

Caracterización de 13 variedades de sorgo (*Sorghum bicolor*) empleando marcadores microsatélites¹

Andrés Ávalos, Sofía Avelar, Javier Ajú, Margarita Palmieri & Rolando Cifuentes

Laboratorio de Protección Vegetal, Centro de Estudios Agrícolas y Forestales, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala
aavalos@uvg.edu.gt / palmieri@uvg.edu.gt / rcifuen@uvg.edu.gt

RESUMEN: El empleo de marcadores de ADN ha facilitado en gran medida el mejoramiento genético de cultivos comerciales. Se presentan los resultados de la caracterización de las 13 variedades de *S. bicolor* empleando marcadores SSR. Fue posible alcanzar una cobertura genómica aceptable. La información generada puede ser empleada para verificar la identidad de plantas de sorgo emergidas a partir de semillas de dudoso origen, para identificar genotipos parentales, para hacer estudios de genética de poblaciones y detectar grupos heteróticos de utilidad en programas de mejoramiento genético.

PALABRAS CLAVE: Sorgo, genotipado, microsatélites, reacción en cadena de la polimerasa

Use of microsatellite markers to characterize 13 sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties

ABSTRACT: The use of DNA markers has simplified genetic improvement of commercial crops. We present the experimental results of the characterization of 13 sorghum varieties employing SSR markers. The genome coverage obtained was acceptable. The results could be employed in: identity confirmation of plants from seed from uncertain origin, identification of parental genotypes, in carrying out genetic studies of populations and in genetic improvement programs.

KEY WORDS: Sorghum, genotypes, microsatellites, polymerase chain reaction

Introducción

Las aplicaciones de la biotecnología de plantas no deben sólo responder a mejorar la seguridad alimentaria y apoyar el desarrollo socioeconómico, sino además, promover la

conservación, diversificación y uso sostenible de los recursos genéticos vegetales para la alimentación y la agricultura (Maluszynski, 2002). El material genético de origen vegetal que tiene valor como recurso (i.e. recursos fitogenéticos) para la generación actual de personas y las generaciones futuras. Los recursos fitogenéticos están reconocidos por la FAO como “herencia común de la humanidad” que debería estar disponible sin restricción. Los recursos fitogenéticos del sorgo se conservan en muchos centros alrededor del mundo y comprenden colecciones que consisten en aproximadamente 168,500 individuos (Reddy et al, 2006). Los recursos fitogenéticos se han valido de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares para su caracterización (Mehmood et al, 2008). Actualmente, las herramientas biotecnológicas disponibles para los agricultores ofrecen varias opciones para incrementar la productividad, diversificación y producción, mientras se desarrolla una agricultura más sostenible (Maluszynski, 2002). Las técnicas de marcadores moleculares siempre han sido vistas como las herramientas más prometedoras en programas de mejoramiento de cultivos, y fueron adoptadas rápidamente por agricultores y biólogos moleculares como fundamentales para estudios aplicados relacionados con componentes biológicos de los sistemas de producción agrícola (Maluszynski, 2002); sus usos en programas aplicados de mejoramiento abarcan desde facilitar la elección de los parentales adecuados hasta el mapeo o marcaje de bloques de genes asociados con características de importancia económica –QTL’s–. El marcaje de genes y el mapeo de QTL’s, a su vez, permiten la selección asistida por marcadores en programas de retrocruzamiento, pedigrí y programas de mejoramiento de poblaciones, facilitando el mejoramiento de características específicas; mediante genómica comparativa, los marcadores pueden usarse para el descubrimiento y explotación eficiente de la biodiversidad y de las relaciones evolutivas entre organismos (Maluszynski, 2002). La variación entre individuos de una especie dentro de una población o

¹Se presentan como material de complemento al texto las figuras A1 y A2 y los cuadros A1 y A2

entre poblaciones, derivada de genes y/o de la influencia del ambiente, puede ser fácilmente evaluada a través del uso de una variedad de marcadores moleculares (Park et al, 2009). Los rasgos morfológicos que exhiben variación continua entre individuos en una población a menudo oscurecen la evaluación de la diversidad genética; adicionalmente, el pleiotropismo y la base multifactorial de los rasgos morfológicos complican aún más la caracterización de poblaciones de plantas (Park et al, 2009). Los sistemas de marcadores de ADN se introdujeron al análisis genético en la década de 1980 y tienen muchas ventajas con respecto a los marcadores morfológicos tradicionales y con respecto a los marcadores de proteínas que se usan en análisis genético y ecológico de poblaciones vegetales. Entre las principales ventajas están, primero, que pueden generarse un número ilimitado de marcadores; segundo, que los perfiles de marcadores de ADN no se ven afectados por el ambiente y, tercero, que los marcadores de ADN, a diferencia de las isoenzimas, no se limitan a la etapa específica del desarrollo del tejido (Park et al, 2009). Los marcadores moleculares pueden detectar polimorfismos producidos por mutaciones puntuales así como por mutaciones cromosómicas como inserciones, remociones, inversiones y translocaciones (Park et al, 2009). La "primera generación" de marcadores moleculares emplea hibridación Southern, mientras que la "segunda generación" emplea la revolucionaria reacción en cadena de la polimerasa -PCR-; las ventajas de la segunda con respecto a la primera consisten en que se requieren pequeñas cantidades de ADN y que el costo es bajo y es fácil de llevar a cabo por lo que se pueden llevar a cabo experimentos a gran escala en un corto período de tiempo (Park et al, 2009).

