surco (g) de cada genotipo en cuatro proporciones de surcos hembra:macho (PSHM) en el año 2015.

Genotipo	PSHM				\bar{x}
	4:2	8:2	12:2	16:2	
A1	7.2	12.8	12.0	15.8	11.9 g
A1xB2	33.8	35.9	30.1	31.4	32.8 ab
A1xB5	23.1	36.5	26.8	28.9	28.8 bcde
A2	27.2	27.3	23.1	25.4	25.8 def
A2xB1	41.4	36.4	33.5	34.3	36.4 a
A2xB5	29.3	32.1	27.9	25.5	28.7 bcde
A2xB9	27.1	26.3	23.6	24.1	25.3 def
A5	21.7	22.6	21.8	19.5	21.4 f
A5xB1	30.7	30.6	26.4	28.9	29.1 bcd
A5xB2	25.2	25.4	25.1	21.7	24.3 ef
A5xB9	30.5	27.1	27.1	26.6	27.8 cde
A9	16.6	23.3	21.8	23.9	21.4 f
A9xB2	29.7	31.2	26.5	24.5	27.9 cde
A9xB5	34.6	34.1	27.4	27.8	30.9 bc
\bar{x}	27.0 AB	28.7 A	25.2 B	25.6 B	

Valores con letra mayúscula o minúscula distinta indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

I.5.2 Rendimiento y número de semillas por panoja por surco en el año 2016

Los resultados de los ANOVA's (Cuadro I.8) para estas dos variables fueron similares pues las fuentes principales de variación (genotipos y densidades de plantas) fueron significativas pero la interacción genotipos x densidades no fue significativa para variable alguna.

Entre genotipos, la línea A1 presentó el mayor rendimiento (30.8 g) y el mayor número de semillas (1289). Ambas variables fueron mayores en la menor densidad, en la que hubo menor competencia entre plantas (29.6 g y 1142 semillas) que a la densidad

más alta (26.7 g y 1051 semillas) (Cuadro I.9). La línea A1 tuvo un RSPS similar en los dos años de estudio; en cambio, la línea A2 produjo un 16% más en el año 2016 que el año anterior.

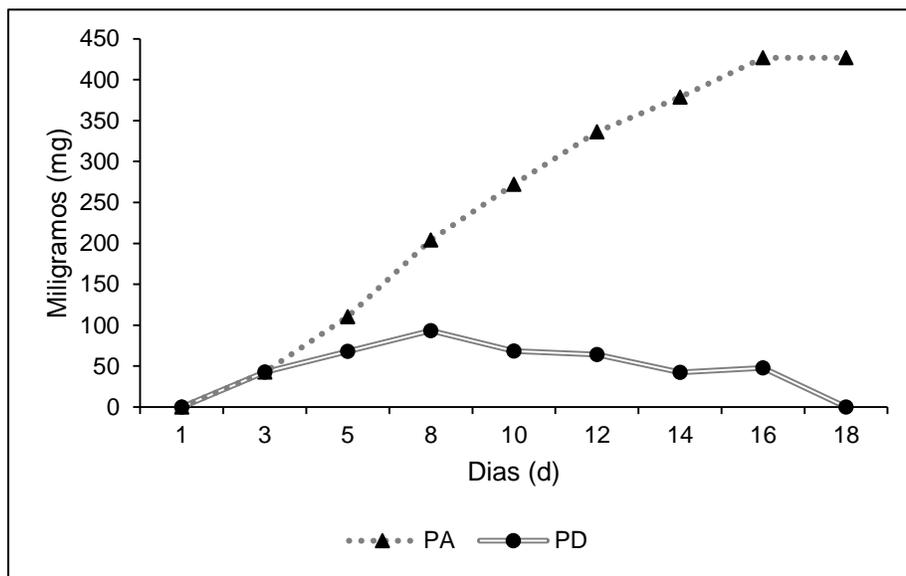


Figura I.1 Producción de polen diario (PD) y acumulado (PA) del progenitor masculino R19 en el año 2015.

Cuadro I.8 Significancia de las fuentes de variación (FV) para el rendimiento de semilla (RSPS) y número de semillas (NSPS) por panoja por surco en el año 2016.

FV	RSPS	NSPS
Genotipos (Gen)	821.98*	1'910,392.35*
Densidades (Den)	425.67*	448,556.47*
Gen x Den	407.35 ns	47,204.92 ns
CV (%)	35	31

CV: Coeficiente de variación, *: Significativo; ns: No significativo.

Cuadro I.9 Rendimiento de semillas por panoja (g) de tres genotipos y dos densidades de plantas de sorgo en el año 2016.

Línea	Densidad (plantas ha ⁻¹)		Promedio
	125,000	62,500	
Rendimiento			
A1	30.4	31.2	30.8 a
A2	23.0	29.5	26.2 b
A3	27.1	28.0	27.6 ab
Promedio	26.7 B	29.6 A	
Número de semillas			
A1	1217	1361	1,289 a
A2	944	1062	1,003 b
A3	993	1004	999 b
Promedio	1051 B	1142 A	

Valores con letra distinta mayúscula o minúscula en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

I.5.2.1 Producción de polen diario y acumulado en el año 2016

La producción promedio de PD durante un día fue de 112 mg, la producción máxima (193 mg) se obtuvo 12 d después del inicio de antesis, En la producción de PA la tendencia fue sigmoïdal ($y = -3.6112x^3 + 51.925x^2 - 121.4x + 74.208$; $R^2 = 0.99$), con un máximo de 558 mg después de 14 d del inicio de antesis (Figura I.2). El polen producido durante el año 2015 presentó la misma tendencia que la del año 2016.

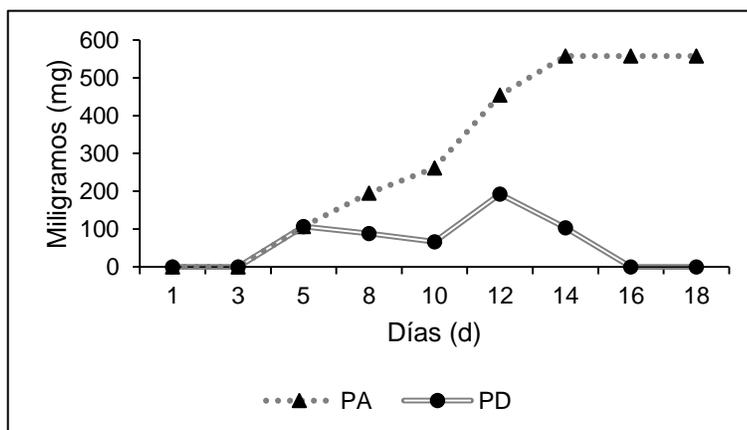


Figura I.2 Producción de polen diario (PD) y acumulado (PA) del progenitor masculino en el año 2016.

I.6 CONCLUSIONES

Entre el grupo de líneas androestériles, la línea A1 es la más tardía, con mayor periodo de la floración, mayor número de semillas por panoja y panojas más largas. La línea A2 presenta el mayor rendimiento de semilla por panoja, las plantas de menor porte y el menor diámetro de tallo. La línea A5 es la más precoz, con mayor excursión, menor longitud y ancho de panoja, y menor rendimiento de semilla por panoja. La línea A9 es de precocidad similar a la línea A1, pero con menor período de la floración, mayor porte, mayor diámetro de tallo y menor número de semillas por panoja. La línea R19 es un buen progenitor masculino, ya que su producción de polen fue suficiente para polinizar a las plantas hembra aún en una proporción de surcos hembra-macho de 16:2.

I.7 AGRADECIMIENTOS

Se agradece a CONACyT y al Colegio de Posgraduados por el apoyo otorgado al primer autor durante sus estudios de Maestría. Además, al personal del Colegio de Postgraduados por el apoyo para realizar las actividades de campo.

I.8 LITERATURA CONSULTADA

Brown P. J., P. E. Klein, E. Bortiri and C. B. Achrya (2006) Inheritance of inflorescence architecture in sorghum. *Theoretical Applied Genetics* 113:931-942.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-006-0352-9>

Cisneros-López M. E., A. J. Valencia-Botín and Y. Estrada-Girón (2015) Sorghum (*Sorghum bicolor*) pollen availability and seed set under different proportion

male:female plants in Mexican highlands. *Facultad de Ciencias Agrarias UNcuvo* 48:1-16. <http://www.fca.uncu.edu.ar/>

FAOSTAT (2017) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Consultada en <http://faostat.fao.org>. (Abril 2017).

Galicia-Juárez M., L. E. Mendoza-Onofre, V. A. González-Hernández, M. E. Cisneros-López, I. Benítez-Riquelme and L. Córdova-Téllez (2017a) Heterosis and combining ability of seed physiological quality traits of single cross vs. three-way sorghum hybrids. *Acta Scientiarum. Agronomy* 39:175-181. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v39i2.31198>

Galicia-Juárez M., L. E. Mendoza-Onofre, V. A. González-Hernández, M. E. Cisneros-López, I. Benítez-Riquelme and L. Córdova-Téllez (2017b) Heterosis and combining ability for seed yield and agronomic traits of single cross vs. three-way sorghum under chilling temperatures. *Revista Fitotecnia Mexicana* (en proceso).

Hernández-Martínez M., L. E. Mendoza-Onofre, 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 Science and Technology* 34:393-402. <https://doi.org/10.15258/sst.2006.34.2.15>

Mendoza-Onofre L. E., M. E. Cisneros-López, M. Galicia-Juárez y M. Hernández-Martínez (2017) Líneas mantenedoras (líneas B) y restauradoras (líneas R) de sorgo granífero adaptadas a los Valles Altos Centrales de México *Revista Fitotecnia Mexicana* 40:107-110.

- Poehlman M. J. y D. A. Sleper (2003)** Mejoramiento Genético de las Cosechas. 2a. Ed. México, Limusa. 506 p.
- SIAP (2017)** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultada en www.siap.gob.mx. (Abril 2017).
- Tüsüz M. A. (1997)** Heterosis in sorghum. *In: Book of Abstracts. The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops; an International Symposium. CIMMYT. México.* pp:326-327.
- UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plant) (2012)** Sorghum. TG/122. UPOV Code: SRGHM. Sorghum ssp. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. 48 p.
- Yanase M., I. Tarumoto and S. Kasuga (2008)** Effects of day-length and night temperature on the flowering of sorghum varieties with a dominant thermosensitivity gene. *Grassland Science* 54:57-61. <https://doi.org/10.1111/j.1744-697X.2008.00106.x>
- Yu J. and M. R. Tuinstra (2001)** Genetic analysis of seedling growth under cold temperature stress in grain sorghum. *Crop Science* 41:1438-1443. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.4151438x>

**CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE HONGOS ASOCIADOS
A ENFERMEDADES FOLIARES EN LÍNEAS A y EN CRUZAS DIRECTAS y
RECÍPROCAS AxB DE SORGO**

**PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF FUNGI ASSOCIATED TO FOLIAR
DISEASES IN A_LINES, AND IN DIRECT AND RECIPROCAL AxB CROSSES OF
SORGHUM**

II.1 RESUMEN

La producción de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] en la región de los Valles Altos Centrales de México (VACM) constituye una alternativa para la diversificación de los cultivos en esta zona. Sin embargo, durante la generación de híbridos simples y trilineales se ha observado la presencia de estrías cloróticas con tonalidades rojiza o púrpura en los limbos y manchas necróticas en las vainas foliares. Estos síntomas se han atribuido a diferentes grupos de hongos desconociéndose las especies involucradas. El objetivo del presente trabajo fue identificar mediante reconstrucción filogenética las especies aisladas de las líneas A, cruzas directas y recíprocas AxB no isogénicas. En el año 2015, se evaluaron 14 genotipos (cinco cruzas AxB directas, cinco recíprocas y cuatro líneas A) y en el 2016 solo cuatro líneas A. Para el aislamiento de los hongos se seleccionó una porción de tejido con el síntoma de la enfermedad, se desinfectó y se colocó en medio de cultivo papa-dextrosa-agar; después de 8 d se procedió a la purificación. Se obtuvieron 50 aislamientos en los que se extrajo el DNA, posteriormente se amplificó y secuenció el Espacio Transcrito Interno del rDNA con los iniciadores

ITS5/ITS4. La reconstrucción filogenética se realizó mediante estadística Bayesiana. Los resultados indicaron la formación de dos clados, en el Clado I se agruparon las especies de *Fusarium*: *F. thapsinum* fue la más frecuente en todas las cruzas y líneas, y estuvo presente en limbos y vainas; *F. circinatum*, *F. temperatum*, *F. equiseti*, *F. poae* solamente en limbos. En el Clado II se agruparon las especies *Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum* y *Curvularia trifolii* solo en limbos. Ninguna de estas especies ha sido reportada en sorgo en la región de VACM por lo que se debería evaluar su potencial patogénico en el programa de mejoramiento genético de sorgo tolerante al frío.

