

Diversidad Genética de Aislamientos de Cornezuelo (*Claviceps africana* Frederickson, Mantle y de Milliano) de Sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench.] en México

Víctor Pecina-Quintero, Noé Montes-García, Héctor Williams-Alanís, INIFAP, Campo Experimental Río Bravo, Apdo. Postal 172, Río Bravo, Tamaulipas, México CP 88900; **Sanjuana Hernández-Delgado, Netzahualcóyotl Mayek-Pérez**, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Blvd. del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas, México CP 77810; y **Louis K. Prom**, USDA-ARS, 2765 F&B Road, College Station, Texas, USA 77845. Correspondencia: pecina.victor@inifap.gob.mx

(Recibido: Septiembre 27, 2006 Aceptado: Diciembre 13, 2006)

Pecina-Quintero, V., Montes-García, N., Williams-Alanís, H., Hernández-Delgado, S., Mayek-Pérez, N. y Prom, L.K. 2007. Diversidad genética de cornezuelo (*Claviceps africana* Frederickson, Mantle y de Milliano) de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench.] en México. Revista Mexicana de Fitopatología 25:43-47.

Resumen. El estudio se desarrolló en Río Bravo Tamaulipas y Celaya Guanajuato, México, donde se evaluó la patogenicidad de dos aislamientos del cornezuelo (*Claviceps africana*) obtenidos en las mismas localidades, en seis híbridos y tres líneas androestériles de sorgo. Además, se realizó un análisis genético de doce aislamientos del hongo utilizando marcadores AFLPs. El análisis de varianza indicó diferencias significativas entre aislamientos para patogenicidad (evaluada por los porcentajes de infección floral en los genotipos de sorgo), diferencias entre genotipos, localidades, fechas de siembra y años de evaluación. El análisis genético mostró gran variación genética intrapoblacional (diversidad genética 60%) y la ocurrencia de diferentes genotipos de cornezuelo, aunque es evidente su carácter clonal por los altos porcentajes de similitud genética (>94%). En general pueden distinguirse tres grupos de genotipos afectando al sorgo en México, uno en el Bajío (Guanajuato y Jalisco), otro en Tamaulipas y un tercero en Sinaloa.

Palabras clave adicionales: Polimorfismos, marcadores AFLP, sorgo, *Sorghum bicolor*.

Abstract. This study was conducted in Río Bravo, Tamaulipas, and Celaya, Guanajuato, Mexico, in which pathogenicity of two isolates of ergot (*Claviceps africana*) obtained from the same two locations, were evaluated on six hybrids and three male sterile sorghum lines. Also, a genetic analysis was performed in twelve isolates of the fungus using AFLPs markers. The analysis of variance indicated significant differences between isolates for pathogenicity (evaluated as

the floral infection percentage in sorghum genotypes), differences between genotypes, locations, planting dates, and years. The genetic analysis showed a great genetic intrapopulation variation (60% genetic diversity) and the occurrence of different ergot genotypes; nevertheless, there was a high genetic similarity (>94%) by the clonal character. In general, three groups of ergot genotypes are affecting sorghum in Mexico, one in the Bajío area (Guanajuato and Jalisco), another in Tamaulipas, and the third one in Sinaloa.

Additional keywords: Polymorphisms, AFLP markers, sorghum, *Sorghum bicolor*.

El cornezuelo del sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench.] causado por el hongo *Claviceps africana* (Frederickson, Mantle y de Milliano) se reportó por primera vez en México en 1997 (Aguirre *et al.*, 1997). Este patógeno inicialmente estuvo restringido a Asia y África, de donde se expandió a otras regiones del mundo (Bandyopadhyay *et al.*, 1998). El hongo infecta los ovarios no fertilizados, impidiendo la formación de semilla. En general, las líneas androestériles utilizadas en la producción de semilla son susceptibles al cornezuelo, por lo que la producción de éstas se ve afectada con pérdidas de hasta 100% (Workneh y Rush, 2003). Aunque los híbridos comerciales de sorgo no son afectados en forma importante, dicha enfermedad puede causar problemas si hay poca disponibilidad de polen o si éste presenta baja viabilidad, aspectos que están asociados al estrés por temperaturas menores a 13°C antes del inicio de la floración, cuando ocurre la microesporogénesis (Brooking, 1976). La diseminación del hongo es favorecida por dichas condiciones climáticas particularmente en el sur de Texas y noreste y centro de México, lo que ha permitido que el patógeno se establezca y sobreviva durante extensos períodos de tiempo (Prom *et al.*, 2005). Otro aspecto que favorece la diseminación del patógeno es la presencia de hospederos alternos como el

