

METODOS PARA DETECTAR *Sphacelia sorghi* McRae EN  
SEMILLA DE SORGO

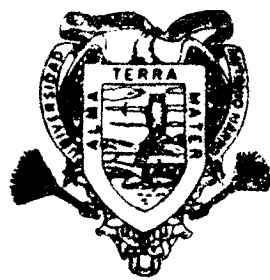
JOSE GUADALUPE CONTRERAS FERNANDEZ

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA



BIBLIOTECA  
EGIDIO G. REBONATO  
BANCO DE TESIS  
U.A.A.A.N.



**Universidad Autónoma Agraria**  
**"Antonio Narro"**

PROGRAMA DE GRADUADOS  
Buonavista, Saltillo, Coah.

DICIEMBRE DE 2001

1350



## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios** por darme salud y sabiduría y dejarme cumplir uno de mis sueños anhelados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología **CONACYT** por brindarme el apoyo económico y poder realizar mis estudios de postgrado.

A mi **Alma Terra Mater** por brindarme los elementos fundamentales en mi formación profesional.

A la **M.C. Ma. Elizabet Galindo Cepeda** por su asesoría y tiempo disponible, así como sus sugerencias en la realización de este trabajo.

Al **M. C. Abiel Sánchez Arizpe** por su valiosa colaboración, asesoría, amistad y disposición que me brindo en todo momento en la realización de este trabajo.

Al **Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo** por su colaboración y sugerencias para hacer de mejor calidad este trabajo.

Al Departamento de Parasitología y a todos sus profesores por brindarme su amistad.

Al Pueblo de México.

## DEDICATORIA

A mi madre **Sra. Teresa Contreras Fernández** con mucho cariño.

A mi Abuelita **Sra. Ernestina Fernández Fuentes** y mi tía **Sra. María Moreno Fernández** por su cariño y apoyo.

A mis tíos **Sr. Manuel Contreras** y su esposa **Sra. Victoria Hernández**.

A todos mis primos y sobrinos por su amistad y apoyo.

A la Srta. **Rosa Teresa Durán Contreras** por que eres una persona muy importante en mi vida, por tu apoyo y confianza gracias amor.

A la **Sra. Ofelia Valenzuela** y a su hija la **Sra. Juanita Mota** por su amistad y apoyo incondicional que tuvieron con migo durante mi estancia.

Al Profesor **Francisco Javier Mota** y su esposa la Sra. **Clementina** por su apoyo y amistad.

A mis grandes amigas **Blasa** y en especial a la Srta. **Jennifer** por su amistad y sus atenciones que tuvieron durante mi estancia no las olvidare,

A mi gran amigo Sr. **Gerardo Mota** Y a su esposa La Sra. **Verónica** por su amistad y apoyo.

A todos mis compañeros y amigos de la Maestría.

## COMPENDIO

**Métodos para Detectar *Sphacelia sorghi* McRae en Semilla de Sorgo.**

**POR**

**JOSÉ GUADALUPE CONTRERAS FERNÁNDEZ**

**MAESTRÍA EN**

**PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. DICIEMBRE 2001.**

**M.C. María Elizabeth Galindo Cepeda -ASESOR-**

Palabras Clave: Ergot, *Claviceps africana*, *Sorghum bicolor*, germinación

Debido a que la prueba de flotación en cloruro de sodio no es contundente para evaluar la presencia de ergot en muestras de semilla, se evaluaron cuatro métodos de sanidad para detectar la presencia de conidias de *Sphacelia sorghi*, en semilla de sorgo, los métodos evaluados son: Papa Dextrosa Agar, Papel Filtro, Lavado (semilla embebida) y Lavado Centrifugado, así como 11 colorantes para una mejor observación de conidias, se utilizaron muestras de

100, 200, 300, 400 y 500 semillas. Se realizaron ensayos de germinación para determinar el efecto del ergot en la calidad de la semilla.

El mejor método para la detección de conidias de *S. sorghi* fue el lavado centrifugado, ya que obtuvo un número de 58.983 conidias/ml. Los métodos Papa Dextrosa Agar y Papel Filtro fueron negativos en la detección de conidias, en la inspección externa realizada a la semilla se observaron esclerocios, una costra blanca y dura que se forma en la cubierta de la semilla. Los mejores colorantes fueron el azul de algodón y la safranina, el tamaño de muestra de 500 semillas es la más adecuada al obtener un número de 61.612 conidias/ml. La calidad de la semilla es afectada tanto en su presentación como en germinación.

**ABSTRACT**

**Methods to Detect *Sphacelia sorghi* McRae in Sorghum Seed**

**BY**

**JOSÉ GUADALUPE CONTRERAS FERNÁNDEZ**

**MASTER OF SCIENCE**

**AGRICULTURAL PARASITHOLOGY**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**BUENAVISTA, SALTILLO COAHUILA. DECEMBER 2001.**

**M.S. María Elizabeth Galindo Cepeda -ADVISOR-**

**KEYWORDS.** Ergot, *Claviceps africana*, *Sorghum bicolor*, germination.

Due to the fact that the flotation test in sodium Chloride is not conclusive to evaluate the presence of ergot in seed samples, four sanitary methods were evaluated to detect the presence of conidias of *Sphacelia sorghi* in sorghum seed. The methods evaluated were: Potato Dextrose agar, Filter paper Washing (soaked seed) and Centrifuge Concentration as well as 11 stains in order to better observe the conidias. Samples of 100, 200, 300, 400 and 50

seeds were used. Germination tests were done to determine the effect of ergot in the quality of the seed.

The best method for the detection of conidias of *S. Sorghi* was the centrifugal washing, since 58,983 conidias/ml. Were obtained. The potato dextrose agar and filter paper were negative in the detection of conidias. Upon externally inspecting the seed, sclerotiums were observed, as well as a white hard scab that was formed on the covering of the seed. The best stains were cotton blue and safran. A sample size of 500 seeds was adequate to obtain 61,612 conidias/ml. The quality of the seed was affected in its physical presentation as well as in germination.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
índice de Cuadros .....	xi
índice de Figuras .....	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Objetivos .....	4
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
Transmisión de Enfermedades por Semilla .....	5
Origen del Ergot .....	7
Organismo Causal .....	7
<i>Sphacelia sorghi</i> .....	8
<i>Claviceps africana</i> .....	8
Distribución Geográfica .....	9
Distribución Nacional .....	10
Sintomatología .....	10
Epidemiología .....	11
Diseminación .....	12
Importancia de la Enfermedad .....	13
Análisis de Sanidad en Semillas .....	14
Pruebas sin Incubación .....	16
Inspección Externa .....	16

Inspección por Lavado Centrifugado .....	17
Examinación del Embrión .....	17
Pruebas con Incubación .....	18
Prueba en Papel Filtro .....	18
Prueba de Blotter por Congelamiento .....	19
Pruebas en Agar .....	19
Prueba de Germinación .....	20
Pruebas Serológicas .....	21
Método Anatómico .....	21
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>23</b>
Obtención de Semilla Contaminada .....	23
Métodos de Sanidad .....	24
Método de Papa Dextrosa Agar (PDA) .....	24
Método de Papel Filtro .....	25
Método de Lavado (Semilla embebida) .....	25
Método de Lavado Centrifugado .....	26
Calidad Fisiológica de la Semilla .....	26
Pruebas de Germinación .....	27
<b>RESULTADOS Y DISCISION</b> .....	<b>28</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>37</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>38</b>
<b>APÉNDICE A</b> .....	<b>41</b>
<b>APÉNDICE B</b> .....	<b>45</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No		Página
4.1	Comparación de medias de cuatro métodos de sanidad de semillas para la detección de conidias de <i>Sphacelia sorghi</i> .....	29
4.2	Comparación de medias en capturas de conidias de <i>S. sorghi</i> en diferentes tamaños de muestras de semilla de sorgo .....	32
4.3	Comparación de medias para la concentración de conidias de <i>S. sorghi</i> en tres muestras de semilla de sorgo .....	33
4.4	Comparación de medias para germinación en cuatro muestras de semillas de sorgo contaminadas por <i>S. sorghi</i> .....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
<b>4.1</b>	Cuerpos de ergot en semilla de sorgo. A) Costra formada en la cubierta de la semilla ocasionada por <i>S. sorghi</i> . B) Esclerocios de ergot que vienen como acompañantes en la semilla. C) Macroconidias de <i>S. sorghi</i> tomadas de la costra formada en la semilla .....	<b>31</b>
<b>4.2</b>	Germinación en diferentes muestras de semilla de sorgo contaminada por <i>Sphacelia sorghi</i> .....	<b>36</b>

## INTRODUCCION

El sorgo *Sorghum bicolor* L. Moench, es considerado en África y Asia como un cultivo de subsistencia básica en la alimentación humana. Mientras que en la mayoría de los países occidentales no es considerado como alimento básico, sino más bien como cereal importante en la alimentación animal.