Palabras clave: *Alternaria*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Sorghum bicolor* (L) Moench, cruzas directas y recíprocas, líneas androestériles.

II.2 SUMMARY

The production of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] in the Mexican Highlands is an alternative for the diversification of crops in this area. However, during the development of single and three-way sorghum hybrids the presence of chlorotic stripes with reddish or purple tonalities in the leaf blades and necrotic spots in the leaf sheaths have been observed. These symptoms have been attributed to different groups of fungi, but the species involved are unknown. The objective of the present study was to identify by phylogenetic reconstruction the isolated fungi of A_lines, and direct and reciprocal non-isogenic AxB crosses. In 2015, 14 genotypes were evaluated (five AxB direct crosses, five reciprocal crosses and four A_lines) and in 2016 only four A_lines. For the fungi isolation a portion of the foliage tissue with the symptom of the disease was selected, it was disinfested and placed in a potato-dextrose-agar culture medium. After 8

days the purification was carried on. Fifty isolates were obtained in which the DNA was extracted, then the Internal Transcribed Space of the rDNA was amplified and sequenced with the ITS5 / ITS4 primers. Phylogenetic reconstruction was performed using Bayesian statistics. Results indicated the formation of two clades, in Clade I *Fusarium* species were grouped: *F. thapsinum* was the most frequent in all the crosses and lines, and it was present in leaf blades and leaf sheaths; *F. circinatum*, *F. temperatum*, *F. equiseti*, *F. poae* were found only in leaf blades. In Clado II *Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum* and *Curvularia trifolii* species were grouped only in leaf blades. None of these species have been reported in sorghum in the Mexican Highlands, so their pathogenic potential should be evaluated in the breeding program for cold tolerant sorghum.

Index words: *Alternaria*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Sorghum bicolor* (L)

Moench, direct and reciprocal crosses, male sterile lines.

II.3 INTRODUCCIÓN

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es una de las gramíneas más importantes por su uso en la alimentación animal y como cultivo alternativo para la producción de bioenergía en América, África y el Caribe (Watanabe *et al.*, 2017). Entre los cereales, el cultivo del sorgo ocupa el sexto lugar mundial con un volumen de producción de 63 millones de toneladas de grano (FAOSTAT, 2017). En México, en el año 2016 se sembraron 1.5 millones de hectáreas aproximadamente, con un volumen cercano a 2.9 millones de toneladas anuales, y un rendimiento promedio entre 3.7 y 3.9 t ha⁻¹ (SIAP, 2017).

Esta superficie se siembra principalmente con híbridos simples procedentes de programas de mejoramiento genético en los que se utiliza el sistema de androesterilidad genético-citoplásmica. En este sistema intervienen tres tipos de líneas, denominadas A, B y R. Las líneas A y B son isogénicas excepto que la línea A es androestéril (su citoplasma induce la androesterilidad) y la línea B es androfértil. La línea R (denominada “restauradora”) también es androfértil con citoplasma normal y con genes nucleares que restauran la fertilidad de la F1 de la cruce AxR (Mendoza-Onofre *et al.*, 2017). Los progenitores femeninos de los híbridos simples son las líneas A. En los híbridos trilineales los progenitores femeninos son híbridos simples androestériles producto del cruzamiento entre una línea A x una línea B no isogénica (Galicia-Juárez *et al.*, 2017).

Fusarium es un género que agrupa numerosas especies de hongos de importancia agronómica porque su gran diversidad genética y habilidad para causar enfermedades, principalmente asociadas con pudriciones de tallo y raíz (Leslie *et al.*, 2005). La búsqueda de resistencia genética a estas especies es una tarea permanente, especialmente en esta era en la que los cambios del clima favorecen la presencia de nuevos patógenos o de enfermedades emergentes. El impacto del cambio climático en la incidencia de las enfermedades en un cultivo dependerá de la naturaleza de los efectos tanto en el hospedero, en el patógeno y en sus respectivas interacciones (Garrett *et al.*, 2006).

En los Valles Altos Centrales de México, no existen siembras comerciales de sorgo, principalmente por la susceptibilidad al frío del germoplasma tropical; no obstante, existen variedades y líneas A, B y R que recientemente se han liberado, que muestra tolerancia esta restricción ambiental (Mendoza-Onofre *et al.*, 2017) cuya combinación

pueden originar híbridos simples y trilineales que pueden ofrecerse a los productores interesados en diversificar la agricultura de esta región. En las siembras experimentales de sorgo en esta región, se ha detectado la presencia de *Fusarium verticillioides* (Cisneros *et al.*, 2007) y *Claviceps africana* (Cisneros-López y Mendoza-Onofre, 2010).

El objetivo de la presente investigación fue la identificación filogenética de hongos asociados a plantas con síntomas como tizones, bordes de limbos ondulados y proliferación de ramas axilares, en líneas A, cruzas directas y recíprocas AxB no isogénicas de sorgo, progenitores femeninos utilizados en el programa de mejoramiento de sorgo de Valles Altos Centrales de México bajo condiciones de campo.

II.4 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad - Producción de Semillas, del Colegio de Postgraduados; y en el Campo Experimental del Campus Montecillo, Estado de México, con coordenadas geográficas 19° 27' 49" N y 98° 54' 19" O y 2,243 msnm, las temperaturas mínimas mensuales que prevalecen son cercanas a 8 °C durante la estación de crecimiento.

II.4.1 Año 2015

Se utilizaron 14 genotipos de sorgo. Diez genotipos provenían de plantas F1 generadas mediante cruzas dialélicas (cinco cruzas directas: A1xB2, A5xB9, A5xB2, A5xB1, A2xB9; cinco cruzas recíprocas: A2xB1, A9xB5, A2xB5, A1xB5, A9xB2) y cuatro líneas A (A1, A2, A5 y A9).

La fecha de siembra fue el 23 de abril. Las parcelas del progenitor femenino fueron de 3 m de largo con 0.80 m de distancia entre surcos. Las prácticas culturales que se realizaron incluyeron una escarda a los 30 d de la emergencia y un raleo de 10 cm entre plantas. Se fertilizó con las dosis de 120-80-00 en la siembra y 80-00-00 en el aporque (segundo cultivo). Durante el ciclo del cultivo se aplicaron 6 riegos, 3 deshierbes manuales y 2 aplicaciones de atrazina (2 L ha⁻¹) para el control de malezas.

II.4.1.1 Colecta de plantas sintomáticas

Las muestras vegetales se colectaron cuando las plantas se encontraban en la etapa de “embuche” (hoja bandera madura), en cinco plantas por genotipo, con síntomas de rayado color rojo o púrpura en los limbos, puntos necróticos de color negro o rojo en las vainas foliares (Figura II.1A) o lesiones con bordes irregulares en la vaina foliar (Figura II.1B).

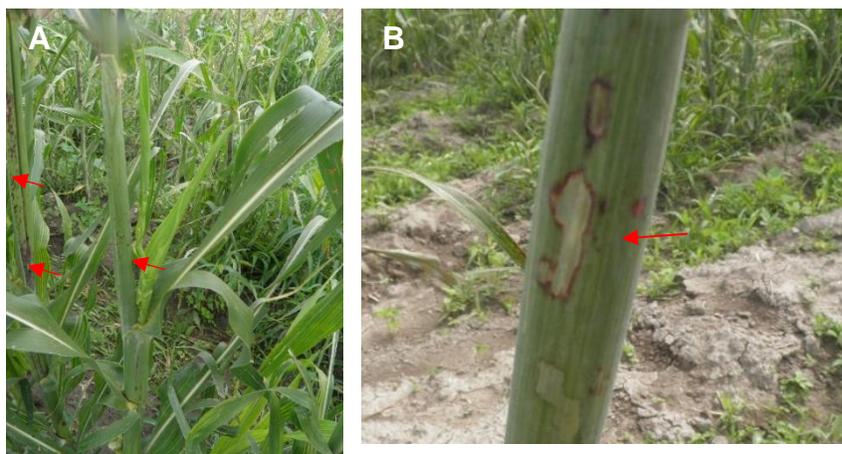


Figura II.1 Síntomas observados en progenitores femeninos de sorgo sembrados en Montecillo, Estado de México. A) Estrías de color rojo o púrpura en limbos; B) Presencia de puntos negros o rojos; o lesiones con bordes irregulares en vainas foliares.

II.4.2 Año 2016

En este año se evaluaron cuatro líneas androestériles (A1, A2, A3, A5) de sorgo. Se colectaron muestras de los limbos de plantas sintomáticas, en la etapa de madurez fisiológica de las semillas. El manejo agronómico fue similar al año 2015.

II.4.3 Identificación filogenética: Siembra y aislamiento de hongos

Se cortaron porciones de tejido foliar (1x1 cm) de la zona de avance de la enfermedad, las que se lavaron, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% y se enjuagaron al menos tres veces con agua destilada estéril. El tejido desinfectado se colocó sobre “sanitas” estériles para retirar el exceso de humedad. Posteriormente, se retiró con un bisturí los bordes de la hoja desinfectada y el tejido se colocó en cajas de Petri con medio de cultivo papa, dextrosa, agar (PDA) (Bioxon, USA). A los 7 d, se observó el desarrollo de las colonias, las que se transfirieron individualmente a nuevas cajas de Petri por el método de punta de hifa, para obtener cultivos puros. Cada uno de los aislamientos se conservó en tubos Eppendorf de 2 mL en los que se añadió 1 mL de medio líquido LB (Luria-Bertani) con glicerol al 30%. Los tubos se mantuvieron en un ultracongelador (Thermo Scientific, USA) a -86°C.

II.4.3.1 Extracción de DNA

Se procedió a precalentar el CTAB al 2 % (Doyle y Doyle, 1990) en baño María a 60 °C. En un tubo Eppendorf de 2 mL se adicionó 1mL de CTAB, posteriormente se agregó el micelio de cada aislamiento con una espátula. Los tubos se incubaron a baño María a 96 °C por 1 h y se mezclaron por inversión a intervalos de 20 min, después se centrifugaron a 11,150 x g por 5 min; el sobrenadante se colocó en un nuevo tubo

Eppendorf de 1.5 mL, previamente etiquetado. Se agregó 500 μ L de cloroformo-isoamílico (24:1) a cada tubo, se mezclaron por inversión por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 11150 x g por 10 min. El sobrenadante se colocó en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL y se agregó 700 μ L de cloroformo-isoamílico (24:1) a cada tubo, se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente.

Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a otro tubo y el DNA se precipitó con 950 μ L de etanol al 100% previamente enfriado a -20 °C, se mezcló suavemente por inversión y los tubos se mantuvieron a -20 °C por 2 h. A continuación, para sedimentar el DNA se centrifugó a 11,150 Xg por 30 min. Se decantó el etanol, sin perder el DNA. La pastilla se resuspendió con 400 μ L de agua HPLC y se incubó en un baño María a 60 °C por 15 min. Después de la incubación, se añadió 34 μ L de acetato de sodio (NaOAc 3 M) y después 1 mL de etanol al 95 %. Las muestras se enfriaron a -20 °C durante 1 h, después de lo cual se centrifugaron a 11,150 Xg por 5 min. Se decantó el etanol sin perder el DNA. Se agregó 600 μ L de isopropanol al 70 % y se centrifugó a 11,150 Xg por 5 min; el lavado con isopropanol al 70 % se repitió nuevamente.

