

**Resistencia al moho de los granos en panel de diversidad de
sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]**

Por
Ramón Américo Fermín-Pérez

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado

MAESTRO EN CIENCIAS
en
AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2017

Lydia I. Rivera Vargas, Ph.D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Hugo E. Cuevas, Ph.D.
Co-Presidente del Comité Graduado

Fecha

Linda Wessel-Beaver, Ph.D.
Presidente del Comité Graduado

Fecha

Elvin Román Paoli, Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

Abstract

Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] production in wet humid regions is highly affected by grain mold disease, which involves more than 40 different fungi. The identification of resistant sources and the establishment of reliable evaluation methods are imperative for the development of new resistant varieties. The sorghum association panel (SAP), constituted by 360 accessions that represent 10 subpopulations of sorghum, was evaluated to identify new sources of resistant to grain mold. In parallel, the efficiency of four inoculations of conidial suspension with different pathogenic fungi was evaluated. The SAP was evaluated at Isabela and Mayaguez, Puerto Rico during 2014 (Experiment 1). The rating and germination of harvested sorghum grains was used to identify 43 accessions potentially resistant to grain mold. During this experiment, the subpopulation Sudanese/Broocorn/Guinea average the best seed rating, while the subpopulation Guinea/Caudatum/Bicolor had the highest germination. In contrast, the subpopulation Milo/Feterita was the lowest for seed rating and germination. Subsequently, these 43 accessions were evaluated at Isabela, P.R. during 2015 (Experiment 2). A total of 13 accessions (SC1494, Keller, SC15, SC13, RoxOrange, SC782, 6550Sumac, SC609, KansasOrange, RedAmber, SC598, Tx2784 and SC605) were classified as resistant based on the seed rating and germination of grain harvested from both experiments. The presence of five subpopulations among these 13 accessions suggests the presence of multiple resistant mechanisms. The integration of these accessions into sorghum breeding programs should aid in the development of new resistant varieties. The efficiency of inoculations with different pathogenic fungi was determined with the evaluation of 40 accessions from Experiment 2. Daily, four conidial suspensions of *Curvularia lunata*, *Fusarium thapsinum*, *F. semitactum*, and a mixture of these three fungi were used to inoculate

two to five panicles up to seven days after anthesis. Seed rating and germination were similar among treatments indicating that the resistant/susceptible response was not affected by type of inoculation. Indeed, Isabela, P.R. provides the environmental conditions needed for the successful germplasm evaluation for resistant to grain mold.

Resumen

La producción de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] en regiones húmedas es altamente afectada por la enfermedad del moho de los granos, la cual incluye más de 40 especies de hongos. La identificación de fuentes de resistencias y desarrollo de métodos de evaluación es necesaria para el desarrollo de nuevas variedades. El panel de asociación de sorgo (PAS), compuesto por 360 accesiones que incluyen 10 subpoblaciones de sorgo, fue evaluado para identificar nuevas de fuentes resistencia al moho de los granos. Al mismo tiempo, se evaluó la eficiencia de inoculaciones con 4 suspensiones de conidias con diferentes hongos patogénicos. El PAS fue evaluado en un diseño completamente aleatorizado en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el 2014 (Experimento 1). La apariencia y germinación de los granos cosechados se utilizaron para identificar 43 accesiones con posible respuesta de resistencia al moho de los granos. La subpoblación Sudanese/Broocorn/Guinea promedió la mejor apariencia, mientras que la subpoblación Guinea/Caudatum/Bicolor la mayor germinación. Por el contrario, la subpoblación Milo/Feterita fue inferior por su apariencia y porcentaje de germinación. Subsiguientemente, las 43 accesiones se evaluaron en Isabela, P.R. durante el 2015 (Experimento 2). Un total de 13 accesiones (SC1494, Keller, SC15, SC13, RoxOrange, SC782, 6550Sumac, SC609, KansasOrange, RedAmber, SC598, Tx2784 y SC605) fueron clasificadas como resistentes basado en la apariencia y germinación de los granos de ambos experimentos. La presencia de cinco subpoblaciones entre las 13 accesiones sugiere la posibilidad de diferentes mecanismos de resistencia. La integración de estas accesiones en programas de mejoramiento ayudará al desarrollo de nuevas variedades resistentes. La eficiencia de las inoculaciones con diferentes hongos patogénicos se determinó utilizando 40 accesiones del Experimento 2. Diariamente, cuatro suspensiones de conidias de *Curvularia lunata*, *Fusarium thapsinum*, *F. semitactum*, y una mezcla de los tres

hongos fueron utilizadas para asperjar de dos a cinco panículas por tratamiento durante siete días después de anthesis. La apariencia y germinación fueron iguales entre las panículas tratadas indicando que la respuesta de resistencia/susceptibilidad no varía con las inoculaciones. Ciertamente, la localidad de Isabela, P.R. provee las condiciones ambientales para las evaluaciones de germoplasma para resistencia al moho de los granos.

Agradecimientos

A mi familia que, a pesar de la distancia, siempre estuvieron conmigo.

A el Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF) por la beca. Al Instituto Innovación en Biotecnología e Industria (IIBI) por las recomendaciones y a la Dra. Castillo por el apoyo a mis estudios.

Al Departamento Ciencias Agroambientales del Recinto Universitario de Mayagüez por permitirme ser un alumno de su institución.

Al Dr. Hugo E. Cuevas en especial por su tiempo, su dedicación, por dejarme formar parte de su investigación y por compartir sus conocimientos estos años.

A la Dra. Linda Beaver por todo su tiempo, por poner su experiencia a disposición y el seguimiento al trabajo.

Dra. Lydia Rivera por su cooperación y por formar parte de mí comité.

A la Estación Experimental de Agricultura Tropical (USDA-ARS; TARS) y todo el personal que allí labora por haber cooperado y permitido la realización de la investigación.

A mis amigos que fueron como una familia aquí y por toda su ayuda: Roberto, Yency, Francisca, Marianela y Edwin.

A todos mis compañeros y profesores del RUM que fueron esenciales en este trayecto.

Tabla De Contenido

Abstract	i
Resumen	iii
Agradecimientos	v
Tabla De Contenido	vi
Lista De Tablas	vii
Lista De Figuras	viii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Origen y descripción botánica	3
Producción y uso del sorgo	5
Mejoramiento genético del sorgo.....	6
Recursos genómicos en sorgo.....	8
Enfermedades en el sorgo	12
Moho de los granos	12
Herencia de resistencia al moho de los granos	15
Identificación de fuentes de resistencias.....	16
OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Germoplasma	19
Diseño Experimental.....	19
Inoculaciones y evaluación de resistencia a moho de los granos	20
Análisis estadístico	22
Identificación de accesiones resistente al moho de los granos	24
Interacciones entre hongos y fuentes de resistencia	24
RESULTADOS	26
Panel de Asociación de Sorgo (PAS).....	26
Subpoblaciones del PAS y la resistencia al moho de los granos	29
Fuentes de resistencia a moho de los granos en panel de asociación de sorgo.....	31
Interacción de hongos con accesiones de sorgo.....	34
DISCUSIÓN	36
Panel de Asociación de Sorgo (PAS) y fuentes de resistencia al moho de los granos	36
Evaluación de germoplasma para resistencia al moho de los granos	39
REFERENCIAS	41
ANEXOS	48

Lista De Tablas

Tabla 1 Análisis de varianza para apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas para 360 accesiones del panel de asociación de sorgo [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench] evaluadas en Isabela y Mayagüez durante el año 2014.	29
Tabla 2 Correlaciones de Pearson entre la apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas observadas entre 360 accesiones del panel de asociación de sorgo [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench] evaluado en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014.	29
Tabla 3 Análisis de varianza (ANOVA) para apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas entre las subpoblaciones presentes en el panel de asociación de sorgo [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench] evaluado en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014.	30
Tabla 4 Mínimo cuadrado promedio y error estándar para apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas de las subpoblaciones presentes en el panel de asociación de sorgo [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench] evaluado en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014.	30
Tabla 5 Mínimo cuadrado promedio para porcentaje de germinación y apariencia de semillas para 50 accesiones del panel de diversidad de sorgo [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench] evaluadas en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014 (Experimento 1) y en Isabela, Puerto Rico durante el año 2015 (Experimento 2).	33
Tabla 6 Accesiones, subpoblaciones y sus respectivos coeficientes ancestrales en el panel de diversidad de sorgo [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench] que fueron resistente o moderadamente resistente al moho de los granos en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014 (Experimento 1) y 2015 (Experimento 2), respectivamente.	35
Tabla 7 Análisis de varianza para apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas para 40 accesiones del panel de asociación de sorgo [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench] expuestas a 5 tratamientos en Isabela, Puerto Rico durante el año 2015. Los tratamientos consistieron en aspersiones durante anthesis con soluciones conteniendo conidias de: 1) <i>C. lunata</i> , 2) <i>F. thapsinum</i> , 3) <i>F. semittactum</i> , 4) mezcla de los tres hongos y 5) agua (control).	35
Tabla 8 Respuesta de resistencia a otras enfermedades para las líneas resistentes al moho de los granos identificadas en el panel de diversidad de sorgo [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench].	38

Lista De Figuras

- Figura 1** Distribución geográfica y forma de panícula para las cinco razas de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] 3
- Figura 2** Proceso de conversión del sorgo donde se introgresionan genes para baja altura e insensibilidad al fotoperiodo (Thurber et al. 2013). 8
- Figura 3** Estratificación poblacional de las 377 líneas presente en el panel diversidad de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] basado en el análisis de 47 marcadores de secuencias simples repetidas utilizando el programa STRUCTURE (Casa et al. 2008). 10
- Figura 4** Ciclo de infección para el moho de los granos en sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Los granos pequeños representan el desarrollo normal de la semilla. 14
- Figura 5** Escala para la evaluación de apariencia de semillas de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] donde 1-2 son resistentes, y 3-5 son susceptibles a los mohos de los granos (Isakeit et al., 2008) 21
- Figura 6** Histogramas de la variación de apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas observadas entre 360 accesiones del panel de asociación de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] evaluado en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014. Letras representan: A) Mayagüez, B) Isabela y C) promedio de ambas localidades, mientras los números indican: 1) apariencia de semillas, 2) porcentaje de germinación y 3) peso de semillas 27
- Figura 7** Distribución de la apariencia y germinación de semillas para 360 accesiones del panel de asociación de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] evaluado en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014. Líneas entrecortadas representan el umbral de 5% de la distribución observada para apariencia y germinación de semillas 32
- Figura 8** Distribución de la apariencia y germinación de semillas para un subgrupo de 50 accesiones del panel de asociación de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] evaluado en Isabela, Puerto Rico durante el año 2015. Líneas entrecortadas representan el umbral de 25% de la distribución observada para apariencia y germinación de semillas 32

INTRODUCCIÓN

El sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] es el quinto cereal más importante en el mundo, siendo un alimento básico en la dieta de más de 750 millones de personas (FAO 2012). La gran versatilidad del sorgo para adaptarse a diferentes ecosistemas (e.g. regiones secas y húmedas), tipos de suelos (e.g. pH ácidos y alto contenido de Al) y su bajo requerimiento de manejo hacen que sea cultivado en más de 98 países con una producción anual mayor de 60 millones de toneladas. Análisis económicos y comerciales pronostican que la producción de sorgo aumentará en los próximos 20 años debido a su potencial uso como biocombustible e interés para consumo humano como fuente alterna libre de gluten y modificación genética (Cuevas, *comunicación personal*). No obstante, la incidencia y efectos de diferentes enfermedades que afectan el área foliar, calidad de granos y rendimientos tienen el potencial de limitar el continuo desarrollo de la industria del sorgo.