En México se considera como un cultivo de reciente introducción, ocupando en el presente año 1,027,182 ha sembradas en el ciclo otoño-invierno y 1,160, 830 ha en el ciclo primavera-verano, ocupando el segundo lugar en producción y el tercer lugar en superficie cultivada a nivel nacional, siendo Tamaulipas, Guanajuato, Michoacán, Jalisco y Sinaloa los principales estados que se dedican a la siembra de sorgo (Ramírez, 2001).

La importancia de las semillas en la agricultura es indiscutida, reconociéndosele como elemento básico del progreso agrícola en el mundo; que persigue incrementos en la producción, preservado el patrimonio fitogenético y el medio ambiente.

De los microorganismos transmisibles por semilla se encuentran con mayor frecuencia los hongos, debido a su mayor capacidad de penetración,

reproducción y formación de estructuras de reposo que le permiten mantenerse latentes durante largos periodos, viviendo como parásitos o saprofitos facultativos (Avendaño, 1997).

El ergot del sorgo, causado por el hongo *Claviceps africana* en su estado sexual, y *Sphacelia sorghi* en su estado asexual, es una nueva enfermedad en el hemisferio occidental y potencialmente un reto mayor en la producción de semillas. La enfermedad ya era conocida desde 1915 en la India y África, fue observada en Brasil en 1995, la identificación del patógeno fue realizado por el Dr. Pete Mantle del Colegio Imperial de Londres. Durante 1995 y 1996 se extendió a lo largo de Centro y Sudamérica. En Febrero de 1997, la enfermedad fue detectada por primera vez en Puerto Rico y en la República Dominicana, a su como en San Fernando, Tamaulipas, México (Bandyopadhyay *et al.*, 1991).

La falta de polinización provoca que el ovario se comience a abrir y que sea más vulnerable a la infección. Sin embargo, también puede causar algún daño en la producción de granos comerciales por las condiciones ambientales que limitan al polen. Los ovarios son colonizados por las microconidias de *Sphacelia* que se desarrollan en su interior, causando desarrollo pobre o impidiendo la formación del grano. En casos severos puede ocurrir una pérdida total del cultivo.

Los exudados de la ligamaza (Mielecilla) pueden manchar los granos sanos y favorecer el crecimiento de saprofitos, con lo cual se reduce la calidad del grano. La circulación de semilla sana evita la transmisión e introducción de enfermedades, ya que son las semillas una de las formas más eficaces de dispersión del patógeno, debido a la íntima asociación de ésta y su hospedero.

La movilización de las semillas durante la comercialización, así como los intercambios e introducción de germoplasma en los programas de mejoramiento, son la causa de la introducción y transportación del patógeno; ya que el 90 por ciento de los cultivos alimenticios se propagan por conducto de la semilla.

Los ensayos de sanidad en semillas son utilizados para detectar la incidencia del patógeno en lotes de semillas y aplicar medidas de cuarentena, conocer la condición sanitaria de los lotes como un elemento más de juicio que determine su valor de siembra, y tomar decisiones respecto al tratamiento químico. Sin embargo, en México estos ensayos no se utilizan en forma de rutina y en certificación, solo se recurre a ellos en situaciones que lo ameriten, todo esto debido a que las metodologías requieren demasiado tiempo para propósitos prácticos, requiriéndose técnicas específicas para los diferentes patógenos y por la falta de personal capacitado en patología de semillas. Dentro de las medidas de control y aseguramiento de la calidad de la semilla, su análisis es una herramienta fundamental, en donde la prueba de germinación y

vigor es el principal criterio para evaluar y garantizar la calidad de los lotes de las semillas.

Por lo consecuente, en el presente trabajo se plantearon los siguiente objetivos:

- 1.- Evaluar cuatro métodos de laboratorio para detectar la presencia de *Sphacelia sorghi* en semilla de sorgo y determinar el más eficiente.
- 2.- Determinar el efecto de *Sphacelia sorghi* en la calidad de la semilla.



## REVISION DE LITERATURA

### Transmisión de Enfermedades por Semilla.

Las enfermedades de las plantas son probablemente la limitante de mayor importancia para aumentar la producción global de granos, es necesario por lo tanto, tomar medidas a partir de los programas de mejoramiento genético, induciendo un aumento en la resistencia de materiales a diversas enfermedades; conociendo las enfermedades que afectan a cada cultivo, su severidad y el mecanismo transmisor (Zillinski, 1984).

Neergaard (1979), menciona que los patógenos que pueden ser transmitidos a través de la semilla son hongos, bacterias, virus y nemátodos, McGee (1988) señala además a los micoplasmas y espiroplasmas. De estos patógenos, los de mayor importancia económica son los hongos ya que de las enfermedades transmitidas por semilla el 80 por ciento son causadas por estos microorganismos. Neergaard (1979) agrega a la lista de patógenos transmisibles por semilla a los bacteriófagos y señala además que la asociación semilla-patógeno puede ser por **Acompañamiento**, el cual es cuando el patógeno en una forma independiente acompaña a la semilla hospedante pero no la ataca, como es el caso de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Claviceps purpurea*

en centeno y *Anguina tritici* en trigo; **Transporte externo** cuando el patógeno es acarreado pasivamente sobre la semilla hospedante, tal es el caso de *Rhizotocnia solani* en pimienta y *Puccinia carthami* en cártamo; **Transporte interno** cuando el patógeno se encuentra en estructuras fructíferas embebidas en el tejido de la semilla hospedante, como cubierta, cotiledón y embrión, siendo el ejemplo más típico el *Ustilago nuda* en trigo y cebada. Otras formas de transmisión de un patógeno a las semillas puede darse mediante la relación **planta-semilla** es decir, la transmisión se da directamente de la planta madre a través de las partes florales, pedúnculo del fruto, funículo de la semilla o tegumentos, así la mayoría de los virus y bacterias que afectan el embrión penetran por el sistema vascular.

Campos (1981), compara a la semilla como mecanismo transmisor de patógenos con otros medios como agua, viento, restos de cosecha y suelo; y señala que las ventajas de ésta residen en que las semillas permanecen viables por más largo tiempo que los propágulos vegetativos, además, el inóculo en la semilla incrementa la posibilidad de infección de la plántula, puede inocular suelos libres de parásitos, introducir nuevas razas fisiológicas de patógenos y proporcionar numerosos focos de infección en campo. Si un patógeno es introducido en un área nueva, ésta al verse libre de competidores tiende a aumentar su virulencia llegando a alcanzar altos niveles epifíticos (Navarrete, 1995), por lo que el transporte de patógenos por semilla representa por consecuencia un mecanismo importante en la supervivencia y transferencia en

tiempo y espacio, que aunado a la diseminación efectiva de los patógenos dentro o fuera de la misma representa una barrera difícil de vencer en cuanto a la diseminación de enfermedades (Deakin, 1974).

### **Origen del Ergot**

El ergot del sorgo fue notificado por primera vez en el Estado de Madras en la India en 1915 y en África meridional. McRae lo observó en sorgo y lo describió en 1917. Fue notificado en Alemaya, Etiopía en parcelas experimentales en 1982 pero no fue considerada de importancia. Posteriormente fue reportada en siete regiones de Asia y dieciocho de África. Los sitios donde la enfermedad se hizo presente fue en parcelas de producción de semillas híbridas particularmente, si las líneas se restablecen no producen adecuado polen y los estigmas tienen mala esterilidad (Tegegne *et al.*, 1994).

### **Organismo Causal**

El agente causal de la secreción de mielecilla en el sorgo es el hongo *Sphacelia sorghi*, que es el estado asexual o imperfecto, su estado sexual o perfecto se le denomina *Claviceps africana* (Bandyopadhyay, 1992).

### **Sphacelia sorghi**

La forma imperfecta es más frecuente en la naturaleza y esta asociado a un liquido azucarado liberado de las flores infectadas, donde se describen tres tipos de esporas en *Sphacelia sorghi*, los macroconidios que miden de 9-17 x 5-8  $\mu$ m, las cuales son hialinas, oblongas u ovals con una ligera constricción en medio, con vacuolas distintas en las extremidades. Las microconidias son hialinas, esféricas y miden de 2-3  $\mu$ m de diámetro, así como las conidias secundarias (Frederickson *et al.*, 1991). Los tubos germinativos a partir de las macroconidias sobresalen a la superficie, naciendo como conidioforos y producen los conidios secundarios en sus extremos (Bandyopadyay *et al.*, 1990).