Los tubos se mantuvieron en una cámara de PCR para secar la pastilla DNA al menos 1 h. Se rehidrató la pastilla con 50 μ L de agua HPLC y se almacenaron los tubos a -20 °C.

II.4.3.2 Amplificación por PCR del operón ribosomal

Se amplificó el Espacio Transcrito Interno (ITS) del rDNA con los iniciadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990), que reconocen el extremo 3' del 18S, el ITS1, 5.8S, el ITS2 y el extremo 5' del 28S rDNA. La mezcla de reacción se preparó con 7.86 μ L agua HPLC,

3.00 μL de Buffer 5X; 0.6 μL de dNTPS, 0.18 μL Primer F (ITS5), 0.18 μL Primer R (ITS4) y 0.18 μL *Taq* (Promega, USA). A esta mezcla se agregó 3 μL de DNA por muestra; para un volumen final de 15 μL . La amplificación de DNA se realizó en un termociclador Peltier Thermal Cycler Modelo C1000 Touch (BIO-RAD, USA). El programa consistió en un ciclo inicial de desnaturalización de 4 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 58 °C y 2 min a 72 °C y un ciclo final de desnaturalización de 10 a 72 °C.

Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa Seakem (Lonza, USA) al 1.5 % a 85 volts constantes, preparado con 1x TAE buffer (Tris ácido acético glacial-EDTA). El gel se tiñó con 4 μL gel red (GelRed® Nucleic Acid Stain 10, 000X in Water Biotum, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV (X-PRESS, Germany) con el software Infinity (Vilber Lourmat, Version 15.01 para Windows).

Los productos de PCR amplificados se limpiaron mediante una reacción enzimática con ExoSAP- IT™ (Affymetrix, USA), que consistió en mezclar 3.5 μL del producto de PCR con 1.4 μL de ExoSAP. Los tubos se colocaron en un termociclador a 37 °C por 15 min para que las enzimas de ExoSAP degraden el remanente de iniciadores y nucleótidos no utilizados en la reacción de PCR. Finalmente, las enzimas de ExoSAP se inactivaron a 80 °C por 15 min.

II.4.3.3 Secuenciación Sanger

Se colocaron 18 μL del buffer BigDye® Terminator v3.1 (1X) (Applied Biosystems, USA) más 2 μL de cada una de las muestras en los pozos de la placa de secuenciación. Cada placa se colocó en un termociclador (Biorad, México). Los productos de

secuenciación se precipitaron con etanol/EDTA, y la placa se colocó en el Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, USA).

II.4.3.4 Análisis filogenético

Las secuencias de ambas hebras se ensamblaron y editaron con el software BioEdit Sequence Alignment Editor Copyright© versión 7.2.5 (Hall, 1999) creándose una secuencia consenso para cada aislamiento, la que se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLAST Nucleotide (Zhang *et al.*; 2000).

Las secuencias consenso y las de referencia se compilaron en un formato “fasta” y se alinearon usando el alineamiento múltiple de secuencias del programa Muscle (Edgar, 2004) incluido en el MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016); los archivos mega se convirtieron en archivo nexus para el análisis filogenético.

La reconstrucción filogenética se realizó con estadística Bayesiana usando Mr. Bayes v.3.1.2. (Ronquist y Huelsenbeck, 2003); se utilizó el modelo de sustitución nucleotídica ‘Generalised time reversible’ (GTR) con 500,000 generaciones. El 25% de los primeros árboles se descartaron con la opción burn-in phase de cada análisis, y la posterior probabilidad se determinó con los árboles restantes. Se usó como fuera de grupo a *Colletotrichum sublineola* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=Colletotrichum+AND+sublineolum+CBS>) accesión NR_111191. El árbol filogenético resultante se visualizó con el programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

II.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.5.1 Hongos aislados por genotipo en el año 2015

El número de especies fúngicas difirió según el genotipo de sorgo y el tejido de la planta muestreado. La especie más frecuente fue *Fusarium thapsinum*, que se localizó en 8 genotipos; seguida de *F. equiseti*, *F. circinatum*, y *F. temperatum*, presente cada una en 3 genotipos; mientras que *F. poae*, *Alternaria alternata* y *Curvularia trifolii* solamente se localizaron en un genotipo cada una. En cuanto a los tejidos de la planta en los que ubicaron las especies fúngicas, *F. thapsinum* y *F. circinatum* estuvieron presente en limbos y vainas; mientras que *F. temperatum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *A. alternata* y *C. trifolii* solo en limbos (Cuadro II.1). Funnell-Harris *et al.* (2016) sugieren que la presencia y proporción de algunos polímeros orgánicos, como la lignina, está relacionada con la habilidad de *Fusarium* para colonizar los tejidos; los limbos contienen menos carbohidratos estructurales que las vainas foliares que envuelven al tallo.

El mayor número de especies fúngicas se aislaron de la craza A2xB1. En las cruzas A1xB2, A5xB9, A9xB2 y en línea A9 solamente se aislaron dos especies. En las cruzas A1xB5, A2xB5, A2xB9, A5xB1, A5xB2, A9xB5, línea A1, A2 y A5 solo se identificó una especie (Cuadro II.1).

En las cuatro líneas A, la especie *F. thapsinum* estuvo presente; esta especie también se aisló en las cruzas directas y en las cruzas recíprocas, en donde cada progenitor intervino como hembra (línea A) o como macho (línea B) de las cruzas AxB no isogénicas, lo que confirmaría el carácter isogénico de las líneas A y B, en cuanto a la presencia de esta especie fúngica. Sin embargo, en ninguna línea A se aislaron *F. equiseti*, *F. circinatum*, *F. poae*, *C. trifolii* y *A. alternata*, y en cambio en algunas cruzas

AxB no isogénicas si se pudieron aislar estas especies, lo que indica que el grado de isogenia de las líneas A y B depende del carácter fisiológico, morfológico o patogénico a investigar.

Cuadro II.1 Hongos fitopatógenos aislados en líneas A y en cruzas recíprocas y directas AxB de sorgo en el año 2015.

♀ / ♂	Cruzas dialélicas			
	B1	B2	B5	B9
A1	<i>F. thapsinum</i> (L)	<i>F. temperatum</i> (L) <i>F. equiseti</i> (L)	<i>F. poae</i> (L)	NSS
A2	<i>F. thapsinum</i> (L+V) <i>F. circinatum</i> (L+V) <i>F. temperatum</i> (L)	<i>F. thapsinum</i> (L)	<i>F. circinatum</i> (L)	<i>F. thapsinum</i> (L)
A5	<i>F. thapsinum</i> (L+V)	<i>F. equiseti</i> (L)	<i>F. thapsinum</i> (L)	<i>A. alternata</i> (L) <i>C. trifolii</i> (L)
A9	NSS	<i>F. thapsinum</i> (L) <i>F. circinatum</i> (L)	<i>F. equiseti</i> (L)	<i>F. thapsinum</i> (L+V) <i>F. temperatum</i> (L)

NSS: No se sembró; L: Limbo; V: Vaina.

II.5.2 Hongos aislados por genotipo en el año 2016

En este año el número de especies fúngicas también difirió según el genotipo de sorgo. La especie más frecuente fue *F. thapsinum* (localizada en 3 líneas A); seguida de *F. proliferatum* y *F. equiseti* (presentes en 2 líneas); y *F. circinatum*, *E. nigrum* y *Alternaria alternata* (en solamente una línea cada una). En la línea A3 hubo el mayor número de especies fúngicas (4); en la línea A1 se identificaron dos especies, en la A2 fueron tres especies y en la línea A5 solo una especie (Cuadro II.2).

La mayoría de las especies de hongos se presentaron en ambos años y la especie *F. thapsinum* se presentó de manera recurrente en las líneas A1 y A5. Las especies de *Fusarium* mostradas en los Cuadros II.1 y II.2 pertenecen al complejo *Gibberella fujikuroi*

Cuadro II.2 Hongos fitopatógenos aislados en limbos foliares en líneas A de sorgo evaluadas en los Valles Altos Centrales de México en el año 2016.

Línea	Patógeno
♀	
A1	- <i>F. thapsinum</i>
	- <i>F. circinatum</i>
A2	- <i>F. proliferatum</i>
	- <i>F. equiseti</i>
	- <i>E. nigrum</i>
A3	- <i>A. alternata</i>
	- <i>F. equiseti</i>
	- <i>F. proliferatum</i>
	- <i>F. thapsinum</i>
A5	- <i>F. thapsinum</i>

el cual es un taxón monofilético que incluye un conjunto de especies de *Fusarium* con características morfológicas similares y superpuestas que complican su diferenciación (Kvas *et al.*, 2009). Este complejo está formado por 11 especies sexualmente fértiles (conocidas como poblaciones de apareamiento, “mating populations, MPs”) y por lo menos 32 anamorfos pertenecientes al género *Fusarium* sección Liseola (Leslie y Summerell, 2006); a la fecha se consideran al menos 50 especies (O’Donnell *et al.*, 2015). Algunas de las especies de *Fusarium* pertenecientes al complejo *Gibberella fujikuroi* son: *F. verticillioides*, *F. sacchari*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum*, *F. nygami*, *F. circinatum*, *F. konzum*, *F. gaditjirri* y *F. xylarioides*; algunas de las cuales se identificaron en esta investigación. De manera general *Fusarium* y *A. alternata* son hongos que ocasionan diversos tipos de “tizones” que invaden el tejido vascular desde la etapa de plántula hasta planta adulta, así como pudriciones en los órganos vegetativos como hojas, tallo y raíz (Figueroa-Rivera *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 2011).

Fusarium thapsinum no había sido reportado previamente en esta área de México y los resultados del presente estudio muestran una mayor diversidad de especies del

género *Fusarium* de lo esperado bajo condiciones de campo. En Río Bravo, Tamaulipas (0 a 50 msnm, temperatura media anual de 23. 5° C y precipitación media anual entre 450 y 720 mm); donde se cultiva cerca del 80% del sorgo en México (SIAP, 2017), se ha reportado *F. thapsinum* como especie asociada a los mohos de grano junto a otras especies tales como *A. alternata*, *C. lunata* y *Bipolaris* sp. (Montes- García *et al.*, 2010). En África, existen reportes de la presencia de *F. thapsinum*, *F. proliferatum* y *F. andiyazi* (en sorgo) y *F. pseudonygamai* (en mijo, *Panicum miliaceum*) (Leslie *et al.*, 2005). En los Valles Centrales de México, y en particular en Montecillo, Estado de México, durante la fase inicial de crecimiento vegetativo (entre abril y mayo) en años recientes se han registrado temperaturas máximas/mínimas entre 28-30° C/11-16° C, que superan hasta con cinco grados los datos históricos, lo que robustece la hipótesis que, en esta región, el cambio climático está favoreciendo la presencia de nuevas especies de patógenos.

En Australia, en lo que se considera el primer informe formal de *Fusarium andiyazi* y *F. thapsinum* estas dos especies se aislaron con mayor frecuencia en sorgo, con 61% y 82% de los aislamientos, respectivamente. La dominancia y abundancia de estas especies se asoció con áreas agroclimáticas (Petrovic *et al.*, 2009).

La especie *F. thapsinum* es un patógeno importante en el cultivo de sorgo, que ocasiona la pudrición del tallo la que se considera como la enfermedad más común y se ha reportado que ocasiona pérdidas hasta del 90% en el rendimiento (Funnell-Harris *et al.*, 2016; Klittich *et al.*, 1997; Leslie, 2008). Este hongo también deteriora las semillas reduciendo la calidad y el vigor (Bandyopadhyay *et al.*, 2000, Little y Magill, 2003). La especie *F. temperatum* se ha reportado en maíz (Pintos-Varela *et al.*, 2013), y está relacionada morfológica y filogenéticamente con *F. subglutinans*; los síntomas son

malformaciones de plántulas, clorosis, reducción de brotes y podredumbre del tallo; en las semillas puede producir micotoxinas y fumonisina B₁ (Scauflaire *et al.*, 2012).