Las regiones húmedas productoras de sorgo localizadas en el Sur de Estado Unidos, México, Oeste de África y el Caribe favorecen el desarrollo de enfermedades causadas por hongos. Igualmente, las regiones norte y sur de Puerto Rico que son utilizadas como semillero de invierno por la industria de sorgo. El moho de los granos es la enfermedad más compleja del cultivo porque incluye más de 40 especies de hongos, los cuales varían según el país, localidad y época del año (Thakur et al., 2006). Las pérdidas por esta enfermedad pueden variar de un 30 a 100% de la producción, afectando la apariencia, germinación y calidad de la semilla (Singh y Andyopadhyay, 2000). En adición, el control mediante el uso de fungicidas incrementa el costo de producción y el daño ambiental. La utilización de variedades resistente es el método más eficiente para el control del moho de los granos, sin embargo, un limitado número de genotipos resistentes son utilizados en programas de mejoramiento. Por consiguiente, la identificación de nuevas fuentes de

resistencias presentes en colecciones de germoplasma es fundamental para el desarrollo de nuevos cultivares

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos y su Servicio de Investigación Agrícola (USDA-ARS para sus siglas en inglés) junto con el Sistema Nacional de Germoplasma de Planta (SNGP) mantienen la colección de sorgo más grande del mundo con 43,104 accesiones originarias de 114 países. El alto número de accesiones y reducido número de lugares óptimos para evaluar la respuesta de resistencia al moho de los granos (i.e. alto humedad en regiones tropicales) ha limitado la identificación de nuevas fuentes de resistencia. Recientemente, se estableció un panel de diversidad de sorgo (“sorghum association panel” o SAP en inglés; “panel de asociación de sorgo” o PAS en español) compuesto por 377 accesiones (líneas adaptadas a regiones templadas junto a sus progenitores) de importancia para programas de mejoramiento (Casa et al., 2008). Actualmente, la diversidad genética y fenotípica del PAS es el punto de partida para el desarrollo de nuevos cultivares en programas de mejoramiento. La investigación de este proyecto está dirigida a identificar fuentes de resistencia al moho de los granos presentes en PAS que puedan ser utilizadas en programas de mejoramiento para el desarrollo de nuevos cultivares resistentes.

REVISIÓN DE LITERATURA

Origen y descripción botánica

El género *Sorghum* comprende unas 28 especies, siendo *S. bicolor* (L.) Moench la única especie cultivada comercialmente con el nombre de sorgo (de Wet et al., 1966). El cultivo fue domesticado en la región noreste de África hace aproximadamente 5,000 años, específicamente en la zona que comprende Sudán y Etiopía. Sin embargo, múltiples eventos de re-domesticación en diferentes regiones de África ocasionaron una fuerte subdivisión poblacional y una gran diversidad fenotípica (Figura 1; Thurber et al., 2013). Actualmente, el cultivo está clasificado en cinco razas (Bicolor, Caudatum, Durra, Guinea y Kafir) utilizando las diferentes formas del grano, glumas y panícula, y en intermediarios entre todas las combinaciones de razas (Harlan y de Wet, 1972). La raza Bicolor es la más ancestral y su distribución se extiende por toda África y gran parte de Asia. La panícula es suelta y ramificada

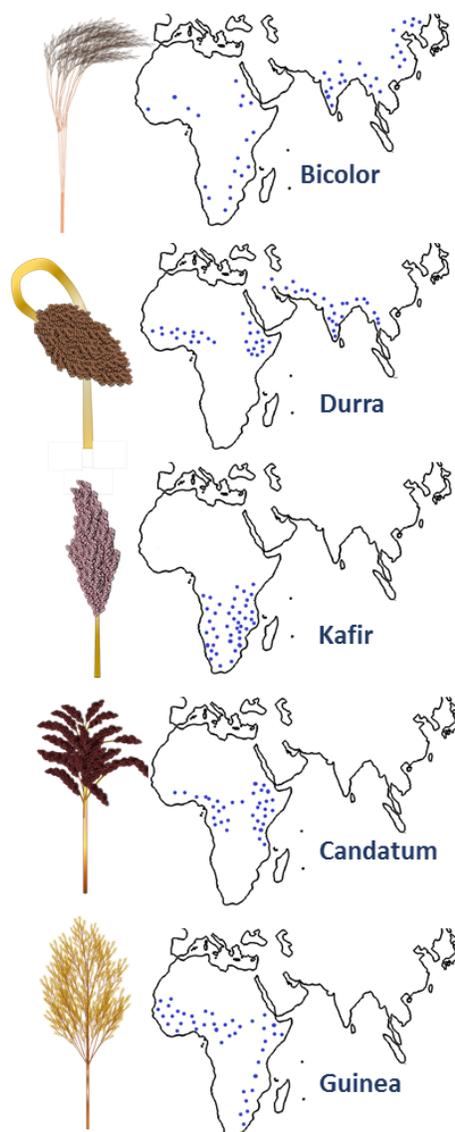


Figura 1 Distribución geográfica y forma de panícula para las cinco razas de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]

asemejándose a los sorgos silvestres con granos pequeños y alargados. La distribución de la raza Caudatum está limitada al centro y este de África presentando una gran diversidad de formas de panículas. La característica particular de la raza son sus granos asimétricos similares a las conchas de las tortugas. Durra es originaria de las regiones desérticas del noreste de África, y ha sido

asociada con tolerancia a condiciones de sequía. Actualmente es la raza más cultivada en India, y se caracteriza por sus panículas compactas de granos grandes y esféricos. Usualmente tienen el tallo encorvado en forma de bastón. Por el contrario, las zonas húmedas del oeste, centro y sur de África fueron las originarias de la raza Guinea. Esta raza está caracterizada por su alta variabilidad morfológica en las panículas las cuales son sueltas y ramificadas con granos simétricos. La raza más recientemente domesticada en la región sur de África fue Kafir. Las panículas son densas de forma cilíndrica con granos simétricos, por tal razón ha sido asociada con altos rendimientos. Ciertamente, la gran diversidad fenotípica y genotípica del sorgo lo posiciona como un cultivo básico en la dieta de muchos países de África y Asia, y recientemente en países del hemisferio Occidental.

El tiempo de floración es uno de los caracteres más asociados con la domesticación y dispersión del sorgo. Originalmente el cultivo es foto-periódico, floreciendo cuando el largo del día es menor de 12 horas permitiéndole utilizar la lluvia y temperaturas bajas del otoño e invierno para su reproducción. Sin embargo, mutaciones naturales que eliminan el efecto de foto-periodo han sido descubiertas y utilizadas en programas de mejoramiento para poder cultivarlo durante cualquier estación del año (i.e. independiente del largo del día). La expansión del cultivo a regiones templadas donde es cultivado durante los días largo del verano es el resultado de la introgresión de estas mutaciones durante el desarrollo de nuevos cultivares. Aunque el control genético de la floración en sorgo es complejo, actualmente se han reportado seis locus asociados con el foto-periodo (Ma_1 al Ma_6), siendo Ma_1 , Ma_2 , Ma_3 y Ma_4 los de mayor importancia (Lin et al., 1995; Childs et al., 1997; Hart et al., 2001; Klein et al., 2008; Murphy et al., 2011; Cuevas et al., 2016). La gran adaptabilidad del cultivo a diferentes tipos de fotoperiodos (tropicales a templados) condiciones ambientales (secas a húmedas) lo posiciona como un cultivo de gran importancia en

la agricultura.

Producción y uso del sorgo

El sorgo es el quinto cereal más cultivado y consumido en el mundo después del arroz, el maíz, el trigo y la cebada (FAO, 2012), y un cereal básico para la dieta > 750 millones de personas en las regiones de África, Asia y América Latina (Codex Alimentarius Commission, 2011). No obstante, aunque su principal uso es como cereal (grano), existen otros dos tipos de producción: el sorgo dulce y de forraje. El sorgo dulce contiene altos niveles de azúcares solubles en los tallos que fluctúan entre 10 a 25 °Brix. Históricamente, ha sido utilizado para la producción de miel y otros derivados, sin embargo, actualmente es considerado una fuente importante para la producción de biocombustible. El sorgo forrajero produce altos niveles de biomasa y es consumido por rumiantes, actualmente también es considerado una fuente importante para la producción de biocombustible. En adición, otros cultivares son utilizados como fuente de carbohidrato en el ensilaje sustituyendo adecuadamente el maíz. El sorgo es el grano más producido a nivel mundial para consumo humano y de animales. En los Estados Unidos (EU) la producción de granos esta mayormente destinada para la producción de alimentos concentrados para animales, aunque recientemente, al igual que el forrajero y dulce, están siendo utilizados para la producción de biocombustible. En países subdesarrollados los granos son únicamente para consumo humano, representando una fuente importante de energía debido al alto contenido de almidón (Jambunathan y Subramanian, 1988). Su procesamiento incluye la preparación de harinas, panes y bebidas alcohólicas a través de la fermentación de sus azúcares. La digestibilidad de sus proteínas es significativamente menor en comparación con otros cereales como el trigo y el maíz (Axtell et al., 1981), sin embargo, es una nueva alternativa para el mercado libre de gluten. Actualmente, el sorgo es altamente recomendado para pacientes con celiaquía, una enfermedad del sistema inmunitario en la cual el gluten afecta la

mucosa del intestino delgado (Schober et al., 2005). El programa de sorgo de EU (i.e. Sorghum Checkoff) estima que la demanda y producción mundial de sorgo aumentará considerablemente en los próximos 20 años (Cuevas, *comunicación personal*).