### **Claviceps africana**

La morfología de los esclerocios es variable, dependiendo del genotipo y del ambiente, algunos presentan, una morfología semejante al grano de sorgo, siendo generalmente ovals o esféricos, pero con un mayor volumen con una pequeña capa esclerocial parenquimatoso blanco que miden cerca de 4-6 x 2-3 mm., la médula se encuentra unida por una corteza delgada rojo castaño, aparentemente esta cubierta de un moteado rojo, debido a la fructificación de la

esfacelia adherida; generalmente, las partes de las glumas están adheridas en su base. Cuando son seccionados presentan en la parte interna lóculos conteniendo macroconidias. Al germinar los esclerocios producen dos o tres estromas típicos del genero *Claviceps*. Los peritecios miden 86-135 x 123-226  $\mu$ m formándose en el interior de un estroma capitado, las ascas miden 140 x 3.2-4.2  $\mu$ m., las ascosporas miden 45 x 0.8-1.2  $\mu$ m., son filiformes y hialinas (Frederickson *et al.*, 1991).

### Distribución Geográfica

El ergot del sorgo se reporta en Bostwana, Etiopía, Ghana, Kenia, Mozambique, Nigeria, Ruanda, Senegal, Sudáfrica, Sudan, Tanzania, Uganda, Zambia, Zimbabwe en el continente Africano. En la India, Japón, Myanmar, Las Filipinas, Sri Lanka, Tailandia y República Árabe del Yemen en Asia (Frederickson y Mantle, 1988). A principios de 1995, el ergot se notificó por primera vez en el exterior de Asia y África, reportándose en Brasil a mediados de 1996, posteriormente se registro en Argentina, Bolivia, Paraguay y Uruguay, para finales del mismo año se reporto en Colombia, Venezuela y Honduras; y durante 1997 en Puerto Rico, Haití, República Dominicana, Jamaica y México. A fines de Marzo de 1997, el ergot fue observado por agricultores en el norte de Río Grande cerca de Progreso, Texas, para Octubre del mismo año, la enfermedad se disperso al exterior de Texas y se registró en Georgia, Kansas y

Nebraska en Estados Unidos. En Australia, *C. Africana* apareció por primera vez en Gatton en el meridional de Queensland en Abril de 1996 (Bandyopadyay, 1992).

### **Distribución Nacional**

El ergot fue detectada por primera vez en 1995 para la zona de San Fernando en Tamaulipas, de ahí se fue extendiendo a las diferentes zonas productoras de sorgo del país reportándose en Coahuila, Colima, Chiapas, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa y Sonora (Toledo, 1998).

### **Sintomatología**

Los síntomas visibles del ergot del sorgo son fácilmente reconocidos por aquellos que están relacionados con la producción, al inicio es una masa esfacelial blanca que se forma en las glumas al separarse, al siguiente día se observan exudados incoloros y no viscosos (ligamaza) que se vuelve más opaco a medida que los conidios son liberados de las fructificaciones esfaceliales, posteriormente la superficie de la ligamaza se torna blanquecina, a pesar de que este último es el síntoma principal de la enfermedad (Frederickson *et al.*, 1991). La mielecilla es viscosa, dulce, conteniendo fluido de conidias, el

segundo signo es la presencia del esfacelio fungosos o esclerocio entre las glumas de las flores infectadas (Bandyopadyay, 1998).

El esfacelio es la estructura inicial que se presenta después de la infección, el esclerocio se desarrolla después a partir del esfacelio y generalmente permanece adherido a los restos del mismo (Frederickson *et al.*, 1999).

### **Epidemiología**

La reacción del sorgo al ergot depende del frío y de las condiciones de humedad (McLaren, 1992). Los factores ambientales favorables para la infección y desarrollo de la enfermedad deben coincidir con la antesis (Bandyopadyay, 1992).

Dogget (1988) menciona, que para la infección se requiere de una alta humedad relativa cercana al 100 por ciento durante 12 - 36 hr. Sin embargo, Bandyopadyay (1992) reporta que el óptimo es de 67 - 84 por ciento de humedad relativa durante un periodo de 10 días después de la emergencia de la panícula y el rango de temperatura mínima es de 19 - 21°C. Mughogho (1991), indica que la temperatura óptima es de 20 - 25°C durante la antesis. La dispersión de la enfermedad es rápida cuando existen temperaturas de 19 ± 1°C., y una alta humedad relativa, además, bajo estas condiciones el daño es

más severo (Sundaram, 1978). La germinación de la mayoría de los macroconidios ocurre a 24 - 30°C (Frederickson *et al.*, 1993).

La rapidez de la polinización y fertilización del ovario es de suma importancia en la prevención de una epidemia de ergot y cualquier reducción en la tasa de polinización o en la viabilidad del polen incrementa la susceptibilidad a la enfermedad (McLaren, 1992).

### **Diseminación**

El ergot del sorgo se disemina por los conidios liberados de la ligamaza, por las ascosporas producidas a partir de los esclerocios en los estromas y por los esclerocios (Bandyopadyay, 1998). Las conidias se dispersan por contacto entre flores, por el viento, salpique de lluvia y por insectos atraídos por la ligamaza. Las ascosporas son llevadas por el viento y sirven como inóculo primario, sin embargo parece que no llegan muy lejos, posiblemente por que son descargadas a nivel del suelo y la mayoría de ellas quedan en la vegetación cercana al sitio de descarga (Frederickson *et al.*, 1989). Los esclerocios son mezclados con la semilla y son los responsables de la dispersión de la enfermedad de un área a otra (Bandyopadyay, 1998).



### Importancia de la Enfermedad

El ergot es un serio factor limitante en la producción de semillas híbridas, particularmente en líneas de machos estériles debido a la falta de viabilidad del polen causado por la mala sincronía de la floración al establecer machos estériles, atacan flores individuales en una panícula, causando un pobre desarrollo o impidiendo la formación del grano, en casos severos puede ocurrir una pérdida total del cultivo (Bandyopadyay, 1992).

La enfermedad fue reconocida como una amenaza potencial en la producción de semillas en África en la década de los 60's, desde entonces las pérdidas en la producción de semillas han sido devastadoras debido al daño directo, a la disminución de la calidad por la apariencia que muestra la semilla infectada y a las pérdidas en los campos de mejoramiento en sorgo; la producción de semilla de materiales infectados es escasamente de  $1,000 \text{ kg ha}^{-1}$  contrastando con la producción obtenida de líneas sanas que llegan a ser de 2,000 a  $3,000 \text{ kg ha}^{-1}$  (Frederickson *et al.*, 1993).

En el primer reporte en Bostwana, la incidencia de plantas infectadas fue de 25 a 90 por ciento, el porcentaje más alto se observó en las últimas siembras de sorgo (Molefe, 1975). Los machos estériles llegan a tener infecciones casi del 100 por ciento y se ha observado en algunos casos que la testa de la semilla es destruida completamente (Sundaram, 1978).

Neergaard (1979) menciona que entre los daños causados a las semillas por microorganismos patógenos se encuentran: la muerte del embrión si la infección es severa; pérdida de la germinación, decaimiento de la plántula, raíces y coleóptilos. Los exudados de la ligamaza pueden manchar los granos sanos y favorecer el crecimiento de saprofitos, con lo cual se reduce la calidad del producto final, en condiciones secas la ligamaza se seca formando una costra blanca y dura cuando la ligamaza se seca (Bandyopadyay, 1992) las conidias mantienen su capacidad infectiva durante siete meses permaneciendo sobre panículas caídas en el campo (Mantle, 1968).

La producción de semilla híbrida fue infectada en casi un 60 por ciento en los campos en Brasil debido a la presencia y a la alta severidad del ergot en sorgos masculinos estériles (Melo y Casa, 1996).

### **Análisis de Sanidad en Semillas**

Desde 1886 se comenzó a presentar atención a los hongos asociados con la germinación de semillas cuando Bessey, en Iowa, E.U.A publicó resultados de pruebas de germinación, incluyendo los hongos encontrados. Posteriormente se propuso a la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (ISTA), incluir en los reglamentos los resultados de la sanidad de lotes de semillas para los certificados internacionales. En 1938, Doyer publicó un manual para detectar enfermedades transmitidas por semilla y fue en 1958 que

Anderson contribuyó con una sección sobre enfermedades transmitidas por semillas para el manual de la Asociación de Analistas Oficiales de Semillas (AOSA). Una prueba de sanidad consiste en la verificación de la existencia de organismos patógenos en las semillas, principalmente hongos y el método utilizado será de acuerdo a la naturaleza del agente patógeno y a la especie de semilla; mientras la prueba se realiza se recomienda almacenar la muestra a 10°C hasta que se lleven a cabo los diferentes ensayos, evitando la ganancia de humedad con el uso de bolsas de polietileno (Peretti, 1994).

El análisis sanitario inicia desde la inspección en campo del lote de semillas y durante la producción de semillas en campo, el control de las enfermedades asegura la calidad sanitaria de los lotes de semilla; para ello las inspecciones en lotes de producción deben ser realizadas en forma sistémica y frecuente durante todo el ciclo del cultivo para determinar las enfermedades, así como su severidad y control (Avendaño, 1997).