La especie *F. proliferatum* es un patógeno que comúnmente produce fumonisinas B₁ (FB₁) y B₂ (FB₂), dos micotoxinas relacionadas estructuralmente con actividad promotora del cáncer, este patógeno se aisló del cultivo de maíz (Ghiasian *et al.*, 2005). *F. poae* es un patógeno relativamente poco frecuente con una importancia creciente en los cereales, principalmente debido a su capacidad para producir micotoxinas (Stenglein *et al.*, 2014). *F. circinatum*, se considera una de las enfermedades más importantes de los pinos en todo el mundo (Pfenning *et al.*, 2014), aunque no se la ha reportado en sorgo. *F. equiseti* es un saprófito del suelo ampliamente distribuido en el mundo (Onyike *et al.*, 1992). *A. alternata* provoca lesiones foliares de manera irregular de color gris claro con distintos bordes rojos parduzcos oscuros alrededor de las lesiones (Zhao *et al.*, 2016). *E. Nigrum* se usa como un agente antifúngico que disminuye la cantidad de conidios de *Monilinia* spp., en frutas (De Cal *et al.*, 2009). *C. trifolii* es un patógeno en *Trifolium alexandrinum* (bersen trébol), ocasiona pérdidas hasta del 100% en la producción de semillas y la muerte del 60% del dosel, los síntomas característicos son clorosis intervenales al inicio para después formar manchas marrones con una forma de “V” distintiva (Khadka, 2016).

II.5.3 Árbol filogenético

El árbol filogenético se construyó mediante inferencia bayesiana empleando las secuencias, cuya longitud aproximada fue de 550 bp, que se obtuvieron de la amplificación de las regiones completas del ITS 1 y 2, en 50 aislamientos de hongos

provenientes de diferentes tejidos de la planta en ambos años. La matriz se definió con 63 taxas y 662 caracteres incluyendo gaps. En general se formaron dos clados. En el Clado I, las especies pertenecen al complejo *Gibberella fujikuroi*, se agruparon las especies *F. proliferatum*, *F. circinatum*, *F. poae*, *F. equiseti* y *F. thapsinum* (Figura II.2). El Clado II agrupó las especies *C. trifolii*, *A. alternata* y *E. nigrum*. Todos los hongos identificados correspondieron a la clase Ascomycetes.

II.6 CONCLUSIONES

El número de especies fúngicas encontradas en el Estado de México varió según el genotipo de sorgo y tejido de la planta muestreado. La especie más frecuente fue *Fusarium thapsinum*, el que junto con *F. circinatum*, estuvieron presentes en limbos y vainas foliares. Las otras especies fúngicas *F. temperatum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *A. alternata* y *C. trifolii* solamente se aislaron en limbos.

En la cruz A2xB1 se encontró el mayor número de especies fúngicas (tres); en las cruzas A1xB2, A5xB9, A9xB2 y en la línea A9 solo hubo dos especies. Las cruzas A1xB5, A2xB5, A2xB9, A5xB1, A5xB2, A9xB5 y en las líneas A1, A2 y A5 solo se identificó una especie de hongo. Sin embargo, no se ha reportado la presencia de ninguno de estos hongos en la región de los Valles Altos Centrales de México.

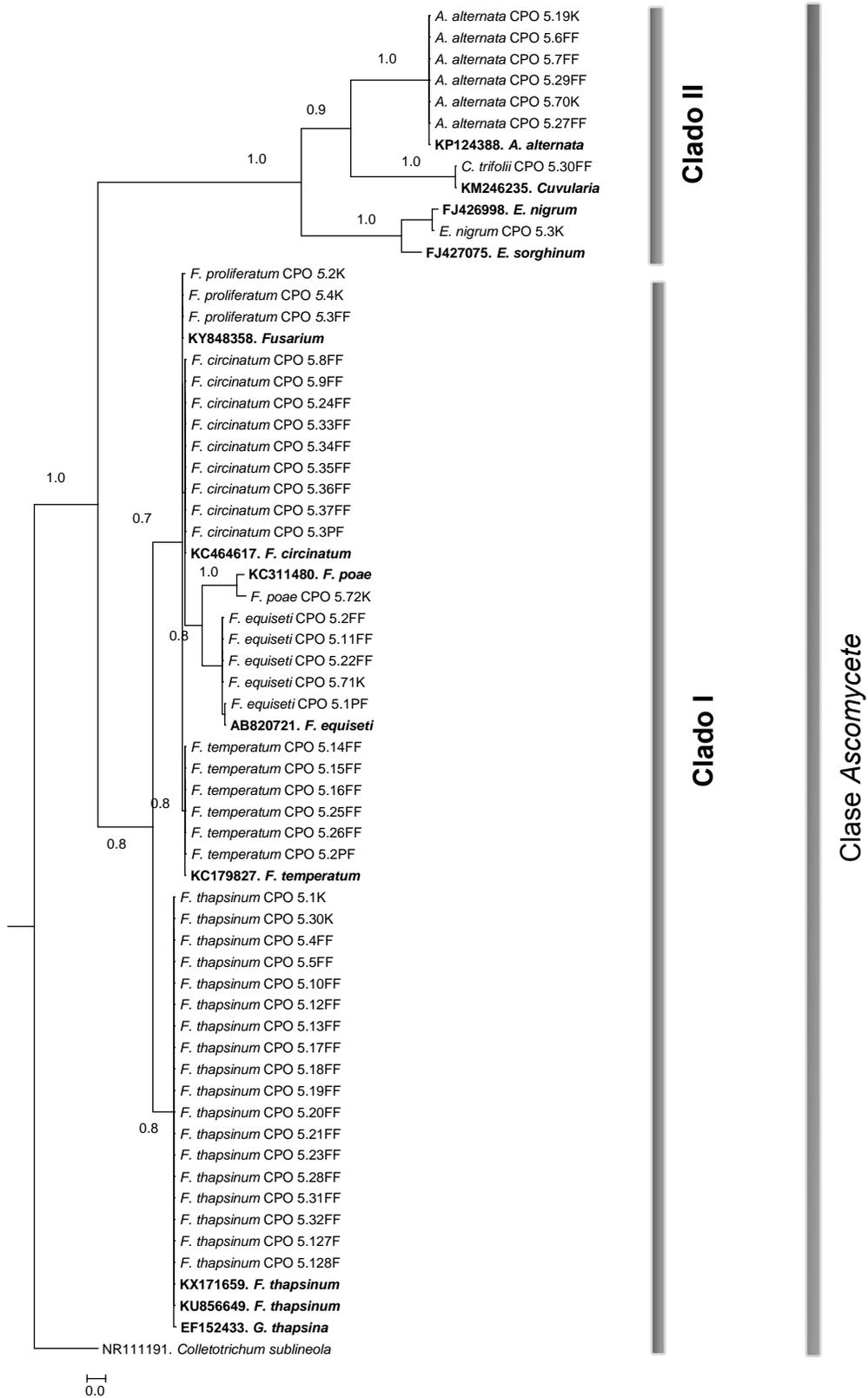


Figura II.2 Árbol filogenético construido con secuencias correspondientes a la región del Espacio Transcrito Interno del rDNA mediante inferencia bayesiana.

II.7 AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONACyT y al Colegio de Posgraduados por los apoyos otorgados durante los estudios de maestría del primer autor. Además, al personal de campo y del Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del PREGEP-Producción de Semillas, COLPOS para la realización de la presente investigación.

II.8 LITERATURA CONSULTADA

Bandyopadhyay R., D. R. Butler, A. Chandrashekar, R. K. Reddy and S. S. Navi

(2000) Technical and Institutional Options for Sorghum Grain Mold Management: Proceedings of an International Consultation *In: Biology, Epidemiology, and Management of Sorghum Grain Mold*. ICRISAT, India. pp:34-71.

Cisneros-López M. E. and L. E. Mendoza-Onofre (2010) Genotype and planting date effects on the quality of sorghum seeds infected with ergot. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33:69-77. <https://www.revistafitotecniamexicana.org/>

Cisneros-López M. E., L. E. Mendoza Onofre, G. Mora-Aguilera, L. Córdoba-Téllez y M. Livera-Muñoz (2007) Híbridos y progenitores de sorgo tolerantes al frío II: Efecto de *Fusarium verticillioides* (Sacc) Nirenberg en el rendimiento de semilla y sus componentes en condiciones de campo. *Agrociencia* 3:283-294. <http://www.colpos.mx/agrocien/agrociencia.htm>

De Cal A., I. Larena, M. Liñan, R. Torres, N. Lamarca, J. Usall, P. Domenichini, A. Bellini, X. O. de Eribe and P. Melgarejo (2009) Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit. *Journal of*

- Applied Microbiology* 106:592-605. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04030.x>.
- Doyle J. J. and J. L. Doyle (1990)** A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.
- Edgar R. C. (2004)** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- FAOSTAT (2017)** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Consultada en <http://faostat.fao.org>. (Abril 2017).
- Figuroa-Rivera M. G., B. Z. Guerrero-Aguilar, M. M. González-Chavira and J. L. Pons-Hernández (2010)** Characterization of *Fusarium* species associated with rotting of corn root in Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:124-134. <http://rmf.smf.org.mx/>
- Funnell-Harris D. L., P. M. O'Neill, S. E. Sattler and M. K. Yerka (2016)** Response of sweet sorghum lines to stalk pathogens *Fusarium thapsinum* and *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease* 100:896-903. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1050-RE>
- Galicia-Juárez M., L. E. Mendoza-Onofre, V. A. González-Hernández, M. E. Cisneros-López, I. Benítez-Riquelme and L. Córdova-Téllez (2017)** Heterosis and combining ability of seed physiological quality traits of single cross vs. three-way sorghum hybrids. *Acta Scientiarum Agronomy* 39:175-181. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v39i2.31198>

- Garrett K. A., S. P. Dendy, E. E. Frank, M. N. Rouse and S. E. Travers (2006)** Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. *Annual Review Phytopathology* 44:489-509. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143420>
- Ghiasian S. A., S. M. Rezayat, P. Kord-Bacheh, A. H. Maghsood, H. Yazdanpanah, G. S. Shephard, L. V. D. Westhuizen, H. F. Vismer and W. F. O. Marasas (2005)** Fumonisin production by *Fusarium* species isolated from freshly harvested corn in Iran. *Mycopathologia* 159:31-40. <https://doi.org/10.1007/s11046-004-3899-5>
- Hall T. A. (1999)** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 41:95-98. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- Herrera Parra E., I. M. Bacab-Pérez, J. C. Alejo, J. M. Tun-Suárez and E. Ruíz-Sánchez (2011)** Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. y su control *in vitro*. *Fitosanidad* 15:231-236. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209123682005>
- Khadka R. B. (2016)** First report of *Curvularia trifolii* causing leaf spot on *Trifolium alexandrinum* (Berseem Clover) in Nepal. *Plant Disease* 100:1246 <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0720-PDN>
- Klittich C. J. R., J. F. Leslie, P. E. Nelson and W. F. O. Marasas (1997)** *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): A new species in section Liseola from sorghum. *Mycologia* 89:643-652. <http://dx.doi.org/10.2307/3761002>

- Kumar S., G. Stecher and K. Tamura (2016)** MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kvas M., W. F. O. Marasas, B. D. Wingfield, M. J. Wingfield and E. T. Steenkamp (2009)** Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity* 34: 1-21. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/fdp.htm>
- Leslie J. F., K. A., Zeller, S.C. Lamprecht, J.P. Rheeder and W. F. O Marasas (2005)** Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95:275-283. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-95-0275>
- Leslie J. F. and B. A. Summerell (2006)** The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388 p.
- Leslie J. F. (2008)** Sorghum and Millets Diseases *In: Diseases of Finger Millet-A Global Overview*. USA. pp:19-26. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470384923.ch3>
- Little C. R. and C. W. Magill (2003)** Elicitation of defense response genes in sorghum floral tissues infected by *Fusarium thapsinum* and *Curvularia lunata* at anthesis. *Physiol. Physiological and Molecular Plant Pathology* 63:271-279 <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.02.001>
- Mendoza-Onofre L. E., M. E. Cisneros-López, M. Galicia-Juárez y M. Hernández-Martínez (2017)** Líneas mantenedoras (líneas B) y restauradoras (líneas R) de sorgo granífero adaptadas a los Valles Altos Centrales de México *Revista Fitotecnia Mexicana* 40:107-110.