El *Sorghum bicolor* ($2n=20$) es una especie diploide, altamente autógama, considerablemente diversa tanto morfológica como agronómicamente como en el caso de la resistencia adaptativa a plagas. Consiste en cinco razas básicas (bicolor, caudatum, durra, guinea y kafir) y varias razas híbridas (Kong et al, 2000). Perteneciente a la familia Graminae, la tribu Andropogonae contiene varias especies de cultivos importantes, de los cuales el maíz es el que mejor se ha caracterizado genéticamente. Hacia 1990, otros miembros de esta tribu como sorgo (*Sorghum bicolor*) y caña de azúcar (especies del género *Saccharum*) permanecían sin ser caracterizados a profundidad pese a su importancia económica y décadas de investigación genética y mejoramiento (Hulbert et al, 1990). Hacia 1997, la información relacionada con la organización genómica era limitada (Taramino et al, 1997). La construcción de un mapa genético detallado del sorgo inició con el empleo de la información genética disponible del maíz (sondas de RFLP) (Hulbert et al, 1990). La construcción de al menos 7 mapas de RFLPs de sorgo empleando tanto sondas mapeadas previamente en el genoma del maíz como sondas específicas para sorgo, evidencias de las relaciones entre y dentro de sorgo silvestre y sorgo cultivado empleando RFLPs nucleares, cloroplastidiales y mitocondriales y, finalmente, el advenimiento de las técnicas de marcadores moleculares basadas en PCR, en particular RAPDs, que facilitó el análisis del genoma del sorgo (Taramino et al, 1997) constituyen el inicio de la genómica de sorgo. Este rápido avance en el mapeo, lo

que resultó en la propuesta de una nomenclatura para la citogenética del cultivo (Kim et al, 2005). Poco tiempo después se concretó la unificación de seis mapas generados independientemente (Mace et al, 2009). El descubrimiento y aplicación de un ensayo basado en PCR para la detección de polimorfismos según la variación del número de repeticiones de secuencias cortas de ADN (SSRs, también llamados microsatélites) revolucionó el análisis genómico y se empleó inmediatamente en el mapeo y genotipado de diferentes especies de plantas como arroz, trigo, cebada, maíz, soya y tomate. (Taramino et al, 1997). Desde principios del siglo XXI los marcadores SSRs para sorgo se desarrollaron extensamente (Kong et al, 2000; Bhattaramakki et al, 2000) e inmediatamente empleados para identificar y localizar regiones genómicas de importancia económica como altura, tiempo en alcanzar madurez, número de tallos, longitud de la panícula y otras características que influyen en el rendimiento de grano. Estudios de genética clásica han contribuido con información de cómo se controlan genéticamente algunos de estos caracteres. Por ejemplo, se sabe que la variación en la madurez está controlada por seis genes y el enanismo por cuatro genes. La construcción de mapas de marcadores del sorgo ha hecho posible mapear estos genes y otros loci genéticos que controlan la variación de los rasgos cuantitativos (QTLs) como altura de la planta, número de tallos, peso de la semilla, características de la panícula y resistencia a enfermedades (Hart et al, 2001). El descubrimiento de QTLs asociados a la resistencia a heladas es uno de los primeros esfuerzos para que las variedades élite de sorgo tengan un alto desempeño aún en las bajas temperaturas típicas de las regiones templadas hacia el inicio del ciclo del cultivo (Knoll et al, 2007).

En este artículo se presentan los resultados de la caracterización de las 13 variedades de *S. bicolor* empleando marcadores SSR.