La sanidad de la semilla puede ser evaluada por diferentes pruebas siendo las más utilizadas:

### **Prueba sin Incubación.**

Este es un tipo de ensayo externo e interno macro o microscópicamente, de las semillas y puede ser mediante:

#### **Inspección Externa.**

Se basa en la limpieza de las semillas y los cambios externos que muestre como consecuencia del desarrollo del patógeno. Las semillas infectadas se observan en seco con la ayuda de una lupa o microscopio binocular estereoscópico. Pueden distinguirse estructuras de hongos como esclerocios, comezuelos, agallas de nematodos, teliosporas de carbones cubiertos, insectos, así como detectar síntomas indicativos de infección como decoloración y manchado de la semilla, malformaciones, ennegrecimiento del embrión, presencia de crecimiento fungoso en la cubierta de la semilla. La evaluación se realiza por conteo de semillas infectadas o simplemente anotando la presencia del hongo detectado. Generalmente cuando la infección es leve o moderada no pueden detectarse cambios, por lo que ésta no es una prueba concluyente de la sanidad de la semilla (Navarrete, 1995).

### **Inspección por Lavado Centrifugado.**

Las semillas son colocadas en un recipiente con agua a la que se le agrega un agente humectante (detergente, alcohol, o tween) y se agita durante cinco minutos si la superficie es lisa y diez minutos si es rugosa. De cada tubo se vacía el lavado en un tubo de centrífuga y se coloca en centrifugación durante 3 min, el sobrenadante es decantado y el precipitado se extrae con una pipeta, se colocan varias gotas de este precipitado a observación sobre un porta objetos y se observa bajo el microscopio compuesto para determinar el número de esporas por campo de la especie presente. Si no se cuenta con centrífuga, después del lavado el exceso de líquido se elimina por filtración o evaporación y el material resultante se observa al microscopio (Neergaard, 1979; Navarrete, 1995).

### **Examinación del Embrión.**

Esta es una técnica de tinte aplicado al micelio del carbón volador en cereales, y consiste en una disección de embriones macerados en hidróxido de sodio y teñidos con lactofenol o anilina azul, observado posteriormente el micelio a través del microscopio estereoscopio. Método que ha mostrado ser altamente confiable para detección de *Ustilago nuda* en trigo y cebada con una buena correlación de la infección de semillas y la incidencia en campo (Neergaard, 1979).

### **Pruebas con Incubación.**

En este tipo de ensayos son utilizados medios artificiales como papel filtro y papel secante o sustratos como agar nutritivo, los cuales proporcionan los requerimientos ambientales y nutritivos para el desarrollo de los patógenos presentes en las semillas.

#### **Prueba en Papel Filtro.**

El principio básico de este método es el de proveer un alto nivel de humedad relativa y óptima luz y temperatura para el desarrollo de hongos. La semilla se desinfecta superficialmente y luego se coloca en cajas Petri o en charolas con tapa que contengan papel filtro o secante húmedo. Las semillas se colocan de modo equidistante, de preferencia con el embrión hacia arriba y siguiendo la misma orientación, posteriormente son incubadas bajo condiciones de temperatura, humedad e iluminación de acuerdo a las condiciones requeridas por el patógeno en estudio. Una vez terminado el periodo de incubación se revisan las muestras y se determina el porcentaje de semillas infectadas y los tipos de hongos presentes auxiliándose con el microscopio. Este método se aplica a todas las clases de semillas, incluyendo cereales y hortalizas (Thomson, 1979; Navarrete, 1995).

### **Prueba de Blotter por Congelamiento.**

Este método permite un desarrollo fungal más abundante. Las semillas son sembradas en papel filtro o blotters, e incubadas durante un día bajo condiciones normales de temperatura para germinación, posteriormente se somete a un periodo de congelamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 hrs, provocando de esta manera la muerte del embrión, el principio de esta prueba radica en que las plántulas muertas son un medio adecuado para un mayor desarrollo de hongos (Navarrete, 1995).

### **Pruebas en Agar.**

El principio de este método es una examinación de las colonias desarrolladas de las semillas en un medio de agar, que puede ser agar extracto de malta, dextrosa y PDA. Actualmente se han obtenido resultados satisfactorios al adicionar restos de vegetales al medio, como fuente nutritiva al hongo, así como la utilización de algunos inhibidores de la germinación como el 2,4-D o antibióticos, para evitar la presencia de bacterias que puedan contaminar el cultivo. La semilla se desinfecta superficialmente y se coloca en el agar de modo equidistante, con el embrión orientado a fin de evitar una semilla con otra. Se incuban las placas de agar y los hongos se identifican en base al tipo de colonia y/o empleando el microscopio para determinar la especie de hongos en base a su morfología (Navarrete, 1995).

## **Prueba de Germinación**

Este método consiste en la observación de sintomatología en plántulas, las semillas son sembradas en invernadero o en campo, es un método obligado para detectar aquellos patógenos que afectan la viabilidad de la semilla, o los que causan enfermedades en tallos y plántulas. Requiere de mayor tiempo, más espacio y materiales que los métodos de incubación; así mismo, el ensayo puede ser realizado en toallas de papel secante enrolladas para determinar la germinación de la semilla. Los sustratos que pueden emplearse son arena, composta, sustratos inertes o suelo. Las semillas se siembran generalmente sin tratar, colocándolas con cierta distancia entre ellas para evitar la dispersión secundaria de organismos y permitir la expresión adecuada de los síntomas. Se les proporciona condiciones adecuadas para el crecimiento de las plántulas; en ocasiones debe permitirse el desarrollo total de las plantas pues algunas enfermedades se expresan al momento de la floración o fructificación (Navarrete, 1995).

Para las pruebas de incubación ya sea en agar o en papel filtro, es necesario antes de la siembra de las semillas desinfectar la superficie de éstas, remojándolas en una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de uno a tres por ciento, para la cual puede utilizarse cloro doméstico, el cual contiene una concentración del seis por ciento; las semillas son sumergidas y



puestas en agitación durante uno o tres min de acuerdo al tipo de semilla, esto a fin de evitar el desarrollo de organismos saprofitos (Avendaño, 1997).

### **Pruebas Serológicas.**

Este método se utiliza principalmente en la detección de virus y consiste en preparar un extracto de la muestra de semilla infectada (antígeno) que es mezclado con un antisuero específico para éste, lo cual permite detectar la presencia del patógeno de acuerdo a la reacción. Así la detección es basada en la reacción del antígeno y el anticuerpo. El anticuerpo captura el antígeno de la muestra, el conjugado que es el anticuerpo adherido a una enzima se adhiere al antígeno capturado lo que es detectado mediante un cambio de coloración. Diferentes metodologías serológicas han sido desarrolladas, tales como el método de **Elisa** entre otros (Avendaño, 1997).

### **Método Anatómico.**

Se obtienen cortes delgados de semillas que se colocan en un portaobjetos, se realizan observaciones en el microscopio compuesto a diferentes aumentos. Si se desea pueden emplearse colorantes como azul de algodón, lactofenol al 1 o 2 por ciento y azul de anilina. Cuando los tejidos son muy oscuros pueden aclararse añadiéndole una solución de KOH o NaOH al uno o dos por ciento, luego se colocan en el portaobjetos y se observa al microscopio.

Otra forma de realizar este método es empleando el micrótopo, lo que permite tener cortes delgados y en serie, pudiendo localizar las zonas infectadas (Navarrete, 1995).

## **MATERIALES Y METODOS**

El trabajo se realizó en el laboratorio de fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola y en el Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila, México.

### **Obtención de Semilla Contaminada.**

Se colectaron panojas de sorgo que presentaron signos evidentes de la enfermedad en lotes comerciales de Michoacán (Muestra 3) y Tamaulipas, México (Muestra 2), del ciclo de producción del año 2000. Cada panoja fue colocada en una bolsa de papel para su traslado a laboratorio, estas muestras fueron puestas a secar a temperatura ambiente dentro de bolsas de papel del número 14, hasta que la mielecilla de las panojas se secase y tomara un color blanco. Posteriormente se desgranaron en forma manual las panojas para obtener la semilla contaminada en forma natural. De las panojas con mielecilla, estas se mezclaron con semilla sana (UAAAN) en un recipiente y se dejó a reposar por 30 días, con la finalidad de obtener semilla contaminada en forma artificial (Muestra 1).

### **Métodos de Sanidad.**

Para estas pruebas y en cada muestra de semilla se utilizaron 100, 200, 300, 400 y 500 semillas contaminadas por cuatro repeticiones respectivamente, con la finalidad de determinar el tamaño de muestra en cada método de sanidad a evaluar, también se evaluaron diferentes colorantes como el azul de algodón, azul de metileno, azul de bromofenol, colorante de gray, fusina fenolada, naranja g, rojo de fenol, rojo congo, safranina, verde brillante y verde de malaquita, para obtener así el mejor colorante y distinguir mejor las conidias de *S. sorghi*, las cuales se midieron con la ayuda de un micrómetro de medición celular. De la semilla contaminada se realizó una inspección externa con la ayuda de un microscopio estereoscopio para la observación de esclerocios (Navarrete, 1995), los cuales se midieron con un vernier.