Los países que producen el 55.7% de la totalidad del sorgo son EU (16.2%), México (12.4%), Nigeria (9.9%), Sudan (9.3%) e India (7.9%) (FAO 2015). No obstante, el rendimiento por acre ha aumentado solo un 0.53% durante los últimos 50 años. El poco aumento en comparación con los cultivos de maíz y el trigo sugieren que la diversidad genética del sorgo no ha sido adecuadamente utilizada. El desarrollo de nuevas líneas genéticamente diversas y complementarias es necesario para aumentar los rendimientos de los híbridos. En Puerto Rico, la producción de sorgo es limitada y mayormente utilizada para forraje. Sin embargo, en los últimos 30 años se ha convertido en una localidad importante para la industria de semillas híbridas quienes pueden adelantar hasta dos generaciones durante el año.

Mejoramiento genético del sorgo

Las colecciones de germoplasma proveen la variación genética disponible para el mejoramiento de los cultivos. Actualmente, los principales países productores de sorgo mantienen sus propias colecciones de germoplasma que aproximadamente suman un total de más 194,250 accesiones. El Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA-ARS por sus siglas en inglés) junto con el SNGP mantiene la colección más grande del mundo con 43,104 accesiones originarias de 114 países. El Instituto Internacional de Investigación de Cultivos para los Trópicos Semiáridos (ICRISAT por sus siglas en inglés) en India, tiene la segunda colección más grande con 36,774 accesiones. Colecciones más pequeñas son mantenidas por China (18,250 accesiones), Etiopía (9,772 accesiones), y Brasil (8,017 accesiones) entre otras (Kimber et al., 2013). Sin embargo, la diversidad genética de estas colecciones no ha sido

extensamente estudiada y utilizada en los programas de mejoramiento. Un estudio molecular encontró que la diversidad genética en programas públicos de mejoramiento de EU es baja y por consiguiente, la heterosis no está siendo utilizada completamente en la producción de semillas híbridas (Menz et al., 2004). Aumentar el número de caracterizaciones genéticas y fenotípicas de las accesiones presentes en las colecciones de germoplasma es necesario para promover su integración en programas de mejoramiento. La sensibilidad al fotoperiodo de la mayoría de las accesiones presentes en los bancos de germoplasma (~80%) limita sus caracterizaciones fenotípicas a regiones tropicales donde pueden florecer durante los días cortos del invierno. Por consiguiente, el uso de la diversidad genética presente en colecciones de germoplasma requiere una pre-adaptación a regiones templadas (i.e. eliminación del fotoperiodo) donde se encuentran los principales programas de mejoramiento.

El programa de conversión de sorgo fue el primero dirigido a utilizar la diversidad genética presente en las colecciones de germoplasma para su mejoramiento (Stephens et al., 1967). Accesiones exóticas con valor agronómico pero sensitivas al fotoperiodo fueron adaptadas a regiones templadas a través de la introgresión de alelos para insensibilidad al fotoperiodo y enanismo presentes en líneas elites (Figura 2). Las líneas desarrolladas con este programa de retrocruces contienen gran parte de la diversidad genética de las accesiones exóticas, pero son de baja estatura y no sensitivas al fotoperiodo. Durante un periodo de 30 años se convirtieron más de 800 líneas que son extensamente utilizadas en programas de mejoramiento. Recientemente, la caracterización genética de 580 de estas líneas encontró que su diversidad genética es alta, pero grandes regiones genómicas en el cromosoma 6, y otras de los cromosomas 7 y 9 que tienen muy poca diversidad (Thurber et al., 2013).

La identificación de accesiones o alelos de importancia económica en el banco de germoplasma

puede hacer una contribución positiva al desarrollo de nuevos cultivos o híbridos. La producción de sorgo comercial en países desarrollados está basada en semilla híbrida para aprovechar la presencia de heterosis en este cultivo. Aproximadamente el 90% de la semilla híbrida para la producción en EU y más del 45% de la demanda mundial, es producida en Texas, EU (Krausz e Isakeit, 1998), generando 1,300 millones de dólares por concepto de venta (National Agricultural Statistics Service, 2013). Ciertamente, el rendimiento de los híbridos puede ser entre un 30 - 40% más que los cultivares de polinización abierta. Los híbridos comerciales se producen utilizando la esterilidad masculina citoplásmica (Stephens and Holland 1954), la cual permite el cruce de padres complementarios sin tener que hacer cruces a mano. Por consiguiente, los programas de mejoramiento de sorgo primeramente subdividen la diversidad genética basándose en su constitución citoplásmica (e.g. restaurador o mantenedor de fertilidad). La mayoría de las accesiones en bancos de germoplasmas son restauradoras, por lo que la diversidad genética del grupo mantenedor es limitada (Menz et al., 2004).

Recursos genómicos en sorgo

El genoma del sorgo es moderadamente pequeño (~730 Mbp) y está distribuido en 10 cromosomas

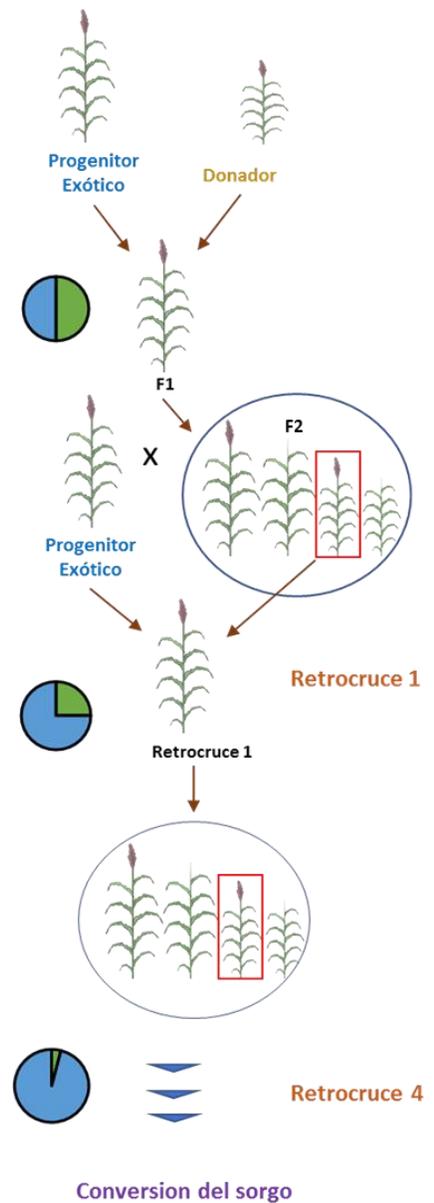


Figura 2 Proceso de conversión del sorgo donde se introgresionan genes para baja altura e insensibilidad al fotoperiodo (Thurber et al. 2013).

($2N=2X=20$). Los bajos niveles de duplicación en comparación con el maíz y el trigo lo posicionan como un cultivo modelo dentro de la familia *Poaceae*. El primer mapa genético se construyó utilizando los marcadores moleculares *Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción* (RFLP; por sus siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Pereira et al., 1994). Actualmente, existen más de 20 mapas genéticos contruidos con diferentes poblaciones y marcadores moleculares (Mace y Jordan 2011). Un total de 40 genes de gran efecto fenotípico (e.g. fotoperiodo, altura, color de semilla, resistencia, etc.) han sido mapeados en el genoma (Mace y Jordan 2010), y más de 48 caracteres cuantitativos se han asociado con aproximadamente 771 regiones genómicas (Mace y Jordan 2011). En el 2009, el 89.7 % del genoma de la línea BTx623 (Frederiksen y Miller, 1972), utilizada para el desarrollo de numerosas líneas elites y estudios genéticos, fue secuenciada y ensamblada en 10 pseudo-cromosomas (Paterson et al., 2009). La anotación y análisis del genoma identificó 34,496 genes putativos y una alta colineraridad con el genoma del arroz. Indudablemente, el genoma de referencia del sorgo es un recurso valioso para estudiar y utilizar la diversidad genética para el desarrollo de nuevas variedades.

El ensamble de paneles de diversidad para el análisis fenotípico y genético establece un punto de partida para utilizar la diversidad genética de los cultivos (Zhu et al., 2008). Un proyecto de colaboración entre diferentes instituciones de EU estableció el primer panel de diversidad de sorgo (PAS) compuesto por 377 accesiones que representan las líneas y sus progenitores de mayor importancia en los programas de mejoramiento (Casa et al., 2008). El análisis fenotípico de ocho caracteres morfológicos en conjunto con una caracterización molecular basada en 47 marcadores de secuencias simples repetidas clasificó el panel en 10 poblaciones asociadas con las razas de sorgo (Figura 3). Igualmente, determinó que la variación genética y fenotípica presente en el panel es adecuada para estudiar caracteres de importancia económica utilizando el mapeo por asociación.