- Montes-García, N., L. K. Prom, N. Montes-Rodríguez, M.A. Garcia-Gracia, V. Pecina-Quintero y A. Diaz-Franco (2010)** Efecto de fungicidas sistémicos en el control de la microbiota parasítica del grano de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 156-158.
- O'donnell K., T. J. Ward, V. A. R. G. Robert, P. W. Crous, D. M. Geiser and S. Kang (2015)** DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica* 43:583-595. <http://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>
- Onyike N. B. N. and P. E. Nelson (1992)** *Fusarium* species associated with sorghum grain from Nigeria, Lesotho, and Zimbabwe. *Mycologia* 84:452-458. <https://doi.org/10.2307/3760198>
- Pfenning L. H., S. da Silva Costa, M. Pereira de Melo, H. Costa, J. Aires Ventura, C. Garcia Auer, and Á. Figueredo dos Santos (2014)** First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39:210-216. <http://doi.org/10.1590/S1982-56762014000300004>
- Pintos-Varela C., O. Aguín Casal, M. Chaves Padin, V. Ferreiroa Martinez, J. Scauflaire, F. Munaut, M. J. Bande Castro and J. P. Mansilla Vázquez (2013)** First Report of *Fusarium temperatum* causing seedling blight and stalk rot on maize in Spain. *The American Phytopathological Society* 97:1252 <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-13-0167-PDN>
- Petrovic T., Walsh J. L., Burgess L. W and Summerell A. (2009)** *Fusarium* species associated with stalk rot of grain sorghum in the northern grain belt of eastern Australia. *Australasian Plant Pathology* 38:373-379.

- Ronquist F. and J. P. Huelsenbeck (2003)** MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic reference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Scauflaire J., M. Gourgue, A. Callebaut and F. Munaut (2012)** *Fusarium temperatum*, a mycotoxin-producing pathogen of maize. *The European Journal of Plant Pathology* 133:911-922. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-012-9958-8>
- SIAP (2017)** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultada en www.siap.gob.mx. (Abril 2017).
- Stenglein A. S., M. I. Dinolfo, G. Barros, F. Bongiorno, S. N. Chulze and M. V. Moreno (2014)** *Fusarium poae* pathogenicity and mycotoxin accumulation on selected wheat and barley genotypes at a single location in Argentina. *Plant Disease* 98:1733-1738. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0182-RE>
- Watanabe K., W. Guo, K. Arai, H. Takanashi, H. Kajiya-Kanegae, M. Kobayashi, K. Yano, T. Tokunaga, T. Fujiwara, N. Tsutsumi and H. Iwata (2017)** High-Throughput phenotyping of *Sorghum* plant height using an unmanned aerial vehicle and its application to genomic prediction modeling. *Frontiers in Plant Science* 8:421. <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.00421>
- White T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor (1990)** Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *In: PCR Protocols*. Academic Press, San Diego, CA. pp:315-322.
- Zhang Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller (2000)** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Computational Biology* 7:203-214.
<http://doi.org/10.1089/10665270050081478>

Zhao Y.-Q., K. Shi, L.-J. Zhang, D.-M. Zhang, X.-Y. Yu, Y.-Y. Dong, W.-B. Bi and H.-R. Yu (2016) First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on sorghum in China. *Plant Disease* 100:1782. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-15-1522-PDN>

**CAPÍTULO III. IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE BACTERIAS
ASOCIADAS A ENFERMEDADES FOLIARES EN LÍNEAS A y EN CRUZAS
DIRECTAS y RECÍPROCAS AxB DE SORGO**

**PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF BACTERIA ASSOCIATED TO FOLIAR
DISEASES IN A_LINES, AND IN DIRECT AND RECIPROCAL AxB CROSSES OF
SORGHUM**

III.1 RESUMEN

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es uno de los cereales más importantes en la dieta alimenticia y como cultivo bioenergético. En la región de Valles Altos Centrales de México (VACM) los limbos de las plantas presentan estrías cloróticas, proliferación de brotes laterales y ondulamientos en los bordes. Estos síntomas se han atribuido a la presencia de bacterias desconociéndose las especies involucradas. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue identificar, mediante reconstrucción filogenética, la presencia de bacterias aisladas de tejido foliar de líneas A y de cruzas simples directas y recíprocas AxB no isogénicas; y determinar si alguna de ellas cuenta con genes de hipersensibilidad (HrcV). En el año 2015, se evaluaron 14 genotipos (cinco cruzas AxB directas, cinco recíprocas y cuatro líneas A) y en el año 2016 solo cuatro líneas A. El aislamiento de las bacterias se llevó a cabo a partir de tejido sintomático, el cual se desinfectó y se maceró, se agregó 30 µL de la suspensión al medio de cultivo B de King y con un asa bacteriológica se distribuyó por estría cruzada; obteniéndose 128 aislamientos. Para la identificación filogenética se amplificó y secuenció la subunidad

pequeña del DNA ribosomal. Además, se detectó la presencia del gen de hipersensibilidad conservado (HrcV). La reconstrucción filogenética se efectuó mediante estadística Bayesiana; se construyeron dos árboles, uno para *Pseudomonas* y otro para las demás especies. La especie más frecuente fue *Pseudomonas* sp., en limbos, brotes laterales y limbos ondulados. Se identificó una posible nueva especie de *Pseudomonas*. Se detectó el gen HrcV en once aislamientos de sorgo.

Palabras clave: *Sorghum bicolor* (L) Moench, bacterias, cruzas directas y recíprocas, gen de hipersensibilidad (HrcV), líneas androestériles.

III.2 SUMMARY

Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) is one of the most important cereals in the diet and as a bioenergetic crop. In the Mexican Highlands it has been observed that the leaf blades of the plants show chlorotic stripes, proliferation of lateral shoots and undulations at the edges of the blades. These symptoms have been attributed to different bacteria, although the species involved are unknown. Therefore, the objective of the present study was to identify, by means of phylogenetic reconstruction, the presence of bacteria isolated from leaf tissue of A_lines and of direct and reciprocal non-isogenic AxB single crosses; and to determine if any bacteria has hypersensitivity genes (HrcV). In 2015, 14 genotypes were evaluated (five direct AxB crosses, five reciprocal crosses and four A_lines); in 2016 only four A_lines were studied. Isolation of the bacteria was carried out from symptomatic tissue, which was disinflated and macerated; 30 μ L of the suspension was added to the culture medium B of King, and distributed by crossed stripes with a bacteriological loop. We obtained 128 isolates. The small subunit of the ribosomal

DNA was amplified and sequenced for the phylogenetic identification. In addition, the presence of the conserved hypersensitivity gene (HrcV) was detected. Phylogenetic reconstruction was carried out using Bayesian statistics; two trees were built, one for *Pseudomonas* and one for the other species. The most frequent species was *Pseudomonas* sp. that was present in leaf blades, lateral shoots and undulations in the edges. A possible new species of a *Pseudomonas* was identified. The HrcV gene was detected in eleven sorghum isolates.

Index words: *Sorghum bicolor* (L) Moench, bacteria, direct and reciprocal crosses, hypersensitivity gene (HrcV), male sterile lines.

III.3 INTRODUCCIÓN

El sorgo es el sexto cultivo más importante del mundo, por su uso en la alimentación humana y ganadero (FAOSTAT, 2017). En México el grano se emplea para la formulación de dietas alimenticias en la industria pecuaria (Lorena-Ramírez *et al.*, 2006). En el año 2016 se sembraron cerca de 1.5 millones de hectáreas, con un volumen próximo a 2.9 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 3.8 t ha⁻¹ (SIAP, 2017).

Esta superficie se siembra principalmente con híbridos simples procedentes de programas de mejoramiento genético en los que se utiliza el sistema de androesterilidad genético-citoplásmica. En este sistema intervienen tres tipos de líneas, denominadas A, B y R. Las líneas A y B son isogénicas excepto que la línea A es androestéril (su citoplasma induce la androesterilidad) y la línea B es androfértil. La línea R (denominada “restauradora”) también es androfértil con citoplasma normal y con genes nucleares que restauran la fertilidad de la F1 de la cruce AxR (Mendoza-Onofre *et al.*, 2017). Los

progenitores femeninos de los híbridos simples son las líneas A. En los híbridos trilineales los progenitores femeninos son híbridos simples androestériles producto del cruzamiento entre una línea A x una línea B no isogénica (Galicia-Juárez *et al.*, 2017).

Una de las aportaciones del mejoramiento genético es la obtención de genotipos con características morfológicas, fisiológicas y genéticas que permitan mejorar los rendimientos y posean tolerancia o resistencia a enfermedades que permitan reducir pérdidas económicas a los productores. En los VACM existen variedades experimentales de sorgo disponibles para los productores interesados en diversificar la agricultura. Sin embargo, al igual que en las regiones tropicales, en la región de VACM la producción puede ser afectada por diversos patógenos que pueden causar enfermedades.

Uno de los últimos reportes en este cultivo es la presencia de la bacteria *Pantoea agglomerans* (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007) cuya incidencia y severidad se desconoce en cultivo del sorgo, lo mismo ocurre con otras bacterias presentes en la región de VACM. Dada la aparición de nuevas bacterias, es importante determinar si éstas son capaces de causar enfermedades en el cultivo de sorgo. Una de las pruebas que permite determinar de manera indirecta la patogenicidad de una bacteria es la reacción de hipersensibilidad (HR) debido a que los genes de hipersensibilidad van ligados a los genes de patogenicidad, es decir, que segregan juntos (García-Pineda y Lozoya-Gloria, 2004). Esta reacción forma parte de los mecanismos de defensa de la planta (Klement y Goodman, 1967; Greenberg, 1997) y se considera la máxima expresión de resistencia a la infección por fitopatógenos. Una de las primeras manifestaciones en la HR es la muerte celular localizada donde se observa lesiones necróticas (Alfano y Collmer, 2004). Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación

fue identificar, mediante reconstrucción filogenética, la presencia de bacterias aisladas de tejido foliar de líneas A y de cruzas simples directas y recíprocas AxB no isogénicas sembradas en la región de los Valles Altos Centrales de México, y determinar si alguna de ellas cuenta con los genes de hipersensibilidad (HrcV).

III.4 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad - Producción de Semillas, del Colegio de Postgraduados y en el Campo Experimental del Campus Montecillo, Estado de México, con coordenadas geográficas 19° 27' 49" N y 98° 54' 19" O y 2,243 msnm.

III.4.1 Año 2015

Se utilizaron 14 genotipos de sorgo. Diez genotipos provenían de plantas F1 generadas mediante cruzas dialélicas (cinco cruzas directas: A1xB2, A5xB9, A5xB2, A5xB1, A2xB9; cinco cruzas recíprocas: A2xB1, A9xB5, A2xB5, A1xB5, A9xB2) y cuatro líneas A (A1, A2, A5 y A9).

La fecha de siembra fue el 23 de abril. Las parcelas del progenitor femenino fueron de 3 m de largo con 0.80 m de distancia entre surcos. Las prácticas culturales que se realizaron incluyeron una escarda a los 30 d de la emergencia y un raleo de 10 cm entre plantas. Se fertilizó con las dosis de 120-80-00 en la siembra y 80-00-00 en el aporque (segundo cultivo). Durante el ciclo del cultivo se aplicaron 6 riegos, 3 deshierbes manuales y 2 aplicaciones de atrazina (2 L ha⁻¹) para el control de malezas.

III.4.1.1 Colecta de plantas sintomáticas

En cada genotipo se colectó limbos de plantas que presentaban síntomas de estrías cloróticas o púrpura (Figura III.1A), proliferación de brotes laterales y ondulamientos en el borde de los limbos (Figura III.1B).