#### **Método de Papa Dextrosa Agar (PDA).**

Se preparó el medio de PDA y se esterilizó en el autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 20 min, al termino se vació en placas y se deja hasta que el medio solidificara. La semilla se desinfectó en hipoclorito de sodio a una concentración de 1.5 por ciento por 3 min, posteriormente se enjuago en agua destilada estéril y se secaron sobre papel estroza estéril, se colocaron en las placas 10 semillas por caja, se taparon y se sellaron con Kleinpack, se llevaron a incubación a una temperatura de 25°C por 7 días, posteriormente con la ayuda

de un microscopio estereoscopio se observaron las colonias del micelio (Besnier, 1989; Navarrete, 1995).

#### **Método de Papel Filtro.**

Se colocaron dos capas de papel filtro estéril, húmedo con agua destilada estéril dentro de cajas Petri, se pusieron 10 semillas contaminadas por caja, las que se taparon y se sellaron con Kleinpack, se incubaron a temperatura ambiente con períodos alternos de luz y oscuridad por 7 días, posteriormente con la ayuda de un microscopio estereoscopio se observaron las colonias del micelio (Thomson, 1979; Navarrete, 1995).

#### **Método de Lavado (semilla embebida).**

La semilla contaminada se colocó en 40 ml de agua destilada a la que se le agregó 2 gotas de tween 20 como agente dispersante y se agitaron por 20 min en un agitador a 250 rpm para permitir la liberación de conidias, posteriormente a la suspensión se le agregaron cuatro gotas de colorante. Después con la ayuda de una pipeta Pasteur se tomó una muestra y se colocó una gota en el portaobjetos y se observó al microscopio compuesto, se realizó un conteo de conidias observadas con la ayuda de un hematocitometro (Navarrete, 1995).

### **Método de Lavado Centrifugado.**

La semilla contaminada se colocó en 40 ml de agua destilada a la que se le agregó 2 gotas de tween 20 como agente dispersante y se puso en agitación por 15 min en un agitador a 250 rpm, la suspensión se colocó en los tubos de la centrífuga, centrifugándose a 1500 rpm durante 20 min, el líquido sobrenadante se decantó y el precipitado se agitó en 5 ml de agua destilada estéril agregando cuatro gotas de colorante; de la suspensión, se colocó una gota en el portaobjetos con la ayuda de una pipeta Pasteur y se observó al microscopio compuesto, se realizó un conteo de conidias observadas con la ayuda de un nematocitometro (Navarrete, 1995).

### **Calidad Fisiológica de la Semilla.**

Se utilizó semilla contaminada en forma natural (Muestra 2 y 3), artificial (Muestra 1) y semilla sana, se tomaron 2 kg de cada una de ellas y se pasaron por un homogenizador de semillas (Seedburo Quality) por siete veces, la semilla se fue reduciendo hasta obtener una submuestra representativa de 50 g de cada muestra.

### **Pruebas de Germinación.**

De acuerdo con la ISTA (1996), de cada submuestra obtenida se utilizaron 400 semillas divididas en 4 repeticiones de 100 semillas, acomodada sobre papel Anchor húmedo, las cuales se cubrieron con otro papel. Éstas se enrollaron y se pusieron dentro de bolsas de plástico abiertas, se colocaron en posición vertical en la cámara de germinación a 25°C durante 9 días, haciéndose el conteo de germinación al 9º día, evaluándose las plántulas normales que alcanzaron en este período el desarrollo rápido, uniforme y completo de toda su estructura.

Los datos se analizaron en un diseño completamente al azar en arreglo factorial para el caso de los métodos, muestras y tamaño de muestra para la variable incidencia de *S. sorghi* y un diseño completamente al azar para germinación.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En base a los resultados obtenidos, los métodos de lavado (semilla embebida) y lavado centrifugado fueron positivos y eficientes en la detección de conidias de *S. sorghi*, mientras que con los colorantes azul de algodón o safranina se obtuvo una mejor observación de conidias. Durante la evaluación se detectaron otro tipo de hongos saprofitos y/o contaminantes que están asociados con *S. sorghi*. Sánchez (1995) al utilizar la técnica de lavado y filtrado en la detección de *Tilletia indica* en trigo, detecto otros tipos de conidias de hongos como *Alternaria*, *Epiccocum*, *Helmintosporium* y *Fusarium*. Sin embargo, Navarrete (1995) menciona que estos métodos son cuantitativos para determinar la carga de conidias en la superficie de la semilla. En el método de lavado centrifugado se obtuvo significancia en la captura de conodias/ml (58.983) en comparación con el método de lavado (semilla embebida), quien presento (12.117) conidias/ml. Los métodos de Papa Dextrosa Agar y Papel Filtro fueron negativos para la detección de conidias, esto se debe a que estas pruebas no son los adecuados o específicos para su desarrollo y detección de esté patógeno, por lo que únicamente se observo un crecimiento de hongos saprofitos que se encuentran en la cubierta de la semilla (Cuadro 4.1).



**Cuadro 4.1.** Comparación de medias de cuatro métodos de sanidad de semillas para la detección de conidias de *Sphacelia sorghi*.

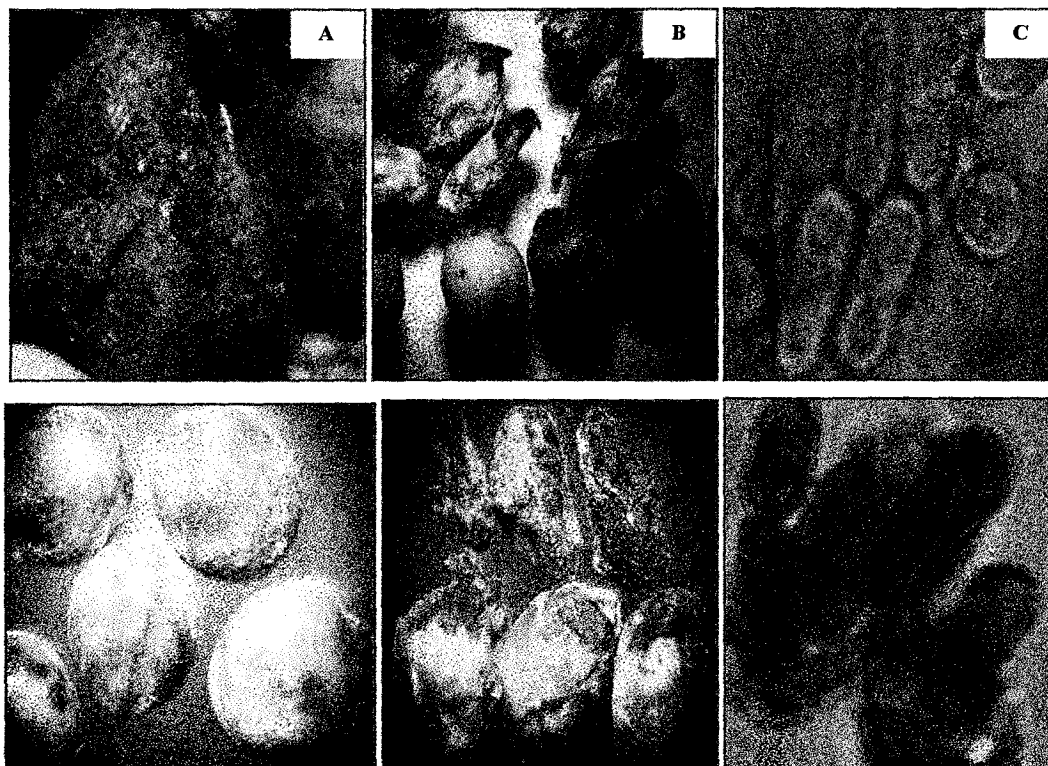
Método	Detección de <i>S. sorghi</i>	Propágalo detectado	Conidias/ml
Papa Dextrosa Agar	Negativo	Ninguno	-
Papel Filtro	Negativo	Ninguno	-
Lavado Centrifugado	Positivo	Conidias	58.983 a
Lavado (semilla embebida)	Positivo	Conidias	12.117 b

P<0.05

Las conidias detectadas fueron macroconidias como las que describe Frederickson *et al.*, (1991), las cuales son hialinas, oblongas u ovales con una ligera constricción en medio, con vacuolas distintas en las extremidades, las cuales midieron 7-12 x 5-8  $\mu$ m. De la inspección realizada a la semilla se observaron esclerocios que están en combinación con la misma, tal como los describen Frederickson *et al.*, (1999) quienes los definen como estructuras latentes y equipadas para no ser dañadas por efecto de las condiciones ambientales adversas, su morfología es variable, semejantes al grano de sorgo, siendo generalmente ovales o esféricos con mayor volumen, parenquimatoso, moteado de rojo por la fructificación de la esfacelia adherida, generalmente las partes de las glumas están adheridas en su base y midieron de 4-5 x 2-3 mm, así como en la cubierta de la semilla, donde se observó una costra formada, la

cual es blanca y dura; en ocasiones puede ser de un color oscuro por la presencia de hongos contaminantes. Bandyopadhyay (1992) menciona que los exudados de la mielecilla pueden manchar los granos sanos y favorecer el crecimiento de saprofitos y reducir la calidad del producto final, tal y como se aprecia en la (Figura 4.1).