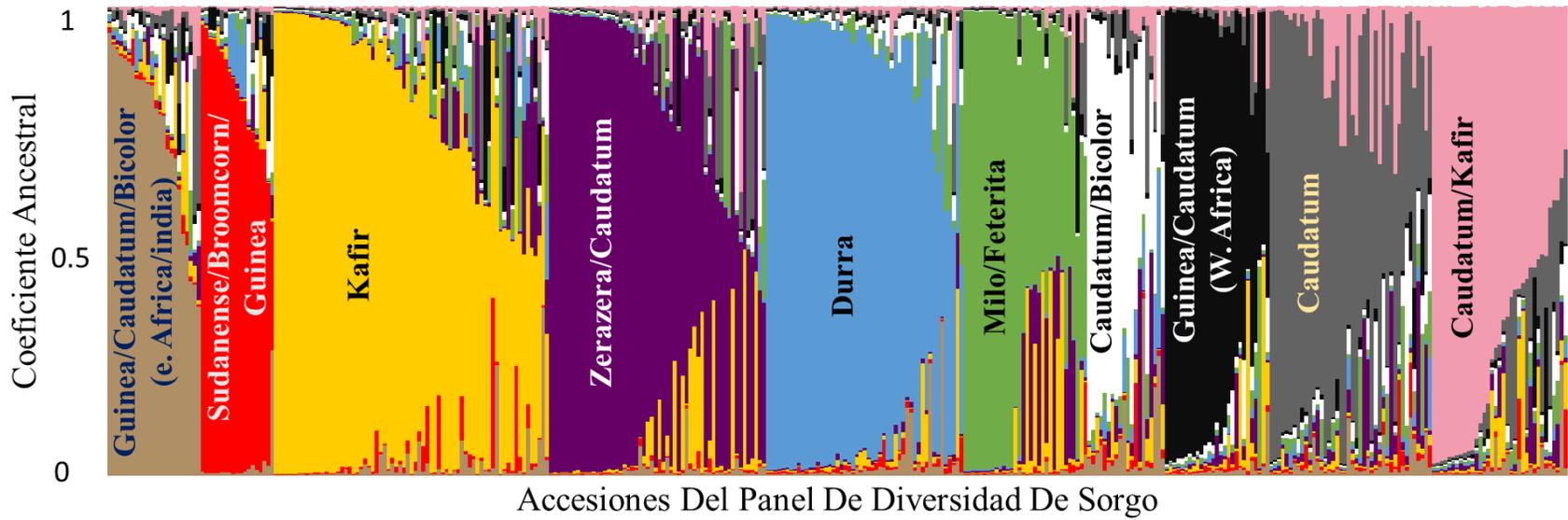


Figura 3 Estratificación poblacional de las 377 líneas presente en el panel diversidad de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] basado en el análisis de 47 marcadores de secuencias simples repetidas utilizando el programa STRUCTURE (Casa et al. 2008).

Recientemente, las 377 líneas del PAS fueron secuenciadas mediante el uso de plataformas de tercera generación resultando en la identificación de más de 250,000 nucleótidos polimórficos (e.g. “SNP”) (Morris et al., 2013b). Al presente, el PAS y su caracterización genética han sido utilizadas para la disección de diferentes caracteres fenotipos de importancia económica como altura de planta (Morris et al., 2013a), tolerancia a sequía (Hayes et al., 2015), componentes de rendimientos (Boyles et al., 2016), pigmentación de semilla (Morris et al., 2013a), concentración de polifenoles (Rhodes et al., 2014), y pudrición del tallo (Adeyanju et al., 2014), entre otros. Indudablemente, la diversidad genética presente en el panel está disponible para programas de mejoramiento y puede ser expandida con la integración de nuevas accesiones presentes en las colecciones de germoplasma.

Las poblaciones biparentales (i.e. mapeo por ligamiento) son de gran utilidad para el estudio de caracteres con herencia multigénica y baja heredabilidad. El limitado número de eventos de recombinación permiten la utilización de pocos marcadores moleculares para identificar regiones genómicas de interés. El mapeo por asociación provee una alta resolución (i.e. genes o regiones genómicas pequeñas) por el alto número de eventos de recombinación pero requiere la utilización de muchos marcadores moleculares. El sistema de mapeo anidado utiliza el poder de detección de poblaciones biparentales y la recombinación histórica presente en paneles de diversidad para la disección genética de caracteres (Yu et al., 2008). Brevemente, líneas genéticamente diversas son cruzadas con una línea parental común seguido por el desarrollo de líneas recombinantes. Un sistema anidado de mapeo fue creado para sorgo utilizando 10 líneas representantes de cada población del panel de diversidad (SC283, SC1103, Segalane, Macia, SC35, Ajabsido, SC971, SC265, SC1345, y P898012), las cuales fueron cruzadas con la línea RTx430 para desarrollar ~2,000 líneas recombinantes (i.e. 200 líneas por cruce) (Yu et al., 2013). No obstante, el cruce y

desarrollo de otras poblaciones de líneas recombinantes es imperativo debido a que las líneas utilizadas en el sistema anidado no contienen toda la diversidad genética del cultivo. Evidentemente, ambos recursos (i.e. el panel de diversidad y el sistema anidado de mapeo) son valiosos para la identificación de marcadores o genes asociados con caracteres de importancia agronómica.

Enfermedades en el sorgo

La alta diversidad de ambientes utilizados para la producción de sorgo ha ocasionado que se vea afectado por múltiples patógenos. Las regiones húmedas del Sur de Estado Unidos, México, Oeste de África y el Caribe favorecen el desarrollo de enfermedades causadas por hongos y bacterias, tales como la roya (*Puccinia sorghi*), antracnosis (*Colletotrichum sublineolum*), pudrición del tallo (*Fusarium* sp.), moho de los granos (>40 hongos), y ergot (*Claviceps* spp.), entre otros (Salvador et al., 2006). La incidencia y efectos de estas enfermedades varían entre regiones, sin embargo, el moho de los granos es una de las más importantes para la producción donde las pérdidas pueden alcanzar un 100% en variedades altamente susceptibles (Thakur et al., 2006).

Moho de los granos

El moho de los granos es una enfermedad que afecta la parte exterior e interior de los granos reduciendo su aceptabilidad para consumo y procesamiento (Rooney y Serna-Saldivar, 1991). La enfermedad es causada por una combinación de más de 40 especies de hongos patogénicos y oportunistas, siendo *Fusarium semitectum* (Berk. & Ravenel), *Curvularia lunata* (Wakk.) Boedijn, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, y *Colletotrichum sublineolum* los más frecuentemente asociados con la enfermedad a nivel mundial (Thakur et al., 2006). Sin embargo, la micoflora varía de acuerdo a la geografía y condiciones climáticas de las regiones. En Puerto Rico, las especies de hongos más predominantes son *F. semitectum*, *F. thapsinum* y *Curvularia lunata* (Erpelding y

Prom, 2006), mientras que en Texas son *Alternaria spp.*, *Bipolaris spp.*, *C. lunata* y *Fusarium spp.* son los más predominantes.

El proceso de infección y colonización de las semillas por *F. thapsinum* y *C. lunata* han sido estudiados detalladamente (Figura 4; Frederiksen 1986). La infección de *F. thapsinum* comienza 5 días después de antesis infectando los lodículos, filamentos o el pedicelo. Subsiguientemente, se mueve al ovario donde los micelios atacan el embrión y endospermo. La enfermedad del moho aparece primeramente en la base del grano y se desplaza hasta cubrir la semilla (dependiendo de la susceptibilidad de la planta). La infección de *C. lunata* comienza en la parte apical de las paredes del ovario hasta colonizar las demás partes de la flor. El apresorio comienza a penetrar el epicarpo 5-10 días después de la antesis, y a los 17 días la infección es completa. En la etapa de masa dura del grano (~27 días después de antesis) el hongo inicia la colonización completa de la parte interna y externa. Al momento de la cosecha (>40 días) los granos están completamente colonizados, hay esporulación, y se puede apreciar los daños internos y externos de las semillas.

Las características de los granos y panículas están asociadas con resistencia a la enfermedad del moho. En los granos, la dureza, ancho y color del pericarpio, pigmentación de la testa, alta concentración de taninos y flavan-4-oles son características asociadas a la respuesta de resistencia a los hongos (Audilakshmi et al., 1999; Glueck y Rooney, 1980; Mukuru 1992; Esele, 1993; Rodríguez-Herrera et al., 1999; Waniska et al., 2001). Igualmente, panículas abiertas con glumas largas, y baja densidad de granos reducen las incidencias de infecciones (Das et al., 2013). Sin embargo, estas características físicas y químicas afectan la calidad y valor nutricional de los granos (Hibberd et al., 1982; Cagampang y Kirleis, 1984). La concentración de taninos afecta el sabor e interfieren con la digestibilidad de proteínas (Chung et al., 1998). Entender la función específica de estas características sobre la respuesta de resistencia es fundamental para su manipulación y

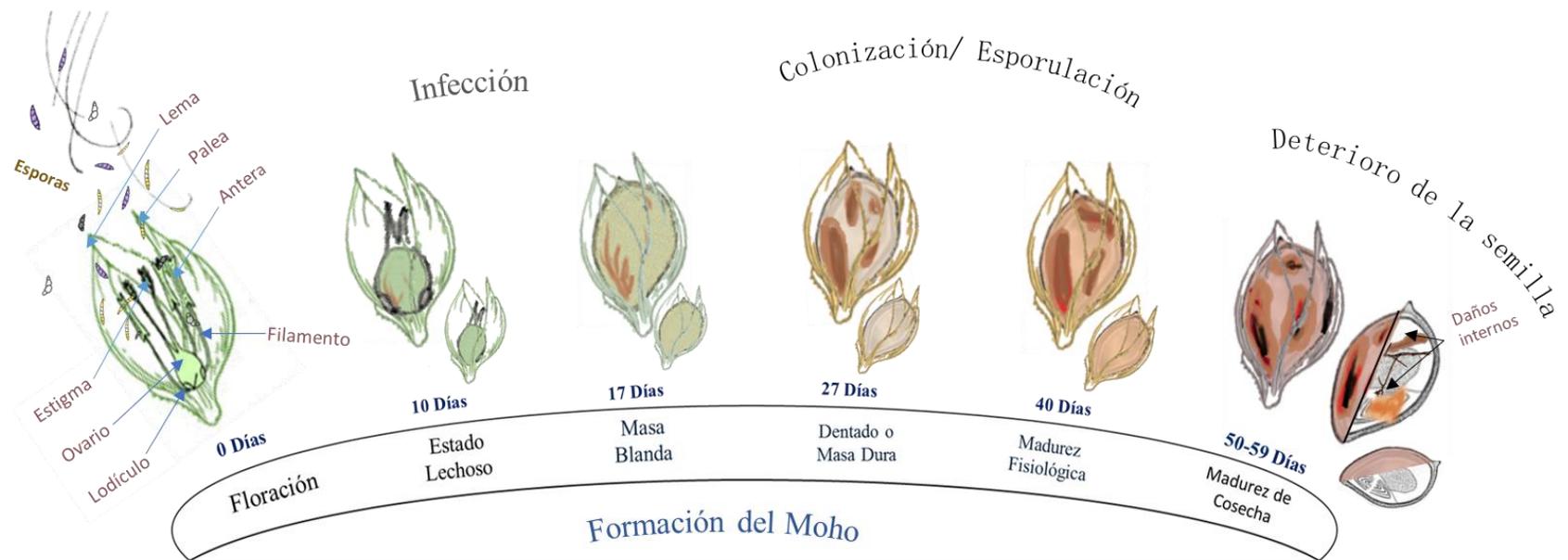


Figura 4 Ciclo de infección para el moho de los granos en sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Los granos pequeños representan el desarrollo normal de la semilla.

control en el desarrollo de nuevos cultivares resistentes.