zacate Johnson [*Sorghum halepense* subs. *halepense* (L.) Pers.] (Reed *et al.*, 2002). Lo anterior puede provocar serios problemas por la velocidad de propagación del patógeno (Odvody *et al.*, 1999) y por la alta probabilidad de que ocurran nuevas variantes patogénicas. En la actualidad existen pocos estudios acerca del género *Claviceps* y en menor proporción de la estructura genética y poblacional de *Claviceps africana*. Pazoutova *et al.* (2000) no observaron variación genética entre cinco aislamientos originarios de Australia, lo que corroboró la hipótesis de que el cornezuelo en ese país tuvo un origen único. Por otra parte, los aislamientos de cornezuelo provenientes de América presentaron patrones electroforéticos idénticos de RAPDs (DNA polimórfico amplificado al azar) y rDNA (DNA ribosomal) al igual que tres aislamientos de Sudáfrica, lo que sugiere que el cornezuelo que afecta al sorgo en América tuvo su origen en África. Estos aislamientos pueden distinguirse claramente con base en el genotipo, de los aislamientos de Australia y la India. En contraposición, otro estudio indicó que existe alta similitud genética entre aislamientos de Australia, Japón, EUA, México y África, además de detectar variación intra-específica y la posible existencia de múltiples genotipos de este patógeno (Tooley y O'Neil, 2002). Se han observado también diferencias significativas en el tamaño y la forma de los esclerocios producidos por aislamientos del hongo originarios de Celaya, Guanajuato, Río Bravo, Tamaulipas, México, y Weslaco, Texas, EUA (Odvody *et al.*, 2002). El presente estudio se llevó a cabo con los objetivos de determinar si existen diferencias significativas de patogenicidad en sorgo entre aislamientos de cornezuelo originarios de Celaya y Río Bravo, México; además de caracterizar la diversidad genética presente en diferentes poblaciones del patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localidad de evaluación y genotipos. Se establecieron experimentos en diez fechas de siembra en Río Bravo, Tamaulipas, y cinco en Celaya, Guanajuato, en el 2002 y 2003 bajo condiciones de riego. Los híbridos de sorgo evaluados fueron: AP2233; GARST5664 (Syngenta); KS310 (Sorghum Partners); NC+7W97, NC+8R18 (NC+seeds); ATx635 x Tx430; y las líneas androestériles ATx635, ATx2752 y ATx623 (Texas A&M University). Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Las parcelas constaron de un surco de 5 m de largo y 0.81 m de separación. De cada parcela se seleccionaron cinco plantas con panículas de madurez similar al inicio de la floración.

Inoculación de cornezuelo. Para inocular las panículas se utilizó un aislamiento de cornezuelo colectado en la misma región de evaluación, mismo que fue incrementado en invernadero. La inoculación se realizó entre las 8:00 y 10:00 horas del día. Cada panícula marcada se inoculó con un atomizador manual utilizando una concentración de 1.6×10^6 conidios mL⁻¹, cada dos días desde el inicio hasta completar la floración. En la etapa de grano lechoso se evaluó la severidad de la enfermedad causada por el aislamiento

respectivo, basado en el porcentaje de flores infectadas.

Aislamientos de cornezuelo y extracción de DNA. Se realizaron colectas de cornezuelo de plantas de sorgo colectadas en los estados de Guanajuato, Jalisco, Tamaulipas y Sinaloa en México, así como en el estado de Texas, EUA durante el 2001. También se realizaron colectas durante el 2002 y 2003 en Guanajuato, Tamaulipas y Texas; y otro en Tamaulipas en el 2004. Se obtuvieron un total de 12 aislamientos, mismos que se inocularon en líneas susceptibles de sorgo androestériles en condiciones de invernadero. A partir del desarrollo del hongo en las panículas infectadas se colectó esfacelio el cual se almacenó a -80°C hasta su utilización para la extracción de DNA. El esfacelio se maceró y transfirió a tubos de 1.5 mL con 500 µL de la solución de extracción (Tris-HCl 200 mM, pH 8.5; NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS 0.5%), la mezcla fue extraída dos veces con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). El DNA fue precipitado, lavado y resuspendido en 50 µL de TE al 0.1X (Tris-HCl 1mM, pH 8.0 y EDTA 0.1 mM).