Con respecto al tamaño de muestra numero de semillas, que se utilizaron en las pruebas de sanidad, se obtuvo que con un tamaño de 100 semillas no fue el adecuado para obtener el mayor número de conidias en cambio, en el de 500 semillas se presento una mayor concentración de conidias con respecto a los otros tamaños de muestra utilizados, por lo que, Moreno (1988) menciona que una muestra representativa del lote de semilla por estudiar se deberán tomar aproximadamente 100 semillas, pero el numero va a depender del tamaño del grano, sin embargo Navarrete (1995) recomienda emplear muestras por lo menos de 400 semillas tomadas al azar.



**Figura 4.1.** Cuerpos de ergot en semilla de sorgo **A)** Costra formada en la cubierta de la semilla ocasionada por *S. sorghi*. **B)** Esclerocios de ergot que vienen como acompañantes en la semilla. **C)** Macroconidias de *Sphacelia sorghi* tomadas de la costra formada en la semilla.

En la prueba de medias al nivel de  $P < 0.05$  (Cuadro 4.2) se observa que con la muestra de 500 semillas se tiene una captura de 61.612 conidias/ml, por lo que se tiene una diferencia significativa con respecto a las demás tamaños de muestras; esta cantidad de semilla asegura una buena detección y observación de conidias al microscopio compuesto después de haber pasado por las pruebas de sanidad ya mencionadas.

**Cuadro 4.2.** Comparación de medias en capturas de conidias de *S. sorghi* en diferentes tamaños de muestras de semilla de sorgo.

Tamaño de muestra (No de semillas)	Conidias/ml
100	9.354 d
200	26.517 c <sup>z</sup>
300	28.967 c
400	51.300 b
500	61.612 a

<sup>z</sup> Los valores con la misma letra estadísticamente son iguales  $P < 0.05$

De las muestras colectadas en campo, estas mostraron una diferencia significativa entre éstas en la concentración de conidias, en donde la prueba de medias al nivel de  $P < 0.05$  (Cuadro 4.3), muestra que la semilla originaria de Michoacán (muestra 3), presentó una concentración de 51.230 conidias/ml, mientras que la semilla procedente de Tamaulipas (muestra 2), registro una concentración de 15.977 conidias/ml, la cual fue la menor de las muestra evaluadas, la diferencia de concentración de conidias de ambas muestras se debe a que en la muestra 2, el patógeno no tuvo las condiciones favorables para una mayor severidad en campo, ya que los productores de la región realizaron cambios en las fechas de siembra, de tal manera que la etapa de floración no coincidan con dichas condiciones ambientales, al respecto Bandyopadyay (1992) menciona que las condiciones ambientales favorables para la infección y desarrollo de la enfermedad deben coincidir con la antesis.

Con respecto a la muestra de la UAAAN (1), ésta presentó una concentración de 39.443 conidias/ml, la cual fue mayor que la muestra 2, esto obedece a que la inoculación de la semilla sana se realizó mediante una mezcla de mielecilla de panojas infectadas en forma natural en campo y no mediante una aspersion de una suspensión de conidias donde se conoce la concentración que se aplico, así mismo se tiene una menor diferencia en la concentración de conidias en la muestra 3, lo anterior concuerda con McLaren (1993) quien menciona que las mayores concentraciones de conidias en granos de sorgo provienen de campos infectados naturalmente.

**Cuadro 4.3.** Comparación de medias para la concentración de conidias de *S. sorghi* en tres muestras de semilla de sorgo.

Muestra	Conidias/ml
Semilla contaminada en forma artificial (Muestra 1) UAAAN	39.443 b
Semilla contaminada de campo (Muestra 2) Tamaulipas	15.977 c
Semilla contaminada de campo (Muestra 3) Michoacán	51.230 a

P<0.05

En las pruebas de medias en germinación (Cuadro 4.4) se observa que la semilla sana y la semilla contaminada artificialmente Muestra 1 muestran ser estadísticamente iguales, en cambio la muestra 2 y 3 resultaron ser iguales estadísticamente en germinación, mientras que la semilla sana y la (Muestra1) presentan diferencia significativa con las muestras 2 y 3.

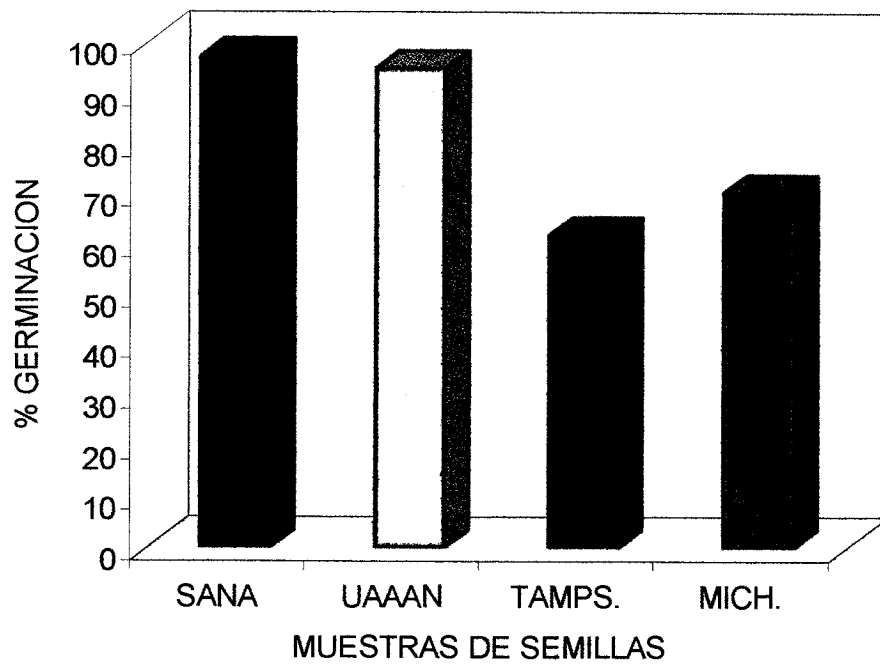
**Cuadro 4.4.** Comparación de medias para germinación en cuatro muestras de semillas de sorgo contaminadas por *S. sorghi*.

<b>Método</b>	<b>Germinación (%)</b>
Semilla sana	97.250 a
Semilla contaminada artificial (Muestra 1) UAAAN	94.750 a
Semilla contaminada en campo (Muestra 2) Tamaulipas	61.750 b
Semilla contaminada en campo (Muestra 3) Michoacán	70.500 b

P<0.05

Los resultados encontrados en germinación (Figura 4.2) nos indican que la semilla sana presentó un 97.25 por ciento, ya que se tuvo la precaución de que esta semilla no estuviera contaminada por ergot, por lo que mostró un buen potencial de germinación y desarrollo de sus estructuras de radícula y plúmula los cuales son indicadores de una plántula normal a diferencia de los resultados obtenidos en la semilla contaminada en forma artificial (Muestra 1) quien presentó un 94.75 por ciento, por lo tanto se tuvo un efecto en la disminución en el porcentaje de germinación en comparación con la semilla sana, en cambio las muestras 2 y 3 que fueron contaminadas naturalmente en campo, esta se comportaron de la siguiente manera, la muestra 2 presentó un 61.75 por ciento de germinación, por lo que fue la de menor porcentaje, esto se debe a que esta muestra se encontraba en malas condiciones ya que la mayor parte del grano estaba quebradizo, la muestra 3 obtuvo un 70.5 por ciento de germinación en comparación con la semilla sana, las muestras 2 y 3 nos indica que hay un

efecto mayor en germinación debido a la presencia de la costra blanca y dura formada por conidias de *S. sorghi* en la cubierta, así como el deterioro que causa a la semilla. Al respecto McLaren (1993) en un experimento en el que evaluó el efecto de los exudados que van sobre la semilla, encontró en un estudio *in vitro* que una baja concentración de exudados redujo la germinación de la semilla y el desarrollo de la plántula bajo condiciones de campo e invernadero, al aplicar una concentración de  $6.47 \times 10^6$  esporas sobre semilla sana, también redujo la germinación y la emergencia de plántulas. Neergaard (1979) por su parte, menciona que los daños a la semilla ocasionados por microorganismos es la muerte del embrión si la infección es severa, pérdida de germinación y decaimiento de plántulas. Uno de los principales efectos de los hongos es la rápida pérdida de la viabilidad de las semillas agrícolas como maíz, trigo, sorgo y frijol.