Materiales y métodos

Colección y almacenamiento de material vegetal. El ensayo fue ubicado en UVG Campus Sur. Se colectaron segmentos de alrededor de 15cm de longitud de hojas sanas de *S. bicolor* de 13 diferentes variedades: (A) Dale, (B) M81E, (C) Della, (D) Top 76-6, (E) Sugar Drip, (F) Umbrella, (G) ICTA Mictlán, (H) H8015, (I) Pampa E, (J) Pampa Tanol I, (K) Pampa Tanol II, (L) Criollo-Jutiapa, (M) Criollo-Jalapa. Al momento de la toma del material las plantas tenían alrededor de 70 días. Se emplearon cuchillas de afeitar nuevas para cortar cada segmento, descartando la punta de la hoja para obtener un segmento rectangular. De cada planta se tomaron dos hojas diferentes, y de cada variedad se muestrearon dos individuos diferentes, para obtener un total de cuatro segmentos de hoja de cada variedad. El material vegetal se colocó inmediatamente en bolsas plásticas con cierre hermético que se identificaron con tinta indeleble y se transportaron a 4 °C. Al llegar al laboratorio se ingresaron al libro del proyecto y se dividieron en dos sub-muestras antes de almacenarse finalmente a -80 °C. Las plantas muestreadas se seleccionaron aleatoriamente.

Procedimientos de laboratorio

- **Extracción de ADN vegetal.** El material colectado presentaba condiciones fitosanitarias y de manejo agronómico óptimas. Se maceraron cuatro discos de material vegetal con ayuda de nitrógeno líquido en un tubo de 1.5 mL. Se agregaron 600 μ L de buffer CTAB (2% CTAB, 2% polivinilpirrolidona, 100 mM Tris-HCl pH 8, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.2% 2-mercaptoetanol) previamente calentado a 65 °C. Después de incubar a 65 °C por 20 min con agitación ocasional y de dejar enfriar a temperatura ambiente, se agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Al sobrenadante recuperado se le agregó un volumen de isopropanol frío y 50 μ L de acetato de amonio 7.5 M, se mezcló por inversión e incubó a -20 °C al menos una hora o toda la noche. Luego se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. Al precipitado se le añadieron 200 μ L de etanol al 70 % previamente enfriado, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min y se descartó nuevamente el sobrenadante. Luego se secó el precipitado a temperatura ambiente o en incubadora a 50 °C para finalmente resuspender en buffer TE precalentado a 50 °C o a 4 °C toda la noche. El ADN extraído y disuelto en TE se almacenó a 4 °C. El ADN extraído y precipitado con isopropanol y acetato de amonio se almacenó a -20 °C.

- **Cuantificación y verificación de integridad de ADN.** Se realizó una dilución de cada ADN con agua destilada (1:100) y se determinó su absorbancia a 260, 280 y 230 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (*Eppendorf Bio-Photometer plus*) para determinar la concentración y pureza del ADN extraído. Luego se verificó la integridad del ADN extraído, para lo que se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se cargó únicamente una muestra de cada duplicado. La corrida fue de 45 min a 85 V en TAE 1X. El gel fue teñido con bromuro de etidio y observado en transiluminador UV (*UVP Biodoc-it Imaging Systems*).

- **RAPD's.** La mezcla de reacción consistió en: buffer 1X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's 0.17 mM, iniciador 0.2 μ M, 1.25 U de Taq polimerasa (*Novagen*) y 100 ng de ADN, en un volumen de 30 μ L por muestra por reacción. Los iniciadores utilizados fueron OPB18, OPJ10 y OPA04. El programa del termociclador consistió en 94 °C 3 min, (45 ciclos de 93 °C 1 min, 35 °C 1 min y 72 °C 2 min), y un paso final a 72 °C por 7 min.

- **ISSR's.** La mezcla de reacción consistió en: buffer 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP's 0.1 mM, iniciador 10 mM, 1 U de Taq polimerasa y 100 ng de ADN, en un volumen de 25 μ L por muestra. Se utilizaron los iniciadores (TCC) y (CA)7.

- **SSR's.** La mezcla de reacción consistió en: buffer 1X, 1.5 mM MgCl₂, dNTP's 0.17 mM, iniciadores 0.5 μ M cada uno, 2 U de Taq polimerasa (*Novagen*) y 50 ng de ADN, en un volumen de 12.5 μ L por reacción por marcador por muestra. Se emplearon diez marcadores desarrollados por CIRAD: mSbCIR286, Xgap84, mSbCIR276, gpsb151, mSbCIR329, gpsb069, gpsb148,

gpsb123, Xcup02, mSbCIR262. Estos marcadores fueron seleccionados según su ubicación genómica a razón de un marcador por cromosoma y según su grado de polimorfismo definido previamente en CIRAD (CIRAD, 2011); las secuencias son de libre acceso. El programa del termociclador consistió en 94 °C 4 min, (9 ciclos de 94 °C 40s, 60 °C 40s, 72 °C 1 min, con una disminución de 1 °C por ciclo), (20 ciclos de 94 °C 40s, 50 °C 40s, 72 °C 1 min).