Análisis de AFLP. El protocolo empleado de AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) consistió en la digestión total de DNA genómico de cada aislamiento y la ligación de adaptadores específicos (Vos *et al.*, 1995). Posteriormente, se realizaron dos amplificaciones selectivas por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando dos nucleótidos selectivos en la última amplificación. Finalmente, los productos fueron separados por electroforesis en gel de acrilamida al 6% y se revelaron mediante tinción con nitrato de plata (Promega®).

Análisis de datos. Los porcentajes de infección causados por cada aislamiento de cornezuelo fueron transformados mediante la expresión raíz cuadrada del arcoseno para normalizar la distribución de los datos (Steel y Torrie, 1998). Se realizó un análisis de varianza individual por localidad con dicha información considerando a los genotipos y las localidades como un efecto fijo y los años de evaluación y las fechas de siembra como efectos aleatorios. La comparación de medias entre tratamientos se realizó utilizando la prueba de Tukey ($p < 0.01$). El polimorfismo detectado en los aislamientos de cornezuelo analizados con cada combinación de iniciadores AFLP, se determinó con base en la presencia o ausencia de cada banda, donde se asignó 1 a la presencia y 0 a la ausencia. Se asumió que las bandas de un mismo peso molecular en diferentes individuos son idénticas. Se elaboró una matriz de ceros y unos que se utilizó para determinar la distancia genética entre cada par de aislamientos con base en el coeficiente de apareamiento simple (Sokal y Sneath, 1963), utilizando el paquete estadístico Statistical versión 5.0 (StatSoft, 1997), y se realizó un análisis de varianza molecular. Además, se utilizó la matriz de distancias para construir un dendrograma mediante el método de ligamiento promedio (UPGMA; Avise, 1994). El índice de diversidad genética entre aislamientos fue calculado con la expresión:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^s P_i^2$$

Donde Pi = frecuencia de una banda dada en una población, S = número total de bandas (Powell *et al.*, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza combinado de los datos de patogenicidad de los aislamientos de cornezuelo indicó diferencias significativas (p < 0.01) entre localidades, años de evaluación, fecha de siembra, genotipos y en sus respectivas interacciones. En general, los mayores porcentajes de infección por cornezuelo ocurrieron en Celaya, (Cuadro 1). Lo anterior se debió probablemente a que en esta localidad la temperatura mínima durante el período previo a floración fue menor a 13°C (Gupta *et al.*, 1983). Además, durante el 2002 las temperaturas mínimas fueron más bajas que en 2003 (alrededor de 4°C), lo que provocó que la incidencia de cornezuelo fuese mayor en ambas localidades de prueba en 2002. La fecha de siembra también afectó la incidencia de cornezuelo, ya que los híbridos presentaron mayor incidencia en siembras a finales de mayo en comparación con las siembras de fines de marzo en Celaya. En Río Bravo, las siembras de sorgo en agosto y septiembre fueron las más afectadas por la enfermedad. Aunque todos los híbridos y líneas experimentales fueron susceptibles al cornezuelo, el genotipo NC+8R18 presentó menor incidencia (5.1%) debido a que su polinización fue más rápida y efectiva (95% de grano) en comparación con el resto del germoplasma evaluado, permitiéndole escapar a la infección, lo que concuerda con lo señalado por Bandyopadhyay *et al.* (1996).

Cuadro 1. Pcentaje de flores infectadas con cornezuelo (*Claviceps africana*) a través de años, localidades y genotipos de sorgo (*Sorghum bicolor*).

Factor	Híbridos	Líneas estériles
Año de evaluación		
2002	12.81 a ^z	34.58 a
2003	4.89 b	22.29 b
Localidad		
Celaya	12.47 a	28.11 a
Río Bravo	7.19 b	26.35 b
Genotipo		
AP2233	13.42 a	
GARST 5664	9.89 b	
ATx399 x RTx430	9.48 bc	
NC+7W97	8.69 cd	
KS310	7.30 d	
NC+8R18	5.10 e	
ATx635		33.01 a
ATx623		31.15 b
ATx2752		22.29 c

^zTratamiento con letras iguales en cada categoría en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, p < 0.01).