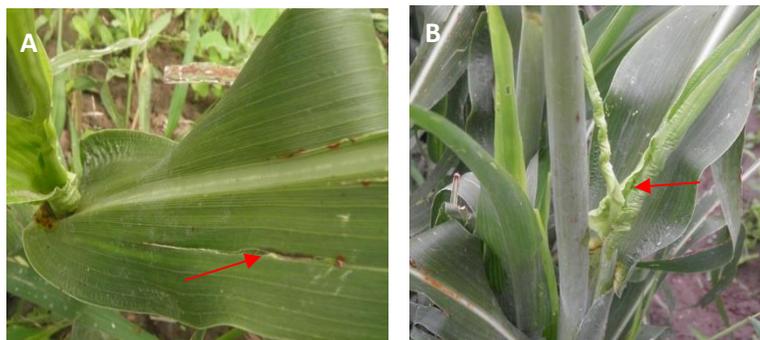


Figura III.1 Síntomas observados en híbridos de sorgo sembrados en la región de Valles Altos Centrales de México. A) Síntomas de estrías cloróticas en limbos, B) Proliferación de brotes laterales y ondulamientos en el borde de los limbos.

III.4.2 Año 2016

Este año se utilizaron cuatro líneas androestériles (A1, A2, A3, A5) de sorgo. Únicamente se colectaron muestras de los limbos de plantas sintomáticas cuando las semillas se encontraban en la etapa de madurez fisiológica.

III.4.3 Identificación filogenética

III.4.3.1 Siembra y aislamiento de bacterias

Se cortaron porciones de tejido foliar (1x1 cm aproximadamente) de la zona correspondiente a estrías cloróticas, al igual que de los limbos con proliferación de brotes laterales y ondulamiento, las que se lavaron; se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% y se enjuagaron al menos tres veces con agua destilada estéril. El tejido desinfectado se colocó en tubos Eppendorf con 1 mL de agua destilada.

Después de 30 min, se maceró el tejido en un mortero, se colocaron 30 μ L de la suspensión en una caja de Petri que contenía medio B de King, con un asa bacteriológica se distribuyó la suspensión siguiendo el método de estría cruzada (Schaad *et al.*, 2001). Después de 5 d se procedió a transferir las diferentes colonias a nuevas cajas de Petri con medio B de King para la obtención de cultivos puros, los que se conservaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían medio de conservación (70% de agua más 30% de glicerol).

III.4.3.2 Extracción de DNA

En un tubo Eppendorf de 2 mL se agregó 250 μ L de agua HPLC, con una punta de 200 μ L se tomó una porción de la colonia bacteriana y se colocó en el interior del tubo, se utilizó el protocolo de CTAB al 2 % (Doyle y Doyle, 1990) con ligeras modificaciones. La pastilla se rehidrató con 50 μ L de agua HPLC libre de DNAsas y se almacenaron a -20 °C.

III.4.3.3 Amplificación por PCR del operón ribosomal

Para identificar las bacterias se amplificó la subunidad pequeña del DNA ribosomal (16S rRNA) con los iniciadores 8Forward (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') que se anclan en la posición 8 a 27 y 1492Reverse (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') complemento de las posiciones de 1510 a 1492. La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 25 μ L conteniendo 13.1 μ L de agua ultrapura esterilizada, 5 μ L de 5X PCR buffer (con 20 mM MgCl₂), 1 μ L of dNTPs (de cada uno 20 μ M), 0.3 μ L de cada iniciador (10 μ M), 5 μ L de DNA genómico (20 ng) y 0.3 μ L (2 U) de GoTaq DNA (Promega, USA). El programa de amplificación consistió en un ciclo inicial de

desnaturalización a 95 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 2 min, 59 °C por 1 min y 72 °C por 1.5 min y un ciclo final de desnaturalización a 72 °C por 5 min.

III.4.3.4 Detención del gen de hipersensibilidad HrcV

Para detectar la presencia del gen de hipersensibilidad conservado HrcV se utilizaron los iniciadores HrcVF (5'-ATGCTAGGAGATCGCGTGCT-3') y HrcVR (5'-TCACACCACCACTCTACCG-3'), la mezcla de reacción consistió en 13.1 µL de agua ultrapura esterilizada, 5 µL de 5X buffer y 18 µL del buffer BigDye ® Terminator v3.1 (1X) (Applied Biosystems, USA). El programa de PCR consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 34 ciclos a 94 °C por 1 min, el alineamiento con 59 °C por 1 min y la extensión a 72 °C por 1.5 min y un ciclo final de desnaturalización a 72 °C por 10 min.

III.4.3.5 Electroforesis en gel de agarosa

Ambos productos de PCR se verificaron mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa Seakem (Lonza, USA) al 1.5 %, preparado con 1x TAE buffer (Tris ácido acético glacial-EDTA). El gel se tiñó con 4 µL gel red (GelRed® Nucleic Acid Stain 10, 000X in Water Biotum, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV (X-PRESS) con el software Infinity (Copyright © 2004-2008 Vilber Lourmat, Version 15.01 para Windows).

Los productos de PCR amplificados se limpiaron mediante una reacción enzimática con ExoSAP-IT™ (Affymetrix, USA), que consistió en mezclar 5 µL del producto de PCR con 2 µL de ExoSAP. Los tubos se colocaron en un termociclador a 37 °C por 15 min para que las enzimas de ExoSAP degraden el remanente de iniciadores y

nucleótidos no utilizados en la reacción de PCR. Finalmente, las enzimas de ExoSAP se inactivaron a 80 °C por 15 min.

III.4.3.6 Secuenciación Sanger

Los productos de PCR correspondiente a la amplificación del 16S rDNA se utilizaron para la preparación de la placa de secuenciación. Para cada una de las reacciones, se colocó 13.1 µL de agua ultrapura esterilizada, 5 µL de 5X buffer, 18 µL del buffer BigDye ® Terminator v3.1 (1X) (Applied Biosystems, USA), los iniciadores de secuenciación 514F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') y 800R (5'-CTACCAGGGTATCTAAT-3') y 2 µL de DNA. Posteriormente se colocó la placa en el termociclador (Biorad, México) el programa consistió en un ciclo inicial de 96 °C por 1 min, seguido de 25 ciclos a 96 °C por 10 s, 96 °C por 50 s, 60 °C por 4 min y un ciclo final de 4 °C. Los productos de secuenciación se precipitaron con etanol/EDTA, y la secuencia se resolvió en un Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, USA).

III.4.3.7 Análisis filogenético

Las secuencias de ambas hebras se ensamblaron y editaron con el software BioEdit Sequence Alignment Editor Copyright© versión 7.2.5 (Hall, 1999) creándose una secuencia consenso para cada uno de los aislamientos, los que se compararon con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLAST Nucleotide (Zhang *et al.*, 2000) y en la base de datos de Ribosomal Database Project (<https://rdp.cme.msu.edu/>).

Las secuencias consenso se compilaron en un formato "fasta", y se alinearon usando el programa Muscle (Edgar, 2004) incluido en el MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016),

las secuencias se cortaron en ambos extremos para realizar el análisis con secuencias de la misma longitud.

La reconstrucción filogenética se realizó mediante estadística Bayesiana usando Mr.Bayes v.3.1.2. (Ronquist *et al.*, 2012), para lo cual se transformó el archivo meg a nexus. El modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue el General time reversible (GTR). El árbol filogenético se visualizó con el programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

III.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.5.1 Bacterias aisladas por genotipo en el año 2015

El número de especies bacterianas difirió según el genotipo de sorgo y el tejido vegetal que se muestreó. El género identificado con mayor frecuencia fue *Pseudomonas* spp. (localizada en 12 de 14 genotipos), *Stenotrophomonas maltophilia* (en 5 de 14), *P. koreensis* (en 4 de 14), *Pantoea* sp. (3 de 14), en *P. azotoformans*, *Raoultella* sp., *Stenotrophomonas* sp., solo se identificaron en 2 de 14 genotipos; mientras que *Bacillus pumilus*, *P. moraviensis*, *Erwinia aphidicola*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Raoultella ornithinolytica*, *Sphingobacterium* sp., *Klebsiella michiganensis*, *Achromobacter spanius* y *P. libanensis* en 1 de 14 (Cuadro III.1).

En cuanto a los órganos vegetales en los que ubicaron las especies bacterianas, *Pseudomonas* sp., estuvo presente en limbos, brotes laterales y limbos ondulados; *P. koreensis* y *Stenotrophomonas* sp., en limbos y limbos ondulados; *Raoultella* sp., en limbos y brotes laterales; *P. azotoformans*, *Bacillus pumilus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *P. moraviensis*, *Erwinia aphidicola*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Raoultella ornithinolytica*, *Sphingobacterium* sp., *Klebsiella michiganensis*, *Achromobacter spanius*,

P. libanensis y *Pantoea* sp., solo en limbos. Las líneas A5, A2 y A9, y las cruzas A5xB9, A2xB9 presentaron el mayor número de especies bacterianas. En las cruzas A9xB5, A5xB1, A2xB1, hubo tres especies; en la línea A1 y en las cruzas A1xB3, A1xB5 y A5xB2, dos; y en los genotipos A9xB2, A2xB5 solo se identificó una especie (Cuadro III.1).

En las cuatro líneas A, al género *Pseudomonas* estuvo presente; esta especie también se localizó en las cruzas directas o en las cruzas recíprocas en donde cada progenitor intervino como hembra (línea A) o como macho (línea B) de las cruzas AxB no isogénicas, lo que confirmaría el carácter isogénico de las líneas A y B, en cuanto a la presencia de esta especie. Sin embargo, ninguna línea A presentó el género *Pantoea* y en cambio, algunas cruzas AxB no isogénicas si los presentaron lo que confirma que el grado de isogenia de las líneas A y B depende del carácter fisiológico, morfológico o patogénico a investigar.

III.5.2 Año 2016

El número de especies bacterianas difirió según el genotipo de sorgo y el tipo de material vegetal. El género más frecuente fue *Pseudomonas* spp. (localizada en las 4 líneas A); seguida de *P. azotoformans* (3 de 4), *Rahnella genomospecies* (3 de 4); mientras que *P. putida*, *Raoultella terrigena*, *Yersinia kristensenii*, *Serratia proteamaculans*, *Rahnella* sp., *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas libanensis*, *Rahnella aquatilis*, *Raoultella terrigena* solo con 1 de 4.

Todas las bacterias provinieron de muestras del limbo de la hoja. En la línea A3 hubo un mayor número de especies. En la línea A1 se identificaron siete especies; en la línea A2, tres especies; y en la línea A5, dos especies (Cuadro III.2).

Cuadro III.1 Bacterias fitopatógenas aisladas en los genotipos de sorgo en el año 2015.

♀ / ♂	Cruzas dialélicas			
	B1	B2	B5	B9
A1	- <i>Pseudomonas moraviensis</i> (L) - <i>Pseudomonas</i> sp. (L)	- <i>Bacillus pumilus</i> (L) - <i>Pantoea</i> sp. (L) - <i>Pseudomonas</i> sp. (L)	- <i>P. koreensis</i> (L) - <i>Pseudomonas</i> sp. (LO)	NSS
A2	- <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (L) - <i>Klebsiella oxytoca</i> (L) - <i>Pseudomonas</i> sp. (L)	- <i>P. azotoformans</i> (L) - <i>Sanguibacter suarezii</i> (L) - <i>Pseudomonas</i> sp. (L) - <i>Raoultella</i> sp. (BL)	- <i>Raoultella</i> sp. (L)	- <i>P. koreensis</i> (L) - <i>Stenotrophomonas</i> sp. (L) - <i>Pseudomonas</i> sp. (L) - <i>Pantoea</i> sp. (L)
A5	- <i>Erwinia aphidicola</i> (L) - <i>P. koreensis</i> (LO) - <i>Pseudomonas</i> sp. (BL)	- <i>S. maltophilia</i> (L) - <i>Pseudomonas</i> sp. (L)	- <i>S. maltophilia</i> (L) - <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (L) - <i>Stenotrophomonas</i> sp. (LO) - <i>Raoultella ornithinolytica</i> (L) - <i>P. koreensis</i> (L) - <i>Pseudomonas</i> sp. (L)	- <i>Pseudomonas</i> sp. (L) - <i>P. baetica</i> (L) - <i>Serratia marcescens</i> (L) - <i>S. maltophilia</i> (L)
A9	NSS	- <i>Pantoea</i> sp. (L)	- <i>P. azotoformans</i> (L) - <i>Sphingobacterium</i> sp. (L) - <i>Pseudomonas</i> sp. (L)	- <i>S. maltophilia</i> (L) - <i>Klebsiella michiganensis</i> (L) - <i>Achromobacter spanius</i> (L) - <i>P. libanensis</i> (L) - <i>Pseudomonas</i> sp. (L)

NSS: No se sembró; L: Limbo; BL: Brotes laterales; LO: Limbos ondulados.