- **Electroforesis en gel de agarosa.** Todos los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis submarina al 1.5 % a 90 V 90 min en TAE 1X. Se cargó una mezcla de 1 μ L "loading dye" (glicerol 50 %, xilen-cianol 2.5 %, azul de bromofenol 2.5 %) con 7 μ L de producto de PCR, utilizando 3.5 μ L de una escalera de 1 kb al 35% en "loading dye" (*Promega*). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, y se visualizaron mediante un transiluminador UV.

- **Electroforesis en gel de poliacrilamida.** Todos los productos de las amplificaciones efectuadas se corrieron en electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando el sistema MiniProtean TetraCell (*Bio-Rad*). Cada gel se preparó con 3.5 mL de agua desmineralizada, 0.6 mL de TBE 5X, 1.57 mL de acrilamida (40% 19:1), 8 μ L de TEMED y 8 μ L de APS 25%. Las muestras se prepararon agregando 1 volumen de "stop mix", y se cargaron 3 μ L de cada muestra utilizando 3.5 μ L de una escalera de 100 pb (*Novagen*) al 20 % en "stop mix" como referencia. Las condiciones de corrida fueron: RAPD's 3 h a 110 V, ISSR's 1 h 45 min a 110 V y los SSR's 1 h 30 min a 110 V. Estos geles se tiñeron con nitrato de plata que implica: fijación por 20 min con ácido acético 10% (el cual se recupera para su uso el paso final), tres lavados de 2 min c/u con agua destilada, la tinción con nitrato de plata (AgNO₃ 0.1 % p/v, formaldehído 0.15 % v/v) por 30 min, un lavado rápido con agua destilada por 10 s, el revelado con solución fría de carbonato de sodio (NaCO₃ 3 % p/v, formaldehído 0.15 %, tiosulfato de sodio 0.00052 %) hasta la aparición de bandas definidas y, finalmente, la detención del revelado con el ácido acético al 10 % previamente recuperado. Los geles se colocaron sobre papel filtro cubiertos con una pieza de plástico transparente (acetato o bolsa con cierre hermético) para obtener la imagen mediante un escáner (*Canon*) a una resolución de al menos 300 ppp y almacenados en formato TIF para su análisis.

- **Análisis de imágenes.** Las imágenes de los geles se analizaron con el paquete TotalLab 120DM (*Nonlinear Dynamics*) para asignar la masa molecular empleando como referencia una escalera de tamaños de ADN (*Promega*). El tamaño de cada fragmento se estimó en duplicado.

- **Análisis de genotipos.** El análisis multivariado se llevó a cabo utilizando el paquete *adegenet* (Jombart, 2008; Jombart y Ahmed, 2011) del programa R (R Core Team, 2013), al que se ingresó una matriz de datos genotípicos por individuo (véase material suplementario).

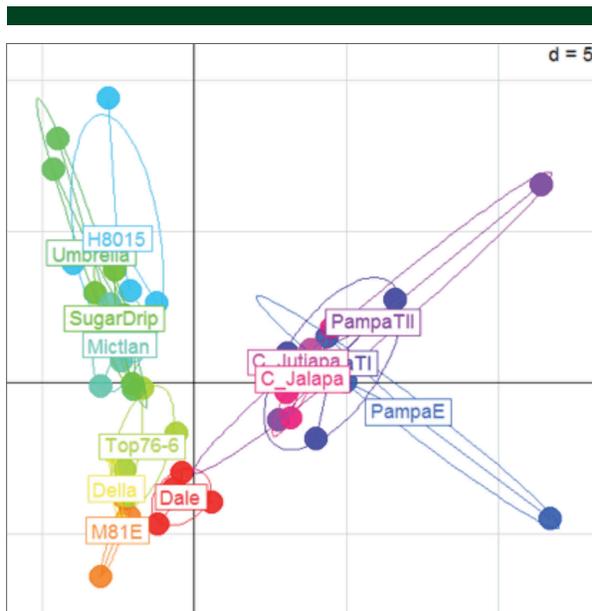


Figura 1. Análisis de los componentes principales basado en los genotipos de las diferentes variedades de sorgo obtenidos del análisis de 10 microsatélites (SSR). El código de colores corresponde con la similitud entre variedades. d=dimensión de la cuadrícula.

Resultados

El protocolo de extracción de ADN empleado tuvo un rendimiento de 721.75 ± 192.40 ng/ μ L (IC 95%), razón A_{260}/A_{280} 2.02 ± 0.18 (IC 95%) y razón A_{260}/A_{230} 1.73 ± 0.28 (IC 95%). Tanto el protocolo de amplificación de los marcadores RAPD como el protocolo de amplificación de los marcadores ISSR generaron fragmentos de ADN polimórficos que no permitieron diferenciar la totalidad de las variedades evaluadas.