Cuadro 2. Análisis genético con marcadores AFLPs de aislamientos de cornezuelo (*Claviceps africana*) de México y EUA.

Combinación de iniciadores	Productos amplificados		Polimorfismo	
	Monomórficos	Polimórficos	Total	(%)
AA / AA	6	82	88	93
AA / AC	10	82	92	89
AA / AG	20	75	95	79
AA / AT	17	74	91	81
Total /Media	53	313	366	85

A pesar de que a la fecha no se ha detectado resistencia al cornezuelo en germoplasma de sorgo, de acuerdo con nuestros resultados, el genotipo NC+8R18 aparentemente tiene estabilidad en su comportamiento, ya que presentó bajos porcentajes de infección, mientras que es común observar genotipos que exhiben baja incidencia de cornezuelo en una localidad y susceptibilidad en otra (Bandyopadhyay *et al.*, 1996). Por otra parte, las cuatro combinaciones de iniciadores AFLP amplificaron 366 productos o bandas (91 productos en promedio por combinación de iniciadores), de los cuales 313 (85 %) fueron polimórficos (Cuadro 2). Además, se detectó alta diversidad genética (D = 60%) lo que permitió diferenciar los doce aislamientos de cornezuelo, y también corroborar la existencia de diferencias entre aislamientos de Guanajuato, Tamaulipas y Texas (Odvody *et al.*, 2002). Lo anterior sugiere la presencia de múltiples genotipos de cornezuelo, lo que concuerda con lo reportado por Tooley y O'Neil (2002). Así mismo, el análisis de varianza molecular (AMOVA, Cuadro 3) y el de conglomerados (Fig. 1) indicaron la existencia de relaciones genéticas estrechas entre aislamientos. Lo anterior corrobora la hipótesis de que los aislamientos de cornezuelo en América descienden de un mismo clon por su lineaje genético (Pazoutova *et al.*, 2000). El AMOVA confirmó la existencia de amplia diversidad dentro de las poblaciones (intrapoblacional) tal y como ha sido reportado por Tooley y O'Neil (2002); mientras que el análisis de conglomerados formó dos grupos principales de aislamientos. El grupo A fue el más homogéneo con una similitud entre aislamientos del 96% y estuvo formado por aislamientos de Guanajuato de 2001, 2002 y 2003, los aislamientos de 2001 fueron genéticamente similares a los de Jalisco y EUA colectados el mismo año. El grupo B fue más heterogéneo aunque su similitud fue de 94% y estuvo formado por los aislamientos

Cuadro 3. Análisis de varianza molecular de aislamientos de cornezuelo (*Claviceps africana*) analizados con AFLPs.

	FV ^z	gl	SS	CV	PV	P
Interpoblacional	2	23.2	7.22	13.6	NS	
Intrapoblacional	7	235.4	45.93	86.4	<0.001	
Total	9	258.6	53.15			

^zFV = fuente de variación; gl = grados de libertad; SS = suma de cuadrados; CV = componentes de varianza; P = porcentaje de variación.