Herencia de resistencia al moho de los granos

La respuesta de resistencia al moho de los granos está controlada por múltiples genes e influenciada por el ambiente. La compatibilidad genética entre líneas es un factor importante en el desarrollo de variedades resistentes (Dabholkar y Baghel, 1980). Un análisis generacional de medias utilizando fuentes de resistencia con alto contenido de taninos indicó que la respuesta de resistencia tiene una herencia dominante (Murty y House, 1984). Por el contrario, un análisis generacional de media utilizando fuentes de resistencias sin contenido de taninos sugieren la presencia de al menos 10 genes con efectos aditivos, dominantes y epistáticos (Rodríguez-Herrera et al., 2000; Audilakshmi et al., 2005). La evaluación de 125 líneas recombinantes derivadas del cruce entre RTx-430 (susceptible) x Sureño (resistente) asoció cinco regiones genómicas localizadas en los cromosomas 4, 6, 7, 9 y 10 con la resistencia al moho de los granos (Klein et al., 2001). Estas regiones explicaron de entre un 10% (cromosoma 10) y 20.5% (cromosoma 7) de la variación observada. Sin embargo, estas regiones genómicas no son similares a las asociadas con la calidad de los granos en estudios posteriores (Rami et al., 1998; Sukumaran et al., 2012). Igualmente, los genes responsables de la acumulación de proteínas antifungales como la quitinasa, sormatin y PR-10 (asociados con la resistencia al moho de los granos) no están localizados en estas respectivas regiones genómicas (Bueso et al., 2000; Prom et al., 2005; Katilé et al., 2010). La baja heredabilidad y poca disponibilidad de ambientes adecuados para las evaluaciones de resistencia dificulta el enlazar estudios independientes. Los estimados de heredabilidad en sentido amplio y estricto fluctúa entre 0.46 a 0.82, y de 0.39 a 0.59, respectivamente (Rodríguez-Herrera et al., 2000). La elucidación de genes de resistencia y sus respectivos mecanismos moleculares requiere del uso adecuado de ambientes que permitan evaluaciones precisas. Indudablemente, la

identificación de nuevas fuentes de resistencias, desarrollo de poblaciones de mapeo y nuevas variedades resistentes es necesario para estudiar los aspectos moleculares y fisiológicos que confieren una respuesta de resistencia al moho de los granos.

Identificación de fuentes de resistencias

La utilización de variedades resistentes es la forma más viable para el control del moho de los granos. Identificar accesiones resistentes presentes en colecciones de germoplasma es imprescindible para el desarrollo de nuevas variedades. No obstante, el gran tamaño de las colecciones junto con el delimitado número de localidades para evaluaciones (i.e. alto humedad en regiones tropicales) ha impedido la identificación de fuentes de resistencia. Actualmente, un reducido número de accesiones presentes en SNGP han sido adecuadamente evaluadas para resistencia al moho de los granos. La evaluación de 20 accesiones de Uganda (Prom et al., 2011) y 59 de Sudan (Prom y Erpelding 2009) identificó 8 accesiones (PI534117 de Uganda; PI570011, PI570027, PI569992, PI569882, PI571312, PI570759 y PI267548 de Sudan) con resistencia al moho de los granos. Igualmente, la evaluación de 80 accesiones de Burkina Faso y África del Sur (Cuevas et al., 2016) clasificó 8 accesiones de Burkina Faso (PI 586182, PI 586186, PI 647705, PI 647706, PI 647707, PI 647708, PI 647710, and PI 647712) y una de África del Sur (PI 61666) como resistente. En la mini colección de ICRISAT, compuesta por 242 accesiones, se encontraron 50 con posibles niveles de resistencia (Sharma et al., 2010). Ciertamente, múltiples fuentes de resistencia están presente en los bancos de germoplasmas, sin embargo, la mayoría de estas no han sido identificadas, y/o están presentes en accesiones sensitivas al foto-periodo. Por consiguiente, luego de su identificación requieren una adaptación (i.e. conversión) a regiones templadas para su integración en programas de mejoramiento. La identificación de fuentes de resistencia en materiales previamente adaptados a regiones templadas podría resultar en el rápido desarrollo de

nuevas variedades. Actualmente, el PAS es el germoplasma más accesible para los programas de mejoramiento, y punto de partida para la identificación de nuevas fuentes en la colección de SNGP. Por consiguiente, esta investigación está dirigida a evaluar las accesiones del PAS para resistencia al moho de los granos y su posible asociación con la diversidad genética del cultivo.

OBJETIVOS

- 1- Determinar la respuesta de resistencia al moho de los granos en las accesiones presentes en el panel de diversidad de sorgo (panel de asociación de sorgo, PAS).
- 2- Evaluar el efecto de inoculación sobre la respuesta de resistencia al moho de los granos utilizando diferentes hongos patogénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germoplasma

Las 360 accesiones (250 adaptadas a regiones templadas y 110 líneas de mejoramiento) presentes en el PAS fueron evaluadas para resistencia al moho de los granos. El PAS cuenta con un análisis poblacional realizado con 40 marcadores de secuencias simples repetidas (Casa et al., 2008), y una caracterización genotípica por re-secuenciación (Morris et al., 2013) que incluye más de 200,000 SNPs.

Diseño Experimental

La evaluación del PAS se realizó durante dos años consecutivos (2014 y 2015) en las localidades de Isabela y Mayagüez, Puerto Rico. En el 2014, el PAS junto a dos líneas resistentes (SC719 y Sureño) y dos susceptibles (Tx2911 y Tx430) fueron evaluadas en las fincas experimentales de la Estación Experimental de Agricultura Tropical (TARS por sus siglas en inglés) del USDA-ARS en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico (Experimento 1). Y se tomaron datos de humedad relativa y temperatura. La humedad relativa y temperatura promedio fue de 88% y 22.3 °C, en Isabela, y 95.6% y 25.8 °C en Mayagüez (Anexo 2) las cuales fueron adecuadas para la evaluación del moho de los granos. En ambas localidades se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con parcelas de 2 m de largo y una distancia de 0.9 m entre parcelas. Durante la ausencia de lluvias se utilizó riego aéreo una vez por semana.

Las respuestas de resistencias al moho de los granos observado en el PAS durante el Experimento 1 fueron reevaluadas en la finca de USDA-ARS-TARS en Isabela, Puerto Rico en 2015 (Experimento 2). Un total de 50 accesiones (13.8% del PAS), 43 con altos niveles de resistencia y 7 susceptibles, junto con las líneas Sureño (control resistente), RTx2911 y RTx430 (controles

susceptibles), fueron evaluadas en un diseño experimental de bloques completos al azar con 4 repeticiones. Las parcelas fueron de 3 m de largo y una distancia de 0.9 m entre parcela. La humedad relativa y temperatura promedio fueron de 87% y 25.6°C, respectivamente (Anexo 2), y en la ausencia de lluvia se utilizó riego aéreo una vez por semana.

Inoculaciones y evaluación de resistencia a moho de los granos

Las inoculaciones y evaluaciones fueron similares a las descritas por Prom y colaboradores (2011). Los hongos, *C. lunata*, *F. thapsinum*, y *C. semitactum* utilizados en la evaluación fueron previamente aislados e identificados basados en las características morfológicas (Erpelding y Prom, 2006) y nombrados como CL-Isa-1, FT-Isa-1 y CS-Isa-1, respectivamente. Estos aislados fueron cultivados en platos petri con medio sólido de agar papa y dextrosa (PDA) utilizando la mitad de la concentración sugerida por el fabricante (US Pharmacopeial Convention, 2007; Macfaddin, 1985) e incubados a 25 °C de 7 a 14 días. Diariamente para cada aislado, aproximadamente 50 mL de agua fueron vertidos en un plato petri y raspados con una espátula para la extracción de conidias. Luego la solución de las mezclas de conidias fue preparada combinando el aproximado de los 50 mL de cada aislado en una botella de aspersion de 1.9 L, para una concentración final aproximada de 2×10^4 conidias/mL (Prom et al., 2011). Las mezclas de conidias fueron agitadas antes de cada inoculación y las panículas asperjadas durante el proceso de anthesis (~7 días), e inmediatamente cubiertas con bolsas de papel (Lawson 400, Lawson Bag Company, Inc., Northfield, Illinois) para aumentar la humedad relativa. Para el Experimento 1, se asperjaron dos panículas por parcela (accesión) en cada localidad, mientras que para el Experimento 2 se asperjaron de dos a cinco panículas por parcela (accesión).

La respuesta de resistencia al moho de los granos fue determinada en base a la apariencia, peso, y

germinación de las semillas (Prom et al., 2011). Aproximadamente 400 semillas de cada panícula fueron evaluadas visualmente para la severidad del moho de los granos utilizando una escala del 1 al 5 (Isakeit et al., 2008; Figura 5); donde 1 = semillas brillantes sin presencia de hongos, 2= semillas no tan brillantes con un poco de moho en los granos (~1-10% de las semillas), 3= semillas no brillantes y clara presencia de moho en los granos (~11-25% de las semillas), 4= semillas casi completamente cubiertas de moho en los granos (~26-50% de las semillas), y 5= semillas completamente cubiertas de moho y lucen deterioradas (>51% de las semillas) (Isakeit et al., 2008; Figura 5).