El protocolo de amplificación de los marcadores microsatélites (SSR) permitió establecer el genotipo de todas las réplicas de la totalidad de las variedades analizadas (consultar el material suplementario). El análisis multivariado de los genotipos de cada variedad obtenidos permitió observar la estructura genética mediante un análisis de componentes principales (Figura 1).

Discusión

En la era de la genómica, la introducción de nuevas variedades de un cultivo para su evaluación en el campo con fines de incrementar la producción de una región o de un país no debe restringirse a la exposición de diferentes genotipos a diferentes condiciones climáticas que, a su vez variables para una misma región. La evaluación agronómica debe ser complementada con una evaluación genética. Las variedades de *S. bicolor* que actualmente se siembran en Guatemala provienen de programas de mejoramiento genético local (a cargo del ICTA), o bien fueron adquiridas como parte de un intercambio de germoplasma o

por compra directa del mismo. Cualquiera que sea su origen, es muy importante conocer la estructura genética del grupo de estas variedades para poder correlacionarla con su respuesta en campo y tomar mejores decisiones para futuras evaluaciones o bien para emplearla en programas de mejoramiento genético como en el caso de la caña de azúcar (Orozco et al, 2012). Es indiscutible la utilidad que han tenido los marcadores microsatélites desarrollados para *Sorghum* sp. para la estimación la diversidad de líneas élite en programas de mejoramiento y en colecciones de germoplasma de diferentes ubicaciones geográficas, así como para determinar la estructura genética poblacional y las relaciones entre y dentro de razas (Wu y Huang, 2007). Estos marcadores se prefieren sobre los RAPDs por la facilidad de su manejo, por su reproducibilidad (Agrama y Tuinstra, 2003) y su disponibilidad disponibles abiertamente (Mace et al, 2009).

De los 48 marcadores microsatélites sugeridos para uniformizar el genotipado de *S. bicolor* (Billot et al, 2012), se ensayaron los 10 más polimórficos. Los marcadores seleccionados también obedecen a ubicación genómica, a razón de un marcador por cromosoma (Menz et al, 2004). Los resultados se consideran válidos y reproducibles, pues este nivel de resolución aún es suficiente para descubrir la estructura genética del grupo de variedades analizada (véase la Figura 1), de modo que esta información puede aplicarse directamente. Se recomienda que la cooperación con instituciones guatemaltecas que posean esta tecnología sea utilizada para descubrir la diversidad de organismos endémicos y en riesgo.

En el entendido de que las variedades de sorgo que están siendo impulsadas por el proyecto UVG-USDA-FFP10 contienen un acervo genético disminuido como consecuencia de diversos procesos de selección (Dweikat, 2005), la herramienta de genotipado implementada en este estudio fue útil para descubrir grupos heteróticos (Menz et al, 2004). Se observaron dos grupos con potencial para ampliar la base genética de nuevos híbridos: el primer grupo conformado por las variedades Pampa (I, II y E) y Criollos (Jutiapa y Jalapa) y el segundo grupo conformado por el resto. El segundo grupo puede ser dividido a su vez en dos: el conformado por las variedades Top76-6, Dale, Della y M81E y el conformado por Sugar-Drip, Umbrella, ICTA-Mictlan y H8015. Esta estructura genética puede explotarse para programar la producción de variedades que se acoplen mejor a los requerimientos locales. La tasa de adopción de éstos nuevos materiales aumentará según se observe su adaptación (Bucheyeki et al, 2009) a los suelos guatemaltecos.

Agradecimientos

Se agradece el aporte del proyecto Universidad del Valle de Guatemala/United States Department of Agriculture/Food For Progress 2010 para la ejecución de esta investigación.

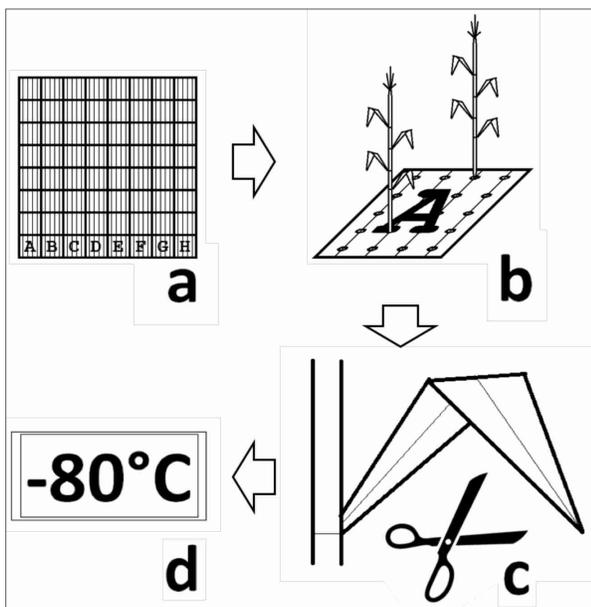


Figura A1. Colecta y almacenamiento de material vegetal: sorgo dulce. (a) Disposición de las variedades dentro de la casa malla, se observa el diseño de bloques. (b) Selección aleatoria de dos individuos diferentes de cada variedad. (c) Toma de muestras empleando instrumentos estériles, identificación y transporte en frío. (d) Almacenamiento a -80°C hasta el momento de la extracción de ADN.