**Figura 4.2.** Germinación en diferentes muestras de semillas de sorgo contaminada por *Sphacelia sorghi*.



## CONCLUSIONES

- ◆ Para la detección de conidias de *Sphacelia sorghi* en semilla de sorgo, el método de lavado centrifugado es el más eficiente.
  
- ◆ El tamaño de muestra de 500 semillas es la más adecuada para realizar la prueba de sanidad para éste patógeno, utilizando los colorantes azul de algodón o safranina para una buena observación y tinción de conidias.
  
- ◆ La calidad de la semilla es afectada por la presencia de *S. sorghi* en su germinación, como en la apariencia que presenta esta.

## LITERATURA CITADA

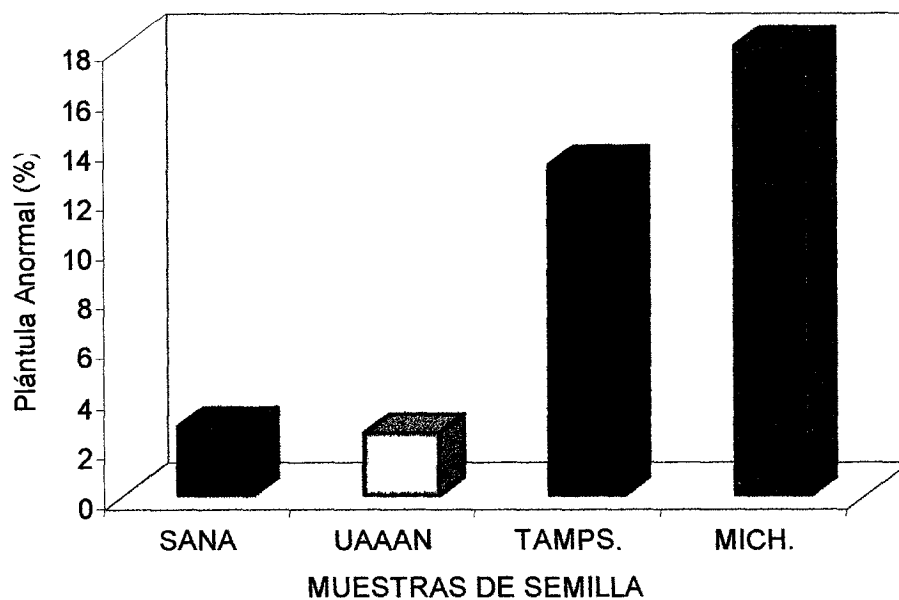
- Avendaño, L. A. N. 1997. Análisis Micológico de Semilla de Maíz y Evaluación de Ensayos para Detección de *Fusarium moniliforme* Sheldon. Tesis Maestría. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 21-29 p.
- Bandyopadhyay, R., L. K. Mughogho, S. K. Manohar and M.V. Satyanarayana. 1990. Stroma development, honeydew formation, and conidial production in *Claviceps sorghi*. *Phytopathology* 80: 812-818.
- Bandyopadhyay, R., L. K. Mughogho and H. C. Sharma. 1991. Source of primary inoculum and spread of ergot. In Cereals Program Annual Report. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, India. 24-25 p.
- Bandyopadhyay, R. 1992. Sorghum Ergot. In Sorghum and Millets Disease: a second World review (De Millano, W.A.J; Fredericsen, R.A; Bengston, G. E; eds) ICRISAT 224-235 p.
- Bandyopadhyay, R. 1998. Ergot. A new disease threat to sorghum in the Americas and Australia. *Plant Disease* 82: 356-367.
- Besnier, R. F. 1989. Semillas biología y tecnología. Ediciones mundi - prensa. Madrid, España. 525 - 546 p.
- Campos, L. C. 1981. Patología de Semillas. IV Congreso Paulista de Fitopatología Instituto Agronómico de Campinas. En summa Phytopathologica. Vol. 7. Rio de Janeiro Brasil.
- Deakin, P. J. 1974. Association of seed color with emergence and seed yield of snap beans. *Journal American Society Horticultural Science*. 99: 110-114 USA.
- Dogget, H. 1988. Sorghum. Second edition. Logmand Scientific and Technical. New York. USA.
- Frederickson, E. D., G. P. Mantle. 1988. The path of infection of sorghum by *Claviceps sorghi*. *Plant Pathology*. 33: 221-234.
- Frederickson, E. D., G. P. Mantle, A. J. De Millano W. 1989. Secondary conidiation of *Sphacelia sorghi* on Sorghum, a novel factor in the epidemiology of disease. *Mycological Research* 93: 497-502.

- Frederickson, E. D., G. P. Mantle, A. J. De Millano W. 1991. *Claviceps africana* sp. nov., the distinctive ergot pathogen of sorghum in Africa. *Mycological Research* 95:1101-1107.
- Frederickson, E. D., G. P. Mantle, A. J. De Millano W. 1993. Windborne spread of ergot disease (*Claviceps africana*) in sorghum A-lines in Zimbabwe. *Plant Pathology* 42: 368-377.
- Frederickson, E. D., G. N. Odvody, N. Montes, T. Isakeit. 1999. El ergot (sorgo) diferenciación de los esfacelios y los esclerocios de *Claviceps africana* en la semilla. Servicio de extensión agrícola de Texas. Sistema Universitario Texas A&M. 1-6 p.
- International Seed Testing Association (ISTA). 1996. International rules for seed testing. Zurich, Switzerland. *Seed Science and Technology*. 29: 1-333
- Mantle, G. P. 1968. Inhibition of lactation in mice following feeding with ergot sclerotina (*Claviceps fusiformis* Loveless) from the bulrush millet (*Pennisetum Staph and Hubbard*) and alkaloid component. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* 170: 423.
- Mc Gee, C. D. 1988. Maize Disease. A reference source for seed technologists. APS PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota. USA 13-16 p.
- Mc Laren, N. W. 1992. Quantifying Resistance of Sorghum Genotypes to the Sugary Disease Pathogen (*Claviceps africana*). *Plant Disease*. 72: 981-988.
- Mc Laren, N. W. 1993. Effect of sugary disease exudates on germination, seedling development and predisposition to seedling diseases in sorghum (*Sorghum bicolor*). *South African Journal of Phytopathology* 10: 12-16.
- Melo, R. E., M. M. Casa B. 1996. Doença Acucarada do Sorgo. Curso Detectando o agente causal do ergot (doença acucarada) em sementes de sorgo. Universidade de Passo Fundo. 1-11 p.
- Moreno, M. E. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. México. 80-81 p.
- Molefe, T. L. 1975. Occurrence of ergot on sorghum in Botswana. *Plant Disease Reporter*. 59: 751-753.

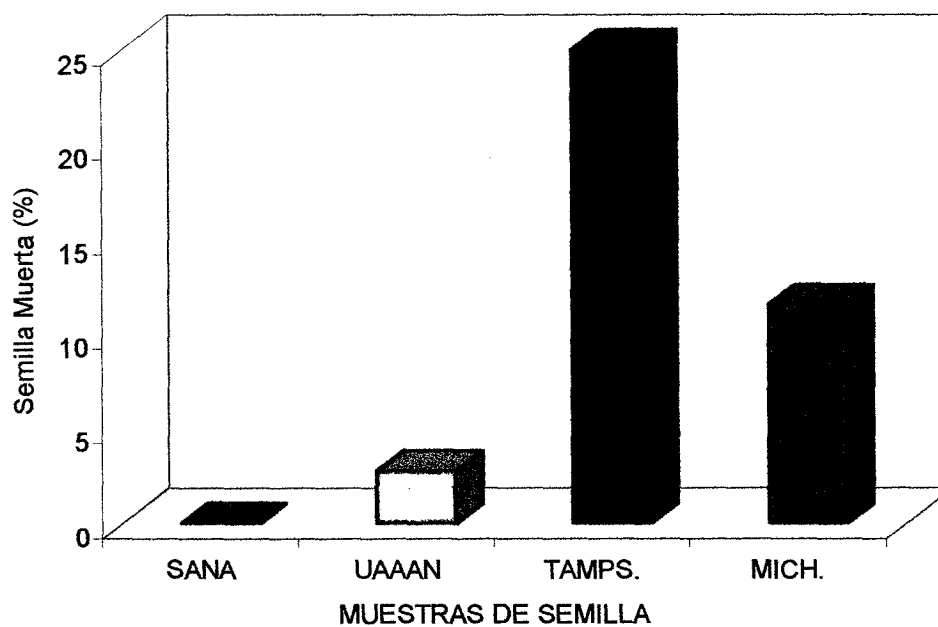
- Mughogho, K. L. 1991. Ergot. En Fredericksen, R. A. de. Compendium of Sorghum diseases. ASP Press. USA.
- Navarrete, M. R. 1995. Patología de semillas. Memorias Curso Internacional "Métodos para Detección de Patógenos en Semillas". Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. p.1-9.
- Neergaard, P. 1979. Seed Pathology. (ed) Mac Millan. Vol. I. Press Ltd. London and Basingstoke.
- Peretti, A. 1994. Manual para Análisis de Semillas. Hemisferio. Buenos Aires, Argentina.
- Ramírez, O. M. 2001. Determinación de la Incidencia y Severidad del ergot de Sorgo (*Sphacelia sorghi*) en el Ejido de la Tepuza, Municipio de Numaran, Michoacán. Tesis Profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 1 p.
- Sánchez, R. C. V. 1995. Sistema de lavado y filtrado para detección de teliosporas de *Tilletia indica* Mitra en trigo. Memorias Curso Internacional "Métodos para Detección de Patógenos en Semillas". Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. P 1-4.
- Sundaram, N. V. 1978. Sorghum Ergot. Proceeding of international Workshop on Sorghum Disease. ICRISAT. Hyderabad, India.
- Tegegne, G., R. Bandyopadhyay, T. Mulato, Y. Kebede. 1994. Screening for Ergot Resistance in Sorghum. Plant Disease. 73: 873-876.
- Thomson, J. R. 1979. Introducción a la tecnología de las semillas. Ediciones Acriba. Zaragoza, España. 265 p.
- Toledo, J. J. A. 1998. Ergot del Sorgo. Monografía. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 7-8 p.
- Zillinsky, F. J. 1984. Enfermedades comunes de los cereales de grano pequeño una guía para su identificación. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) El Batán México.