Los resultados indican que solamente el 10% de los aislamientos son fitopatógenos; por ejemplo; la bacteria *P. baetica* es aeróbica, considerada como un desnitrificador y es patógena para *Dicologlossa cuneata* (López *et al.*, 2012). *P. moraviensis* es una bacteria del suelo Gram-negativa, se desconoce aún su patogenicidad (Tvrzova *et al.*, 2006). *P. koreensis* es Gram-negativa, fue aislada en suelos agrícolas de Corea, no interviene en la reducción de nitrato a nitrito (Wo *et al.*,

2003). *P. libanensis* es Gram-negativa, se aisló de manantiales naturales en el Líbano (Dabboussi *et al.*, 1999); se considera no patogénica. *P. putida* puede degradar los hidrocarburos (gasolina) través de reacciones oxidativas (Otenio *et al.*, 2005), se considera una cepa no patogénica de plantas (Nelson *et al.*, 2002).

Cuadro III.2 Bacterias fitopatógenas aisladas en limbos de hojas de líneas A de sorgo en el año 2016.

Línea	Patógeno
A1	- <i>P. putida</i> - <i>P. azotoformans</i> - <i>Pseudomonas</i> sp. - <i>Raoultella terrigena</i> - <i>Rahnella genomospecies</i> - <i>Yersinia kristensenii</i> - <i>S. proteamaculans</i>
A2	- <i>R. genomospecies</i> - <i>Pseudomonas</i> sp. - <i>Rahnella</i> sp.
A3	- <i>P. azotoformans</i> - <i>Serratia liquefaciens</i> - <i>Pseudomonas koreensis</i> - <i>Pseudomonas</i> sp. - <i>Pseudomonas libanensis</i> - <i>R. genomospecies</i> - <i>Rahnella aquatilis</i> - <i>Raoultella terrigena</i>
A5	- <i>P. azotoformans</i> - <i>Pseudomonas</i> sp.

III.5.3 Árbol filogenético

Los árboles filogenéticos se construyeron con el método de Maximum-likelihood, con secuencias correspondientes a la subunidad pequeña del rDNA de bacterias aisladas en 2015 y 2016. Se construyeron dos bases de datos con secuencias que amplificaron un fragmento de 1100 bp aproximadamente. En la primera base se incluyeron secuencias de *Pseudomonas* spp., comparadas con la base de datos del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y las secuencias de referencia se obtuvieron de

la página The List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN; <http://www.bacterio.net>). Se observó la formación de dos clados. El Clado I conformado por cuatro subclados. El Subclado 1 contiene secuencias correspondientes a *P. baetica*, *P. moraviensis*, *P. koreensis* y dos *Pseudomonas* sp.; el Subclado 2 incluyó a *P. libanensis* y *P. azotoformans*; el Subclado 3 agrupó a *Pseudomonas* sp., y *P. putida*; en el Subclado 4 se incorporó a 34 secuencias correspondientes a una especie de *Pseudomonas* aún no descrita. En el Clado II se compilaron dos secuencias de *Pseudomonas* sp., cuya distancia genética indica la presencia de un posible nuevo género.

Con base en la investigación de Anzai *et al.* (2000), quien describió siete grupos de *Pseudomonas in sensu stricto*, los presentes resultados sugieren que existen aislamientos que pertenecen al grupo *Fluorescens* (Subclado 2), grupo *Putida* (Subclado 3) y un grupo no determinado por el autor antes mencionado (Subclado 1). Al analizar el Subclado 4, la cepa de referencia más cercana es *P. fluorescens*, por lo que se plantea la hipótesis de que la nueva especie (Subclado 4) pertenece al grupo *Fluorescens* (Figura III.2).

En cuanto a los genes de hipersensibilidad conservados (HrcV), se detectó la presencia de una banda de 320 bp en las cepas G12P1A15 correspondiente a *P. libanensis* y G15P2A16 a *P. azotoformans* ubicados en el Subclado 2; la primera especie no se ha reportado como patógeno de plantas, y la segunda especie es un patógeno del cultivo de arroz (Fang *et al.*, 2016). También se distinguió la presencia de la banda en las secuencias G11P3A15, G12P2A15, G3P1A15 y G2P1A15 cuyo nombre es

Pseudomonas sp., pertenecientes al Subclado 4, por lo cual se propone la existencia de una especie que contiene aislamientos potencialmente patogénicos (Figura III.2).

En la segunda base de datos se incluyeron aislamiento de las familias *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Sanguibacteraceae*, *Alcaligenaceae*, *Sphingobacteriaceae*, y del género *Stenotrophomonas*; mismas que se compararon en la base de datos del GenBank. Se observaron dos clados. El Clado I conformado por cinco subclados. El Subclado 1 con secuencias correspondientes a *S. maltophilia* y *S. rhizophila*; el Subclado 2 incluyó a *Achromobacter spanius*; el Subclado 3 agrupó a *R. aquatilis*, *R. genomospecies*, *S. liquefaciens*, *Y. kristensenii*, *Rahnella* sp., *E. aphidicola*, *Pantoea* sp., *R. ornithinolytica*, *R. terrigena*, *Raoultella* sp., *S. marcescens*, *K. oxytoca* y *K. michiganensis*; el Subclado 4 incluyó a *Bacillus pumilus*; y el Subclado 5 a *Sanguibacter suarezii*. En el Clado II se compiló una secuencia de *Sphingobacterium* sp. Las bacterias Gram negativas se agruparon en el Clado II, en los Subclados 1, 2 y 3; las Gram Positiva en los Subclados 4 y 5 (Figura III.3).

Con relación a los genes de hipersensibilidad conservados (HrcV), se detectó la presencia de una banda de 320 bp en las cepas de G10P5A15 y G12P5A15 que corresponde a *S. maltophilia* en el Subclado 1; esta bacteria se encuentra ampliamente difundida en el ambiente; no se considera aún como patógeno de plantas, pero es un patógeno intrahospitalario (Chrystal y Fernández, 2006). En el Subclado 3 a G7P7A15 que pertenece a *Pantoea* sp., la que se considera patogénica (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007; Cota *et al.*, 2010), y G12P6A15 relacionada con la bacteria *K. michiganensis* la que se ha reportado como capaz de fijar el nitrógeno atmosférico, para que las plantas lo utilicen (Brisse *et al.*, 2006); hasta el momento no se considera un fitopatógeno. En el

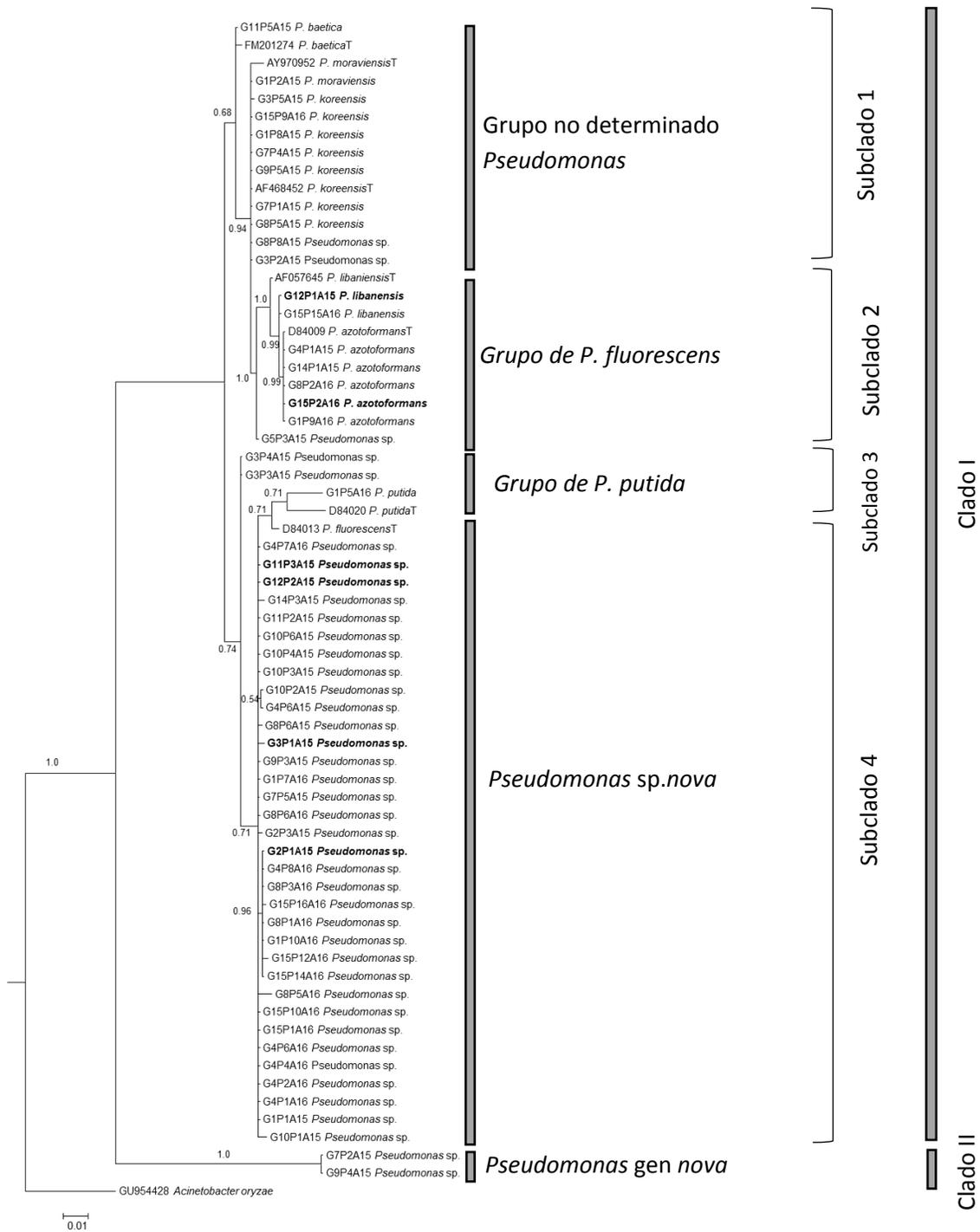


Figura III.2 Árbol filogenético construido con el método de Maximum-likelihood con secuencias correspondientes a la subunidad pequeña del DNA ribosomal 16S rDNA de *Pseudomonas* spp. Los valores de la probabilidad Bayesiana superior a 0.90, se muestran en las ramas. La desviación estándar después de 5 millones de generaciones fue de 0.007568. *Acinetobacter oryzae* se considera fuera de grupo.