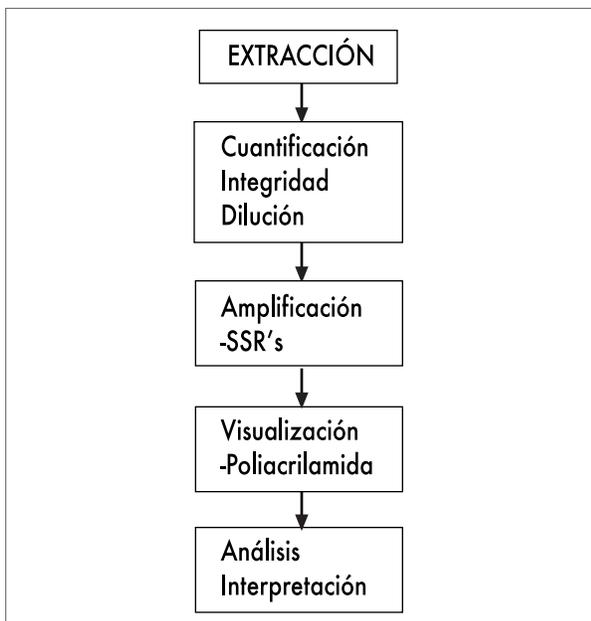


Figura A2. Secuencia de pasos para el análisis de ADN mediante marcadores moleculares.

Cuadro A1. Concentración y razones de absorbancia de ADN extraído.

Muestra	Concentración (ng/ μl)	Razón 260/280	Razón 260/230
001	1066.9	1.67	0.59
002	581.7	2.01	1.87
003	490.7	2.11	1.44
004	591.1	2.69	2.19
005	171.3	-	-
006	158	1.98	1.79
007	268.2	2.33	2.16
008	658.3	2.34	2.11
009	638.6	2.37	1.96
010	781.9	2.24	2.70
011	952.6	1.31	1.14
012	834.3	1.74	1.21
013	669.1	1.86	1.43
014	1448.5	1.98	1.69
015	1088.1	1.90	1.92
016	1139.2	1.78	1.76

Material suplementario:

- **Figura A1.** Colecta y almacenamiento de material vegetal: sorgo dulce. (a) Disposición de las variedades dentro de la casa malla, se observa el diseño de bloques. (b) Selección aleatoria de dos individuos diferentes de cada variedad. (c) Toma de muestras empleando instrumentos estériles, identificación y transporte en frío. (d) Almacenamiento a -80°C hasta el momento de la extracción de ADN.

- **Figura A2.** Secuencia de pasos para el análisis de ADN mediante marcadores moleculares.
- **Cuadro A1.** Concentración y razones de absorbancia de ADN extraído.
- **Cuadro A2.** Genotipos de las variedades de sorgo analizadas.

Cuadro A2. Genotipos de las variedades de sorgo analizadas.