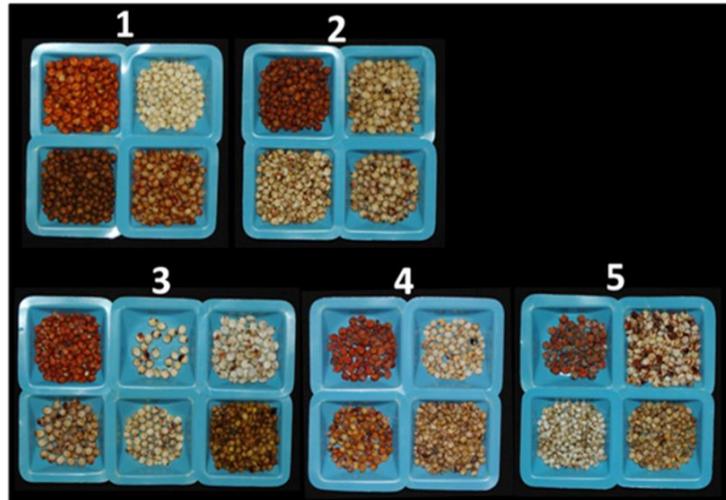


Figura 5 Escala para la evaluación de apariencia de semillas de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] donde 1-2 son resistentes, y 3-5 son susceptibles a los mohos de los granos (Isakeit et al., 2008)

El peso fue basado en 100 semillas aleatoriamente seleccionadas por cada panícula tratada. El porcentaje de germinación se determinó en base al número de semillas que emergieron luego de 10 días de un total de 30 semillas por panícula inoculada en el Experimento 1, y de 50 semillas por panícula inoculada en el Experimento 2. Las semillas de ambos experimentos fueron sembradas en sustrato a base de turba de sphagnum canadiense [ProMix GXT, Premier Tech, Rivière-du-Loup (Québec), Canadá] utilizando bandejas o envases plásticos, y encubadas en el invernadero a temperatura ambiente.

Interacciones entre hongos y fuentes de resistencia

La interacción entre hongos y accesiones se basó en la respuesta de resistencia y/o susceptibilidad observada mediante inoculaciones con cinco diferentes tipos de suspensiones de conidias durante

el Experimento 2. Diariamente, en botellas de aspersión de 1.9 L se prepararon suspensiones independientes de conidias para los aislados CL-Isa-1, FT-Isa-1 y CS-Isa-1, una suspensión compuesta por la mezcla de los tres aislados, y una con agua o control. Las panículas se asperjaron con los cinco diferentes tratamientos durante el proceso de anthesis (~7 días), e inmediatamente fueron cubiertas con bolsas de papel (Lawson 400) para aumentar la humedad relativa. Un total de dos a cinco panículas por parcela fueron asperjadas para cada tratamiento (i.e. ≥ 10 panículas en total). La respuesta de resistencia al moho de los granos fue determinada en base a la apariencia, peso, y germinación de las semillas (Prom et al., 2011) similar a lo descrito anteriormente.

Análisis estadístico

La distribución de la diversidad fenotípica del panel en ambas localidades fue determinada utilizando el procedimiento PROC UNIVARIATE de SAS. El análisis estadístico para el Experimento 1 combinó los datos recolectados en ambas localidades. Primeramente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el procedimiento PROC MIXED con la opción COVTEST del programa SAS (SAS Institute, Cary, NC) utilizando el modelo lineal:

$$Y = \mu + A + L + A*L + \mathcal{E}$$

donde Y es el fenotipo (apariencia, germinación o peso), μ la media poblacional, A corresponde al efecto de las accesiones del PAS, L corresponde al efecto de las localidades (Mayagüez e Isabela), $A*L$ es el efecto de interacción entre las localidades y las accesiones del PAS, y \mathcal{E} es el error experimental. Los efectos de localidades y accesiones fueron considerados fijos. La media de cada accesión fue estimada para cada localidad, y combinada utilizando un análisis de cuadrados esperados. Las accesiones con valores superiores a la media del PAS fueron identificadas utilizando la prueba de Nelson en SAS. Igualmente, para las subpoblaciones del PAS se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el procedimiento PROC MIXED con la opción COVTEST del

programa SAS (SAS Institute, Cary, NC) utilizando el modelo lineal:

$$Y = \mu + SP + L + SP*L + \mathcal{E}$$

donde Y es el fenotipo (apariencia, germinación o peso), μ la media poblacional, SP corresponde al efecto de las subpoblaciones del PAS, L corresponde al efecto de las localidades (Mayagüez e Isabela), $SP*L$ es el efecto de interacción entre las localidades y las subpoblaciones del PAS, y \mathcal{E} es el error experimental. Los efectos de localidades y subpoblaciones fueron considerados fijos. La media de cada subpoblación fue estimada para cada localidad, y combinada utilizando un análisis de cuadrados esperados. La comparación de media entre subpoblaciones se llevó a cabo la prueba de Tuckey.

Para determinar si existían interacciones entre las variables de apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas en PAS se realizó correlaciones de Pearson utilizando los datos de las localidades de Isabela, Mayagüez y la combinación de ambas. Para determinar si las interacciones entre accesiones y localidades se debieron a cambios en la magnitud de las diferencias entre accesiones o en el posicionamiento (orden) de las accesiones, se determinó el coeficiente de correlación Spearman (r_s) entre localidades (Yan y Rajcan, 2003). Cuando el r_s entre localidades fue ≤ 0.5 , se concluyó que la interacción fue mayormente ocasionada por cambios en el posicionamiento de las accesiones. Por el contrario, cuando r_s fue ≥ 0.5 , se concluyó que la interacción fue mayormente ocasionada por cambios en la magnitud de los valores. Para el Experimento 2 se realizó un ANOVA con el procedimiento PROC MIXED con la opción de COVTEST del programa SAS. El modelo lineal para este análisis fue:

$$Y = \mu + B + A + A*B + \mathcal{E}$$

donde Y es el fenotipo (apariencia, germinación o peso), μ la media poblacional, B las repeticiones

(cuatro bloques), A las accesiones del PAS, y ϵ es el error experimental. Los efectos de los bloques fueron considerados aleatorios y el efecto de las accesiones fijos. La media de cada accesión fue estimada con un análisis de cuadrados esperados y accesiones con valores superiores a la media del PAS fueron identificadas utilizando la prueba de Nelson en SAS. La distribución de la diversidad fenotípica fue determinada utilizando el procedimiento PROC UNIVARIATE de SAS.

Identificación de accesiones resistente al moho de los granos

La identificación de fuentes de resistencia al moho de los granos durante Experimento 1 fue basada en el análisis conjunto de localidades para apariencia y germinación de semillas. La variación observada en PAS fue dividida en cuatro categorías basadas en el 95 percentil de la distribución para germinación (accesiones con la mejor germinación) y el 5 percentil de la distribución para apariencia [accesiones con las calificaciones más bajas (resistentes) para moho de los granos]. El valor del 95 percentil fue 92.5% para germinación y el valor del 5 percentil fue 2.25 para apariencia. Consecuentemente, cuatro categorías fueron establecidas: resistentes (germinación > 92.5% y apariencia < 2.25), moderadamente resistente A (germinación > 92.5% y apariencia > 2.25), moderadamente resistente B (germinación < 92.5% y apariencia < 2.25), y susceptibles (germinación < 92.5% y apariencia > 2.25). Debido al limitado número de accesiones en Experimento 2 y que su selección se basó en la resistencia/susceptibilidad observada durante Experimento 1, la variación observada en Experimento 2 fue dividida en cuatro categorías utilizando los cuartiles 75 y 25, para germinación (> 83 %) y apariencia de semilla (< 1.77).

Interacciones entre hongos y fuentes de resistencia

La interacción entre hongos y accesiones resistentes fue determinada evaluando el efecto de los cinco tratamientos sobre la respuesta de resistencia en el Experimento 2. Utilizando el

procedimiento PROC MIXED con la opción COVTEST de SAS se realizó un ANOVA con el modelo lineal:

$$Y = \mu + B + A + T + A*T + \mathcal{E};$$

donde Y es el fenotipo (apariencia, germinación o peso), μ la media, B las repeticiones (cuatro bloques), A las accesiones del PAS, T los tratamientos (CL-Isa-1, FT-Isa-1, CS-Isa-1, mezcla de tres aislados y agua), $A*T$ la interacción entre tratamiento y accesiones, y \mathcal{E} el error experimental. El efecto de los bloques fue considerado aleatorio, mientras que el de las accesiones y tratamientos fueron fijos.

RESULTADOS

Panel de Asociación de Sorgo (PAS)

La resistencia al moho del grano varió entre las 360 accesiones evaluadas del PAS. En total, 341 y 355 accesiones fueron evaluadas en Mayagüez e Isabela, respectivamente, de las cuales 341 se evaluaron en ambas localidades.

El rango de apariencia de semillas fluctuó de 1.0 a 5.0 en ambas localidades (Anexo 1). En Isabela, 22 accesiones (6.2%) tuvieron un rango menor de 2.0 mientras que 218 accesiones (61%) presentaron un rango mayor de 4.0 para un promedio de 3.9. Similarmente, en Mayagüez 33 accesiones (9.7%) tuvieron un rango menor de 2.0 mientras que 215 accesiones (63.2%) presentaron un rango mayor de 4.0 para un promedio de 3.9. Se observó una apariencia promedio de 3.9 en el análisis combinado de ambas localidades (Figura 6). Un total de 16 accesiones (4.4%) exhibieron una apariencia menor de 2.0 mientras que 213 accesiones (59.1%) tuvieron una clasificación de mayor de 4.0. En total, 45 accesiones presentaron una apariencia superior al promedio observado en el PAS; 24 de estas tuvieron una apariencia menor de 2.3, representando el 5% más bajo de la distribución observada.