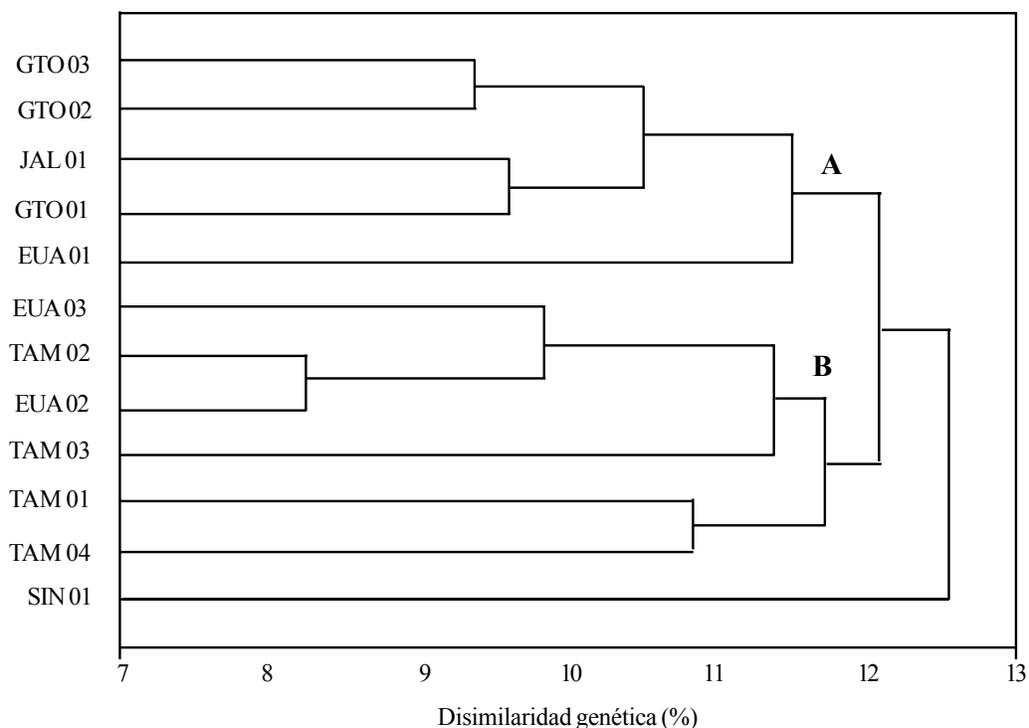


Fig. 1. Dendrograma de las relaciones genéticas entre aislamientos de cornezuelo (*Claviceps africana*) de México y EUA con base en el método UPGMA.

de Tamaulipas (2001 a 2004) y de EUA colectados en 2002 y 2003, mientras que el aislamiento de Sinaloa (2001) fue el más divergente al resto de los aislamientos de cornezuelo. En general, la existencia de diferencias genéticas inter e intrapoblacional entre aislamientos de cornezuelo, así como en cuanto a patogenicidad y en la formación de estructuras reproductivas (Odvody *et al.*, 2002), confirma que existen diferentes genotipos de cornezuelo en México y en otras partes del mundo (Tooley y O'Neil, 2002). Además, probablemente el homotalismo sea el principal mecanismo de reproducción de *C. africana* dado su carácter clonal como se ha observado en *C. purpurea* (Fr.:Fr.) Tul. (Esser y Tudzynski, 1978). Lo anterior también ha sido confirmado mediante análisis RAPDs, donde más de 100 iniciadores presentaron patrones uniformes de DNA entre aislamientos de diferentes orígenes geográficos, lo que demuestra que *C. africana* es una especie bastante homogénea (Pazoutova *et al.*, 2000). Aunque se ha observado la formación de esclerocios (reproducción sexual) en poblaciones de cornezuelo en Guanajuato y Tamaulipas, es poco probable que este sea el mecanismo de recombinación genética común del cornezuelo, y con ello la generación de mayor variabilidad genética, ya que no se ha logrado la germinación de esclerocios *in vitro* y no existen reportes de que dicha reproducción haya sucedido en la naturaleza (Pazoutova *et al.*, 2000). Por lo tanto, es posible que existan tres grupos de genotipos de cornezuelo en México, uno afectando al sorgo

en Guanajuato y Jalisco, otro en el norte de México afectando a Tamaulipas y Sur de Texas, y un tercer genotipo en Sinaloa. La aparición de más especies de *Claviceps* (*C. sulcata* Langdon y *C. fusiformis* Loveless) en nuevas localidades, puede deberse al movimiento de semillas y a que las condiciones climáticas favorecen su reproducción y dispersión (Fernández *et al.*, 1995; San Martín *et al.*, 1997) lo que permite la colonización de nuevos hospederos, el desplazamiento de especies endémicas (Pazoutova *et al.*, 2000) y la oportunidad para la evolución de *Claviceps*; por lo tanto, es de primordial importancia continuar con el estudio de genética y dinámica de poblaciones para comprender la epidemiología de la enfermedad y estar preparados ante la posibilidad de la aparición de nuevos genotipos de cornezuelo.

CONCLUSIONES

Se observaron diferencias en patogenicidad entre aislamientos de cornezuelo colectados en Celaya, Guanajuato y en Río Bravo, Tamaulipas. Así mismo el análisis AFLP indicó una alta diversidad genética y la existencia de múltiples genotipos de cornezuelo en México. Además, dada su estrecha relación genética probablemente todos los aislamientos provienen de un mismo clon.

Agradecimientos. Este estudio fue parcialmente financiado por INIFAP y el proyecto Supervivencia, diseminación y control de cornezuelo en México y Estados Unidos. USDA-

INIFAPNo. 58-6202-1-F151.