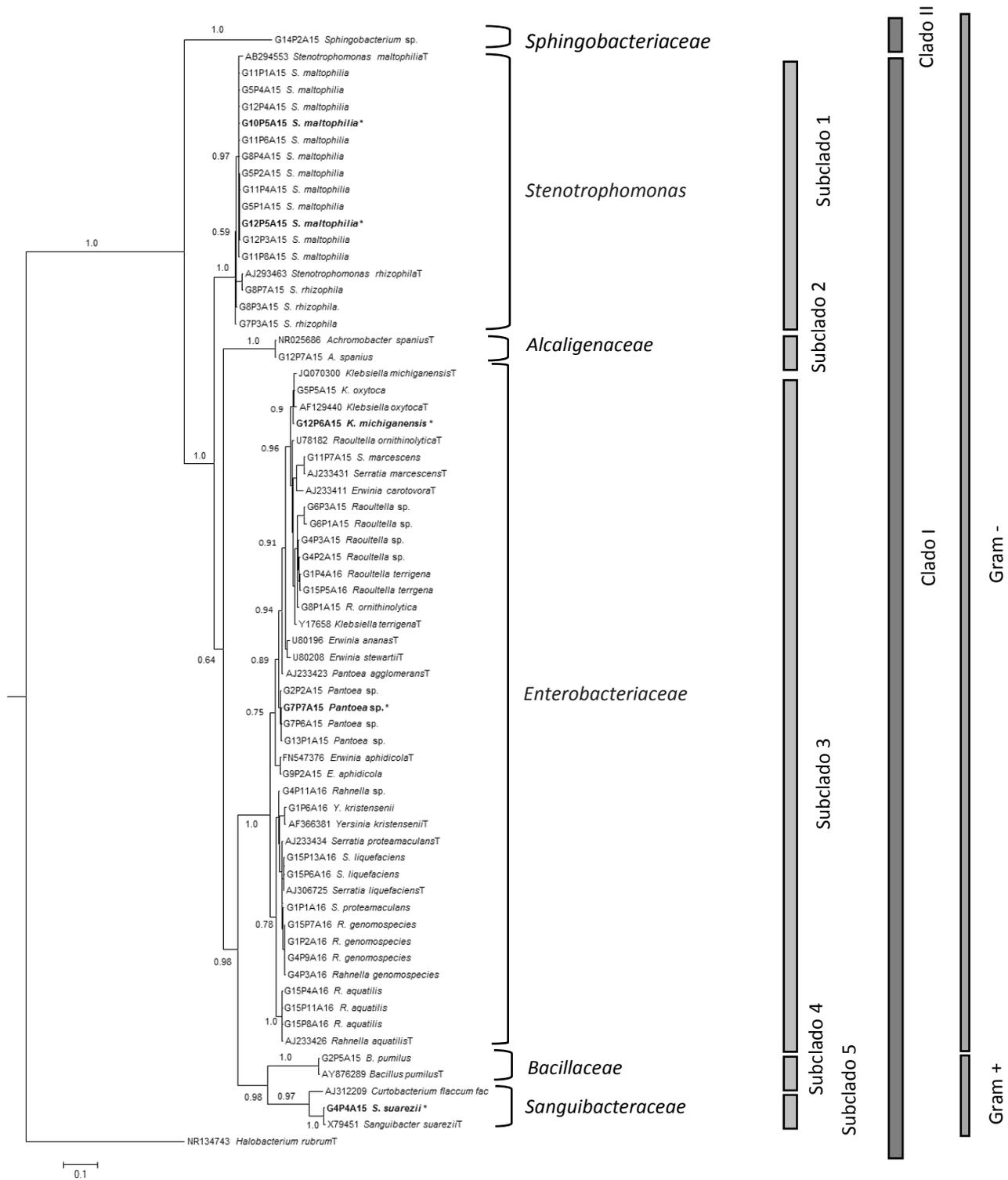


Figura III.3 Árbol filogenético construido con el método de Maximum-likelihood con secuencias correspondientes a la subunidad pequeña del DNA ribosomal 16S rDNA de *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Sanguibacteraceae*, *Alcaligenaceae*, *Stenotrophomonas* y *Sphingobacteriaceae*. Los valores de la probabilidad Bayesiana superior a 0.90, se muestran en las ramas. La desviación estándar después de 5 millones de generaciones fue de 0.006392. *Halobacterium rubrum* se considera fuera de grupo.

Subclado 5 a G4P4A15 cuya bacteria es *S. suarezii*, desconociéndose su patogenicidad en plantas (Figura III.3).

III.6 CONCLUSIONES

El número de especies bacterianas difirió según el genotipo de sorgo y el tejido foliar muestreado. La especie más frecuente fue *Pseudomonas* sp., en limbos, brotes laterales y limbos ondulados. Se identificó un grupo no determinado de *Pseudomonas* y otro grupo cercano a *P. fluorescens*, por lo que se propone que la nueva especie pertenece al grupo *Fluorescens*. Con base en los genes de hipersensibilidad conservados (HrcV) se plantea que las bacterias fitopatógenas son: G12P1A15 (*P. libanensis*); G15P2A16 (*P. azotoformans*); G11P3A15, G12P2A15, G3P1A15 y G2P1A15 (*Pseudomonas* sp.); G10P5A15 y G12P5A15 (*S. maltophilia*); G4P4A15 (*S. suarezii*); G7P7A15 (*Pantoea* sp.); y G12P6A15 (*K. michiganensis*). El mayor número de aislamientos son Gram negativos.

III.7 AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONACyT y al Colegio de Posgraduados por el apoyo otorgado al primer autor durante los estudios de maestría. Además, al personal de campo y del Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del PREGEP-Producción de Semillas, COLPOS para la realización de la presente investigación.

III.8 LITERATURA CONSULTADA

- Alfano J. R. and A. Collmer (2004)** Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology* 42:385-14. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040103.110731>
- Anzai Y., H. Kim, J.-Y. Park, H. Wakabayashi and H. Oyaizu (2000)** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:1563-1589. <http://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1563>
- Brisse S., F. Grimont and P. D. Grimont (2006)** The Genus *Klebsiella*. *Prokaryotes* 6:159. http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30746-x_8
- Cota L. V., R. V. Costa, D. D. Silva, D. F. Parreira, U. G. P. Lana and C. R. Casela (2010)** First report of pathogenicity of *Pantoea ananatis* in sorghum (*Sorghum bicolor*) in Brazil. *Australasian Plant Disease* 5:120-122. <http://dx.doi.org/10.1071/DN10044>
- Chrystal J. L. y A. Fernández V. (2006)** *Stenotrophomonas maltophilia*. *Revista Chilena de Infectología* 23:247-248. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182006000300009>
- Dabboussi F., M. Hamze, M. Elomari, S. Verhille, N. Baida, D. Izard and H. Leclerc (1999)** *Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new species isolated from Lebanese spring waters. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:1091-1101. <http://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1563>
- Fang Y., L. Wu, G. Chen and G. Feng (2016)** Complete genome sequence of *Pseudomonas azotoformans* S4, a potential biocontrol bacterium. *Journal of Biotechnology* 227:25-26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.020>

FAOSTAT (2017) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Consultada en <http://faostat.fao.org>. (Abril 2017).

Galicia-Juárez M., L. E. Mendoza-Onofre, V. A. González-Hernández, M. E. Cisneros-López, I. Benítez-Riquelme and L. Córdova-Téllez (2017) Heterosis and combining ability of seed physiological quality traits of single cross vs. three-way sorghum hybrids. *Acta Scientiarum Agronomy* 39:175-181. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v39i2.31198>

García-Pineda E. y Lozoya-Gloria E. (2004) Genes de resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:414-422. <http://revele.com.veywww.redalyc.org/articulo.oa?id=61222315>

Greenberg J. T. (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 525-545. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.525>

Hall T. A. (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 41:95-98. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

Klement Z. and R. N. Goodman (1967) The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 5: 17-44. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.05.090167.000313>

Kumar S., G. Stecher and K. Tamura (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>

- López J. R., A. L. Diéguez, A. Doce, E. De la Roca, R. De la Herran, J. I. Navas, A. E. Toranzo and J. L. Romalde (2012)** *Pseudomonas baetica* sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:874-882. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.030601-0>
- Lorena-Ramírez A., R. Schwentesius Rindermann, M. A. Gómez-Cruz, y E. Martínez-Borrego (2006)** La organización de productores y los programas de comercialización del sorgo en Guanajuato (México). *Problemas del desarrollo* 37:177-201. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=11820086009>
- Mendoza-Onofre L. E., M. E. Cisneros-López, M. Galicia-Juárez y M. Hernández-Martínez (2017)** Líneas mantenedoras (líneas B) y restauradoras (líneas R) de sorgo granífero adaptadas a los Valles Altos Centrales de México *Revista Fitotecnia Mexicana* 40:107-110.
- Morales-Valenzuela G., H. V. Silva-Rojas, D. Ochoa-Martínez, E. Valadez-Moctezuma, B. Alarcón-Zúñiga, L. X. Zelaya-Molina, L. Córdova-Téllez, L. Mendoza-Onofre, H. Vaquera-Huerta, A. Carballo-Carballo, A. Farfán-Gómez and G. Ávila-Quezada (2007)** First Report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in México. *The American Phytopathological Society* 91:1365-1365. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-10-1365A>
- Nelson K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. P. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J.**

- Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. Eisen, K. N. Timmis, A. Düsterhöft, B. Tümmler and C. M. Fraser (2002)** Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 4:799-808. <http://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>
- Otenio M. H., M. T. Lopes da Silva, M. L. Oliveira Marques, J. C. Roseiro and E. Dino Bidoia (2005)** Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. *Brazilian Journal of Microbiology* 36:258-261. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000300010>
- Ronquist F., M. Teslenko, P. Van Der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard and J. P. Huelsenbeck (2012)** MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61:539-542. <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- SIAP (2017)** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultada en www.siap.gob.mx. (Abril 2017).
- Tvrzova L., P. Schumann, C. Spröer, I. Sedláček, Z. Pácová, O. Sedo, Z. Zdráhal, M. Steffen and E. Lang (2006)** *Pseudomonas moraviensis* sp. nov. and *Pseudomonas vranovensis* sp. nov., soil bacteria isolated on nitroaromatic compounds, and emended description of *Pseudomonas asplenii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:2657-2663. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.63988-0>

Wo Kwon S., J. Shik Kim, I. Cheol Park, S. Hong Yoon, D. Hwan Park, C. Keun Lim and S. Joo Go (2003) *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:21-27. <http://doi.org/10.1099 / ijs.0.02326-0>

Zhang Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Computational Biology* 7:203-214. <http://doi.org/10.1089/10665270050081478>

CONCLUSIONES GENERALES

La línea A1 es la más tardía, con mayor duración de la floración, número de semillas por panoja y panojas más largas. La línea A2 presenta el mayor rendimiento de semilla híbrida por panoja, las plantas de menor porte y el menor diámetro de tallo. La línea A5 es la más precoz, con mayor excursión de la panoja, menor longitud y ancho de panoja, y menor rendimiento de semilla por panoja. La línea A9 es de precocidad similar a la línea A1, pero con menor duración de la floración, mayor porte, mayor diámetro de tallo y menor número de semillas por panoja. La línea R19 es un buen progenitor masculino, ya que su producción de polen fue suficiente para polinizar a las plantas hembra aún en una proporción de surcos hembra-macho de 16:2.

El número de especies fúngicas encontradas en el Estado de México, varió según el genotipo de sorgo y tejido de la planta muestreado. La especie más frecuente fue *Fusarium thapsinum*, el patógeno anterior *F. circinatum* estuvieron presentes en limbos y vainas foliares. Las otras especies fúngicas *F. temperatum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *A. alternata* y *C. trifolii* solamente se aislaron en limbos.

La especie bacteriana más frecuente fue *Pseudomonas* sp., que se identificó en la mayoría de los genotipos. Se identificó un grupo no determinado de *Pseudomonas* y otro grupo cercano a *P. fluorescens*, por lo que se propone que la nueva especie pertenece al grupo *Fluorescens*. De acuerdo con los genes de hipersensibilidad conservados (HrcV) las bacterias fitopatógenas de sorgo son *P. libanensis* (G12P1A15), *P. azotoformans* (G15P2A16), *Pseudomonas* sp. (G11P3A15, G12P2A15, G3P1A15 y G2P1A15), *S. maltophilia* (G10P5A15 y G12P5A15), *S. suarezii* (G4P4A15), *Pantoea* sp. (G7P7A15), y *K. michiganensis* (G12P6A15). Sin embargo, no se ha reportado la

presencia de ninguno de estos patógenos en la región de los Valles Altos Centrales de México.