El porcentaje de germinación entre accesiones varió de 0% a 100% en ambas localidades. En Isabela, el promedio fue mayor (67.9%) al de Mayagüez (52.9%). En Isabela hubo 75 accesiones (21%) con un porcentaje de germinación mayor de 90% comparado con solamente 36 accesiones (10.6%) en Mayagüez. El promedio de germinación de ambas localidades fue de 60.1% con 27 accesiones teniendo una germinación mayor de 90% (Figura 6; Anexo 1). En total, 19 accesiones fueron superiores a la media de PAS representado el 5% más alto de la distribución observada (>92.5%).

El peso de semilla varió de 0.9 a 4.4 g en Isabela y de 0.7 a 4.4 g en Mayagüez. El peso promedio

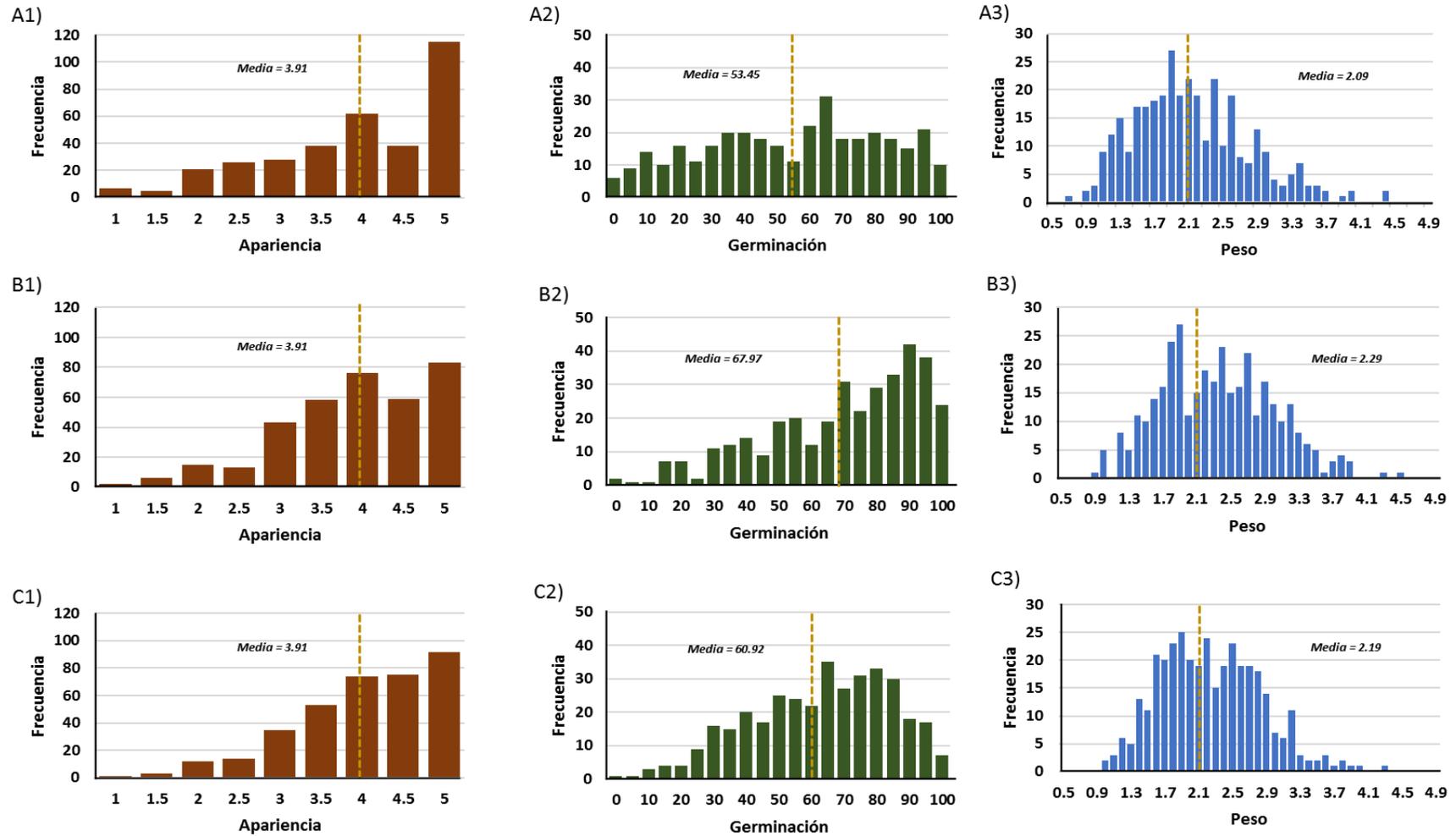


Figura 6 Histogramas de la variación de apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas observadas entre 360 accesiones del panel de asociación de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] evaluado en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014. Letras representan: A) Mayagüez, B) Isabela y C) promedio de ambas localidades, mientras los números indican: 1) apariencia de semillas, 2) porcentaje de germinación y 3) peso de semillas.

en Isabela (2.29 g) fue mayor al observado en Mayagüez (2.09 g) y en el análisis conjunto de ambas localidades (2.19 g). En total 46 tuvieron peso mayor a la media observada en PAS mientras que 50 accesiones tuvieron peso menor. Las accesiones con un peso mayor y menor de 3.19 g y 1.33 g representaron el 5% de los valores más alto y bajo de la distribución observada en PAS (Figura 6; Anexo 2).

Los ANOVA mostraron diferencias entre accesiones e interacción de accesión por localidad para germinación y peso de semilla (Tabla 1). Las accesiones fueron el mayor componente de la suma de cuadrados total para apariencia, germinación y peso de semilla (65%, 54% y 68% del total respectivamente), mientras que la interacción entre accesiones y localidad representó el 22% y 20% de la variación observada para germinación y peso de semilla, respectivamente. Las interacciones de accesión por localidad fueron causadas principalmente por cambios en la posición de las accesiones respecto a la distribución observada en cada localidad. La correlación de la apariencia de semilla entre Isabela y Mayagüez fue de 0.43 ($p < 0.0001$), mientras que para porcentaje de germinación de semillas fue de 0.40 ($p < 0.0001$). Por el contrario, la correlación de peso de semillas entre Isabela y Mayagüez fue de 0.53 ($p < 0.0001$) indicando que la interacción fue principalmente causada por cambios en la magnitud de los valores. La apariencia y porcentaje de germinación de semillas, al igual que el peso y el porcentaje de germinación de semillas estuvieron correlacionados en ambas localidades ($r = -0.51$ y -0.54 en Isabela y Mayagüez, respectivamente, y $r = 0.19$ y 0.12 en Isabela y Mayagüez, respectivamente) (Tabla 2). Similarmente, la apariencia estuvo correlacionada con la germinación ($r = -0.55$) y el peso ($r = 0.17$) en el análisis combinado de localidades. Notablemente, la correlación entre apariencia y porcentaje de germinación fue de magnitud superior en ambas localidades (-0.50) en comparación con las del peso de semilla (Tabla 2).

Tabla 1 Análisis de varianza para apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas para 360 accesiones del panel de asociación de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] evaluadas en Isabela y Mayagüez durante el año 2014.

Fuente de variación	GL	Suma de Cuadrados		
		Apariencia ¹	Germinación ²	Peso ³
Accesión (A)	359	981.592 ***	619256 ***	464.052 ***
Localidad (L)	1	0.233	80640 ***	13.922 ***
A*L	334	371.100 ***	254407 ***	134.422 ***
Residual	667	153.500	182636	74.003

¹ Apariencia basada en el análisis visual de semillas en una escala de 1 (no mohos) a 5 (>50% de semillas con mohos)

² Germinación basado en el porcentaje de 30 semillas que emergieron luego de 7 días

³ Peso total de 100 semillas.

*** refiere a valor de $p < 0.001$.

GL = grados de libertad

Tabla 2 Correlaciones de Pearson entre la apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas observadas entre 360 accesiones del panel de asociación de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] evaluado en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014.

	Isabela		Mayagüez		Isabela-Mayagüez	
	Apariencia ¹	Germinación ²	Apariencia ¹	Germinación ²	Apariencia ¹	Germinación ²
Germinación ²	-0.51 ***		-0.54 ***		-0.55 ***	
Peso ³	0.06	0.19***	0.12 *	0.12 *	0.17 **	0.07

¹ Apariencia basada en el análisis visual de semillas en una escala de 1 (no mohos) a 5 (>50% de semillas con mohos)

² Germinación basado en el porcentaje de 30 semillas que emergieron luego de 7 días

³ Peso total en gramos de 100 semillas.

*, ** y *** refiere a valor de $p < .05$, $.01$ y $.001$, respectivamente.

Subpoblaciones del PAS y la resistencia al moho de los granos

El PAS está subdividido en 10 subpoblaciones basado en el análisis de marcadores moleculares las cuales representan diferentes razas del cultivo e híbridos. El análisis de varianza encontró diferencias entre estas subpoblaciones para apariencia, germinación y peso de semilla (Tabla 3). Igualmente, se encontró interacción entre las subpoblaciones y localidades para las tres características evaluadas siendo la subpoblación Zerazera/Caudatum la más variable entre localidades para apariencia y germinación. La subpoblación Sudanese/Broocorn/Guinea fue la de

mejor apariencia (3.02), mientras que la subpoblación Guinea/Caudatum/Bicolor la de mayor germinación (71.64%). Por el contrario, la subpoblación Milo/Feterita fue inferior para apariencia y porcentaje de germinación (4.4 y 45.4%, respectivamente) (Tabla 4). Las subpoblaciones Sudanese/Broomcorn/Guinea y Guinea-Caudatum-Bicolor fueron las de menor peso de semillas (1.57 y 1.77 g, respectivamente), mientras que Guinea/Caudatum y Caudatum fueron las de mayor peso de semillas (2.50 y 2.49 g, respectivamente).

Tabla 3 Análisis de varianza (ANOVA) para apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas entre las subpoblaciones presentes en el panel de asociación de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] evaluado en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014.

Fuente de variación	GL	Suma de Cuadrados		
		Apariencia ¹	Germinación ²	Peso ³
Subpoblación	9	64.43 ***	21428 ***	23.40 ***
Localidad	1	0.12	36517 ***	6.99 ***
Subpoblación*Localidad	9	20.30 **	1175 *	10.00 **
Residual	649	586.60	397425	269.40

¹ Apariencia basada en el análisis visual de semillas en una escala de 1 (no mohos) a 5 (>50% de semillas con mohos)

² Germinación basado en el porcentaje de 30 semillas que emergieron luego de 7 días

³ Peso total de 100 semillas.