LITERATURACITADA

- Aguirre, R.J., Williams, A.H., Montes, G.N., and Cortinas, E.H.M. 1997 First report of sorghum ergot caused by *Sphacelia sorghi* in Mexico. *Plant Disease* 81:831.
- Avise, J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall. New York, USA. 512 p.
- Bandyopadhyay, R., Frederickson, D.E., McLaren, N.W., and Odvody, G.N. 1996. Ergot: a global threat to sorghum. *International Sorghum and Millets Newsletter* 37:1-32.
- Bandyopadhyay, R., Frederickson, D.E., McLaren, N.W., Odvody, G.N., and Ryley, M.J. 1998. Ergot: A new disease threat to sorghum in the Americas and Australia. *Plant Disease* 82:356-367.
- Brooking, I.R. 1976. Male sterility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench induced by low night temperature. Timinig of stage of sensitivity. *Australian Journal of Plant Physiology* 3:589-596.
- Esser, K., and Tudzynski, P. 1978. Proof of a monoecious life cycle and segregation patterns for mycelial morphology and alkaloid production. *Theoretical and Applied Genetics* 53:145-150.
- Fernandes, C.L., Fernandes, A.T.F., and Bezerra, J.L. 1995. "Mela": Uma nova doenca em sementes de *Brachiaria* spp. no Brasil. *Fitopatologia do Brasil* 20:501-503.
- Gupta, G.K., Subbarao, K.V., and Saxena, M.B.L. 1983. Relationship between meteorological fact and the occurrence of ergot disease (*Claviceps microcephala*) of pearl millet. *Tropical Pest Management* 29:321-324.
- Odvody, G.N., Frederickson, D.E., Isakeit, T., Dahlberg, J.A., and Paterson, G.L. 1999. The role of seedborne inoculum in sorghum ergot. pp. 136-140. In: Proceeding Third International Seed Testing Association Seed Health Symposium. Ames, Iowa, USA. 160 p.
- Odvody, G.N., Montes, N., Frederickson, E.D., and Narro-Sánchez, J. 2002. Detection of sclerotia of *Claviceps africana* in the western hemisphere. pp. 129-130. In: J.F. Leslie (ed.). *Sorghum and Millets Diseases*. Iowa State Press, First Ed. Ames, Iowa, USA. 504 p.
- Pazoutova, S., Bandyopadhyay, R., Frederickson, D.E., Mantle, P.G., and Frederiksen, R.A. 2000. Relations among sorghum ergot isolates from the Americas, Africa, India, and Australia. *Plant Disease* 84:437-442.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel J., Tingey, S., and Rafalski, A. 1996. The comparasion of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2:225-238.
- Prom, L.K., Isakeit, T., Odvody, G.N., Rush, C.M., Kaufman, H.W., and Montes, N. 2005. Survival of *Claviceps africana* within sorghum panicles at several Texas locations. *Plant Disease* 89:39-43.
- Reed, J.D., Ramundo, B.A., Clafin, L.E., and Tuinstra, M.R. 2002. Analysis of resistance to ergot in sorghum and potential alternate host. *Crop Science* 42:1135-1138.
- San Martín, F., Lavín, P., García, A. y García, G. 1997. Estados anamórficos de *Claviceps africana* y *Claviceps fusiformis* (Ascomycetes, Clavicipitaceae) asociados a diferentes pastos en Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Micología* 13:52-57.
- Sokal, R.R., and Sneath, A.P.H. 1963. Principles of Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Co. San Francisco, California, USA. 359 p.
- Statsoft Inc. 1997. Statistica for Windows (Computer program manual). Release 5.1. Tulsa, OK, USA.
- Steel, G.D., and Torrie, J.H. 1998. Bioestadística: Principios y Procedimientos. McGraw-Hill. México, D.F. 622 p.
- Tooley, P.W., and O'Neil, N.R. 2002. Intraspecific variation in *Claviceps africana*. pp. 151-155. In: J.F. Leslie (ed.). *Sorghum and Millets Diseases*. Iowa State Press, First Ed. Ames, Iowa, USA. 504 p.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Workneh, F., and Rush, C.M. 2003. Status of sorghum ergot in the Texas Panhandle and efforts towards development of risk forecasting model. In: Proceeding of the 23rd Biennial Sorghum Industry Conference. Albuquerque, New Mexico, USA. 47 p.