Variedad	mSbCIR286	Xgap84	mSbCIR276	gpsb151	mSbCIR329	gpsb069	gpsb148	gpsb123	Xcup02	mSbCIR262
Dale	161/136	241/209	285/233	131/131	140/116	255/218	165/140	359/311	183/183	252/210
Dale	159/135	234/202	285/232	127/127	140/115	255/218	167/140	374/305	177/177	242/202
Dale	164/139	242/210	285/229	126/126	141/116	253/216	164/140	356/311	183/183	251/208
Dale	163/138	236/202	285/233	125/125	137/114	250/216	167/141	371/304	177/177	243/202
M81E	159/135	242/208	281/233	120/120	133/110	270/239	161/139	348/302	172/172	233/191
M81E	156/132	245/210	281/229	120/120	132/108	270/239	164/141	345/302	170/170	232/191
M81E	162/138	243/210	285/233	114/114	132/110	270/241	164/141	345/302	173/173	231/191
M81E	159/135	245/212	285/233	119/119	131/108	270/241	165/140	345/302	171/171	231/189
Della	156/132	238/204	281/229	121/121	137/112	253/216	165/138	346/300	170/170	240/196
Della	154/130	238/207	281/229	121/121	140/114	255/218	165/141	345/300	172/172	240/199
Della	158/134	238/204	280/229	121/121	134/111	253/218	164/139	345/302	171/171	237/196
Della	157/132	237/205	280/229	122/122	138/113	254/219	164/141	343/300	173/173	237/198
Top76-6	154/130	235/200	276/225	120/120	137/113	250/213	164/139	345/302	172/172	245/203
Top76-6	156/131	234/201	276/225	116/116	137/113	250/213	162/139	356/309	174/174	263/220
Top76-6	157/131	231/198	280/224	120/120	135/112	251/215	166/141	345/302	173/173	243/202
Top76-6	158/133	230/198	280/224	114/114	135/112	251/215	162/140	353/309	175/175	265/220
SugarDrip	163/137	233/198	290/277	121/121	134/112	249/215	161/137	369/320	188/188	253/209
SugarDrip	158/133	227/196	286/277	125/125	134/110	249/213	159/135	360/312	182/182	251/208
SugarDrip	159/135	233/198	288/279	121/121	134/110	251/217	162/139	368/321	187/187	254/210
SugarDrip	159/133	227/196	288/279	123/123	134/113	253/217	161/139	363/316	183/183	251/207
Umbrella	158/133	224/193	284/275	118/118	134/110	248/211	158/133	351/305	178/178	249/207
Umbrella	155/131	224/193	287/274	117/117	131/109	249/211	158/133	348/302	178/178	253/211
Umbrella	154/131	226/196	288/279	118/118	133/108	253/215	160/137	357/311	177/177	247/205
Umbrella	151/129	227/196	285/277	115/115	134/110	250/216	160/135	354/307	178/178	251/209
Mictlan	154/131	234/204	277/228	122/122	134/111	216/216	160/136	348/300	173/173	256/214
Mictlan	154/129	240/209	274/227	121/121	134/111	213/213	160/136	351/300	178/178	255/213
Mictlan	153/129	237/205	279/228	121/121	136/111	216/216	161/136	357/309	172/172	254/211
Mictlan	153/130	241/209	277/227	121/121	132/109	217/217	160/135	354/307	176/176	252/209
H8015	158/134	243/212	277/230	121/121	144/112	275/241	160/136	351/305	186/186	264/219
H8015	158/132	246/216	280/228	123/123	144/113	275/241	158/133	356/312	188/188	266/223
H8015	157/132	248/214	280/227	121/121	144/112	275/243	160/138	357/311	186/186	261/215
H8015	155/130	249/218	282/232	121/121	145/112	275/243	159/134	366/316	190/190	262/219
PampaE	142/133	199/187	253/230	128/109	148/114	208/200	150/150	281/281	189/189	259/235
PampaE	166/139	195/182	255/227	136/136	152/115	208/201	138/138	335/307	196/196	237/220
PampaE	146/136	194/181	264/236	155/145	154/117	200/200	143/143	287/287	201/201	221/208
PampaTI	151/127	212/199	255/234	121/112	118/118	208/199	150/150	288/288	187/187	238/219
PampaTI	134/126	211/188	255/227	128/108	119/119	208/200	138/138	335/309	197/197	236/217
PampaTI	142/131	209/200	264/236	143/137	153/118	199/199	137/137	292/292	199/199	243/222
PampaTII	164/139	215/202	256/230	137/128	123/112	208/199	141/141	337/309	198/198	254/233
PampaTII	139/131	214/191	256/226	144/144	116/116	207/200	150/150	288/288	197/197	238/219
PampaTII	152/141	211/201	269/238	180/161	171/117	197/197	138/138	318/318	198/198	236/218
C_Jutiapa	135/117	205/186	254/232	131/125	117/106	204/204	150/150	288/288	197/197	251/227
C_Jutiapa	119/114	206/189	255/227	115/110	119/107	204/204	139/139	340/310	196/196	252/231
C_Jutiapa	127/119	205/185	266/237	128/118	119/107	202/202	140/140	292/292	198/198	238/219
C_Jalapa	148/128	209/198	256/233	127/123	124/115	206/197	150/150	291/291	196/196	241/217
C_Jalapa	124/119	209/187	253/225	112/112	126/118	206/197	140/140	311/311	193/193	252/231
C_Jalapa	131/122	208/201	263/236	129/118	130/120	195/195	146/146	294/294	198/198	227/215