# APÉNDICE A

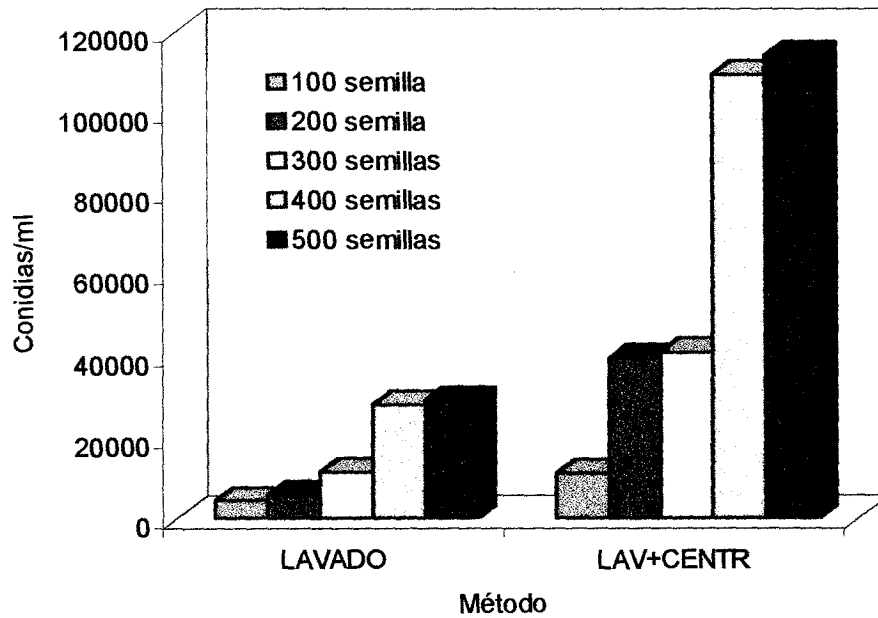
BANCO DE TESIS



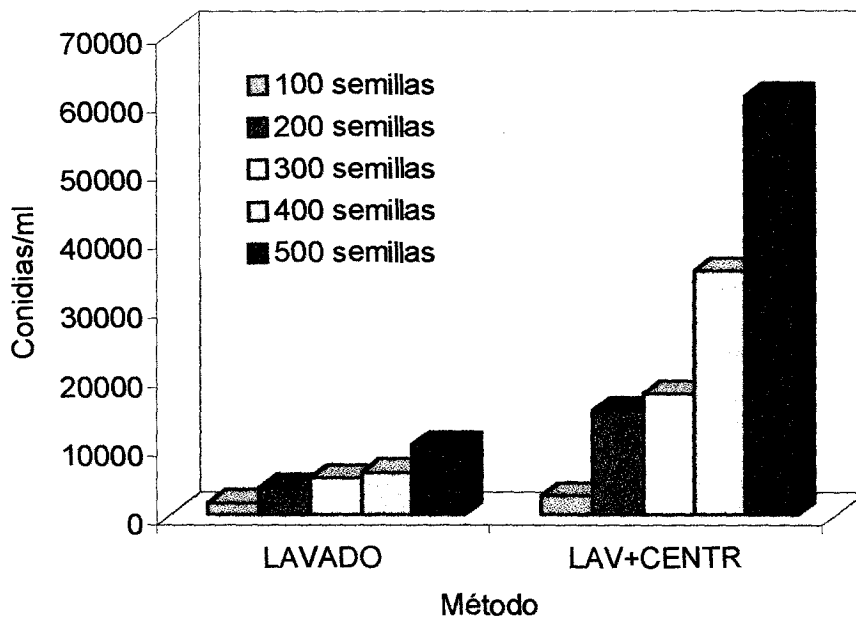
**Figura A. 1.** Plántulas anormales en la prueba de germinación en diferentes muestras de semilla de sorgo contaminada por *S. sorghi*.



**Figura A. 2.** Semilla muerta en la prueba de germinación en diferentes muestras de semilla de sorgo contaminada por *S. sorghi*.



**Figura A. 3.** Concentración de conidias de *S. sorghi* capturadas en semilla de sorgo contaminada artificialmente UAAAN.



**Figura A. 4.** Concentración de conidias de *S. sorghi* capturadas en semilla de sorgo contaminada naturalmente Tamaulipas.

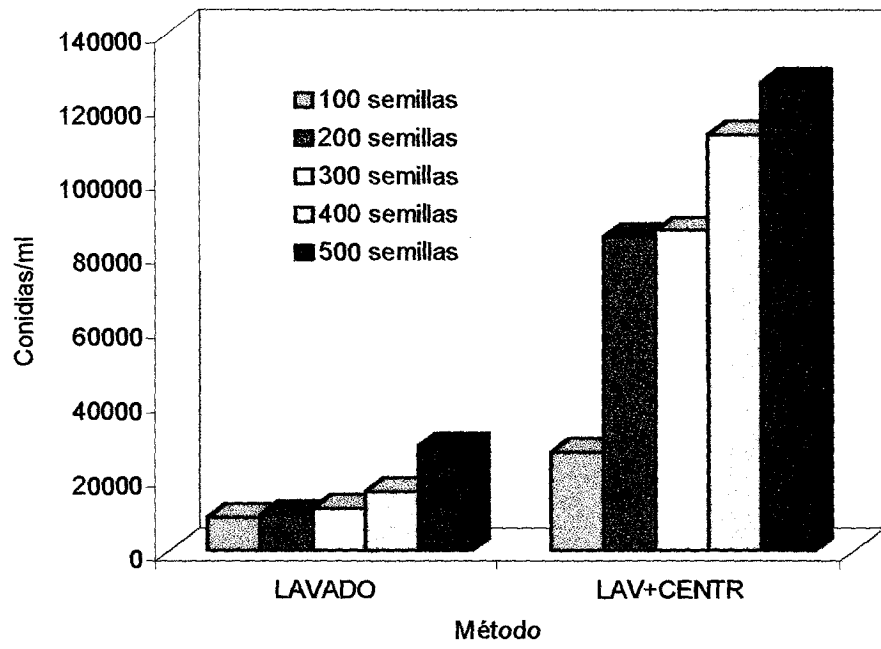


Figura A. 5. Concentración de conidias de *S. sorghi* capturadas en semilla de sorgo contaminada naturalmente Michoacán.



## **APÉNDICE B**

**Cuadro B. 1.** Análisis varianza de los factores método, muestra y No de semillas en la detección de conidias de *S. sorghi*.

FV	GL	SC	CM	FC	Ft
Factor A	1	65893.596	65893.596	1092.9233**	0.0000
Factor B	2	25764.651	12882.326	213.6686**	0.0000
AB	2	13400.314	6700.157	111.1300**	0.0000
Factor C	4	41722.465	10430.616	173.0041**	0.0000
AC	4	18223.995	4555.999	75.5666**	0.0000
BC	8	6331.793	791.474	13.1275**	0.0000
ABC	8	2740.050	342.506	5.6809**	0.0000
Error	90	5426.203	60.291		
Total	119	179503.067			

C. V = 21.80 %

**Cuadro B. 2.** Análisis de varianza de la variable prueba de germinación en semilla de sorgo contaminada por *S. sorghi*.

FV	GL	SC	CM	FC	Ft
Muestra	3	3735.6875	1245.2291	48.95	0.0001
Error Exp.	12	305.2500	25.4375		
Total	15	4040.9375			

C. V = 6.221817 %