Bibliografía

- Agrama HA, Tuinstra MR (2003) *Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs* African J Biotechnol **2**: 334-340
- Bhattaramakki D, Dong J, Chhabra A, Hart G (2000) *An integrated SSR and RFLP linkage map of Sorghum bicolor (L.) Moench* Genome **43**: 988-1002
- Billot C, Rivallan R, Sall M, Fonceka D, Deu M, Glaszmann J, Hash C (2012) *A reference microsatellite kit to assess for genetic diversity of Sorghum bicolor (Poaceae)* Am J Botany **99**: e245-e250
- Bucheyeki TL, Gwanama C, Mgonja M, Chisi M, Folkertsma R, Mutegi R (2009) *Genetic variability characterisation of Tanzania sorghum landraces based on simple sequence repeats (SSRs) molecular and morphological markers* African Crop Sci J **17**: 71-86
- CIRAD (2011) *A SSR kit to study Sorghum genetic diversity* Obtenido de: http://sat.cirad.fr/sat/sorghum_SSR_kit/data/msat_char.html
- Dweikat I (2005) *A diploid, interspecific, fertile hybrid from cultivated sorghum, Sorghum bicolor, and the common Johnsongrass weed Sorghum halepense* Mol Breed **16**: 93-101
- Hart GE, Schertz KF, Peng Y, Syed NH (2001) *Genetic mapping of Sorghum bicolor (L.) Moench QTLs that control variation in tillering and other morphological characters* Theor Appl Gen **103**: 1232-1242
- Hulbert S, Richter T, Axtell J, Bennetzen J (1990) *Genetic mapping and characterization of sorghum and related crops by means of maize DNA probes* Proc National Acad Sci **87**: 4251-4255
- Jain M, Chourey P, Li QB, Pring D (2008) *Expression of cell wall invertase and several other genes of sugar metabolism in relation to seed development in sorghum (Sorghum bicolor)* J Plant Physiol **165**: 331-344
- Jombart T (2008) *adeigenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers* Bioinformatics **24**: 1403-1405
- Jombart T, Ahmed I (2011) *adeigenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data* Bioinformatics **27**: 3070-3071
- Kim JS, Klein P, Klein R, Price HJ, Mullet J, Stelly D (2005) *Chromosome identification and Nomenclature of Sorghum bicolor* Genetics **171**: 1169-1173
- Knoll J, Gunaratna N, Ejeta G (2008) *QTL analysis of early-season cold tolerance in sorghum* Theor Appl Gen **116**: 577-587
- Kong L, Dong J, Hart GE (2000) *Characteristics, linkage-map positions, and allelic differentiation of Sorghum bicolor (L.) Moench DNA simple-sequence repeats (SSRs)* Theor Appl Gen **101**: 438-448
- Mace E, Rami JF, Bouchet S, Klein P, Klein R, Kilian A, Jordan D (2009) *A consensus genetic map of sorghum that integrates multiple component maps and high-throughput diversity array technology (DArT) markers* BMC Plant Biology **9**: 13
- Maluszynski M (2002) *Mutant Germplasm Characterization Using Molecular Markers. A Manual*, Vienna: IAEA
- Mehmood S, Bashir A, Ahmad A, Akram Z, Jabeen N, Gulfranz M (2008) *Molecular characterization of regional Sorghum bicolor varieties from Pakistan* Pakistan J Botany **40**: 2015-2021
- Menz M, Klein R, Unruh N, Rooney W, Klein P, Mullet J (2004) *Genetic diversity of public inbreds of sorghum determined by mapped AFLP and SSR markers* Crop Sci **44**: 1236-1244
- Orozco H, Quemé JL, Ovalle W, Rosales F (2012) *Mejoramiento genético de la caña de azúcar*. En: Melgar M, Meneses A, Orozco H, Pérez O, Espinosa R *El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala* (pág. 512) Guatemala: Artemis Edinter
- Park YJ, Lee J, Kim NS (2009) *Simple Sequence Repeat Polymorphisms (SSRPs) for Evaluation of Molecular Diversity and Germplasm Classification of Minor Crops* Molecules **14**: 4546-4569
- Prakash SP, Biji KR, Gomez M, Murthy G, Babu C (2006) *Genetic diversity analysis of sorghum (Sorghum bicolor L. Moench) accessions using RAPD markers* Indian J Crop Sci **1**: 109-112
- R Core Team (2013) *R: A language and environment for statistical computing* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria URL <http://www.R-project.org/>
- Ramu P, Kassahun B, Senthilvel S, Ashok Kumar C, Jayashree B, Folkertsma RT, Hash CT (2009) *Exploiting rice-sorghum synteny for targeted development of EST-SSRs to enrich the sorghum genetic linkage map* Theor Appl Gen **119**: 1193-1204
- Reddy G, Upadhyaya HD, Gowda CL (2006) *Current status of sorghum genetic resources at ICRISAT: their sharing and impacts* Electronic J Semi-Arid Trop **2** (1)
- Taramino G, Tarchini R, Ferrario S, Lee M, Pe' ME (1997) *Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSRs) in Sorghum bicolor* Theor Appl Gen **95**: 66-72
- Wu YQ, Huang Y (2007) *An SSR genetic map of Sorghum bicolor (L.) Moench and its comparison to a published genetic map* Genome **50**: 84-89