*, ** y *** refiere a diferencias significativas a valores de $p < .05$, $.01$ y $.001$, respectivamente

Tabla 4 Mínimo cuadrado promedio y error estándar para apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas de las subpoblaciones presentes en el panel de asociación de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] evaluado en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014.

Subpoblaciones	N	Apariencia ¹	Germinación ² (%)	Peso ³ (g)
Sudanese/Broomcorn/Guinea	36	3.0 ± 0.2	64.5 ± 4.1	1.67 ± 0.10
Guinea/Caudatum/Bicolor (E.	46	3.5 ± 0.1	71.6 ± 3.6	1.87 ± 0.09
Kafir	129	3.7 ± 0.1	67.1 ± 2.2	2.16 ± 0.06
Caudatum/Bicolor	39	3.8 ± 0.2	67.7 ± 3.9	2.13 ± 0.10
Zerazera/Caudatum	99	3.9 ± 0.1	60.3 ± 2.5	2.43 ± 0.06
Caudatum/Kafir	70	4.0 ± 0.1	62.9 ± 2.9	2.06 ± 0.08
Caudatum	80	4.0 ± 0.1	59.4 ± 2.7	2.49 ± 0.07
Durra	91	4.2 ± 0.1	52.3 ± 2.6	1.96 ± 0.07
Guinea/Caudatum (W. África)	53	4.2 ± 0.1	53.6 ± 3.4	2.50 ± 0.09
Milo/Feterita	52	4.4 ± 0.1	45.4 ± 3.4	2.31 ± 0.09

¹ Apariencia basada en el análisis visual de semillas en una escala de 1 (no mohos) a 5 (>50% de semillas con mohos)

² Germinación basado en el porcentaje de 30 semillas que emergieron luego de 7 días

³ Peso total de 100 semillas.

Fuentes de resistencia a moho de los granos en panel de asociación de sorgo

Un total de 162 accesiones (45%) tuvieron una germinación menor de 60% y una apariencia mayor de 3.0 (Figura 7). La categoría de resistente fue compuesta por 7 accesiones (Acme Broom, SC13, SC15, SC224, SC609, Rox Orange, y Red Amber), mientras que la moderadamente resistente A y B incluyeron 12 y 19 accesiones, respectivamente. Las líneas SC719 y Sureño, previamente consideradas como resistentes, fueron clasificadas como susceptibles en el experimento. SC719 y Sureño tuvieron una germinación de 76.9 % y 63.1%, respectivamente, y una apariencia de 3.5 y 3.8, respectivamente. De igual manera, las líneas susceptibles Tx430 y Tx2911, previamente clasificadas como susceptibles, tuvieron una germinación de 29.0% y 58.2%, al igual que una apariencia de 4.8 y 4.3, respectivamente. La re-evaluación de las accesiones resistentes y moderadamente resistentes ratificó la existencia de fuentes de resistencia en PAS (Figura 8; Tabla 5). Un total de 5 accesiones fueron categorizadas resistentes de las cuales dos (RedAmber y RoxOrange) habían sido igualmente categorizadas en el Experimento 1. Las accesiones Keller y KansasOrange que habían sido categorizadas moderadamente resistente B en Experimento 1 fueron categorizadas resistentes en Experimento 2. La accesión Willey tuvo una clasificación de resistente (1.8 y 85.5%) en el Experimento 2, contrario a la clasificación susceptible observada en el Experimento 1 (2.8 y 18.3%). Un total de 8 accesiones fueron moderadamente resistente B en el Experimento 2, de las cuales 2 (SC13 y SC109) y 3 (SC782, SC605 y Tx2784) habían sido clasificadas como resistentes y moderadamente resistente B, respectivamente, en Experimento 1. Similarmente, las 4 accesiones clasificadas como moderadamente resistente A en Experimento 2, habían sido clasificadas como resistentes (SC15), moderadamente resistente A (SC598 y SC1494) o B (6550 Summac) en el Experimento 1. Un total de 33 accesiones fueron clasificadas como susceptibles en Experimento 2, de las cuales 2 habían sido resistentes, 10 moderadamente

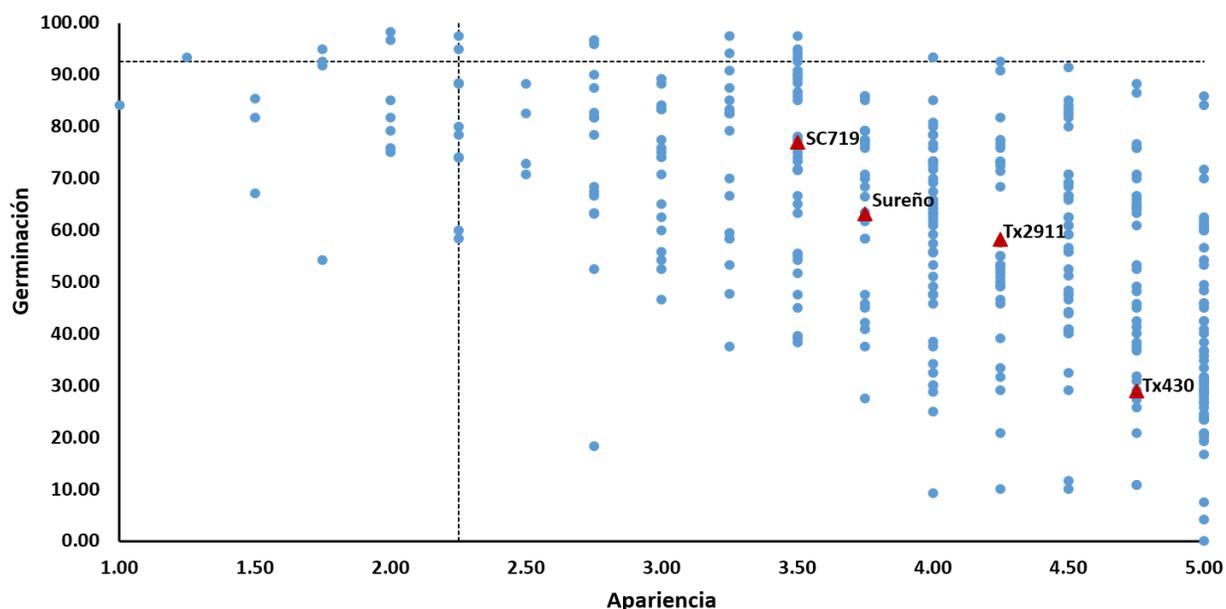


Figura 7 Distribución de la apariencia y germinación de semillas para 360 accesiones del panel de asociación de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] evaluado en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014. Líneas entrecortadas representan el umbral de 5% de la distribución observada para apariencia y germinación de semillas.

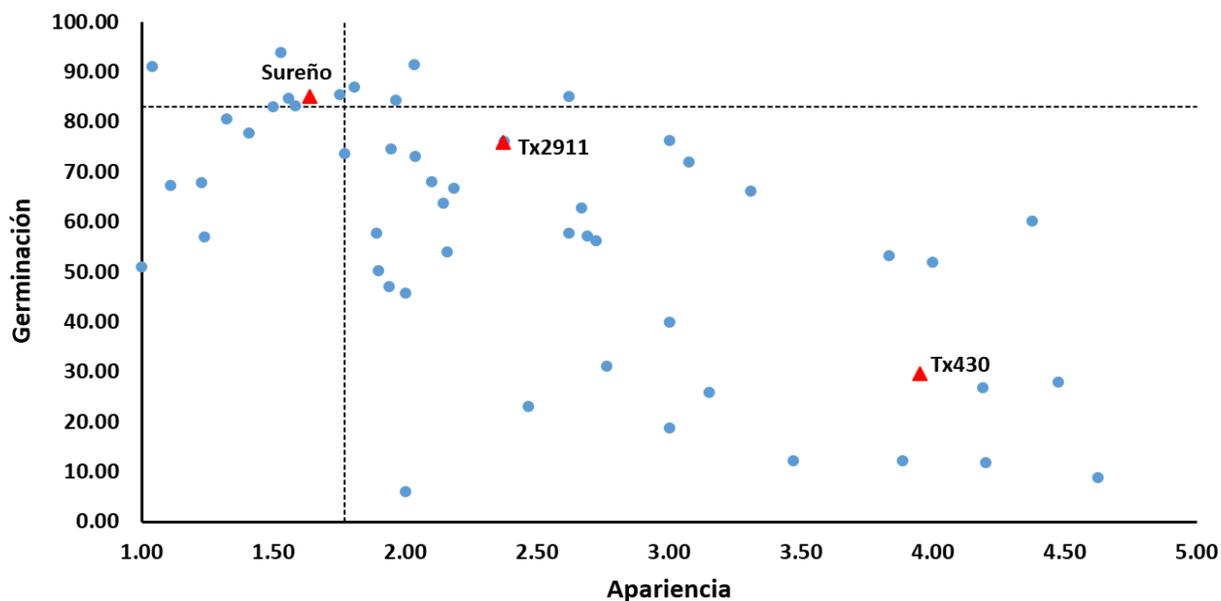


Figura 8 Distribución de la apariencia y germinación de semillas para un subgrupo de 50 accesiones del panel de asociación de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] evaluado en Isabela, Puerto Rico durante el año 2015. Líneas entrecortadas representan el umbral de 25% de la distribución observada para apariencia y germinación de semillas.

Tabla 5 Mínimo cuadrado promedio para porcentaje de germinación y apariencia de semillas para 50 accesiones del panel de diversidad de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] evaluadas en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014 (Experimento 1) y en Isabela, Puerto Rico durante el año 2015 (Experimento 2).

Accesión	Experimento 2			Experimento 1(PAS)		
	Apariencia ¹	Germinación ²	Clasificación ³	Apariencia ¹	Germinación ²	Clasificación ³
RedAmber	1.1	91.0	Res.	2.0	98.3	Res.
RoxOrange	1.6	83.1	Res.	2.0	96.7	Res.
KansasOrange	1.5	93.8	Res.	2.0	85.0	M.Res.-B
Wiley	1.8	85.5	Res.	2.8	18.3	Sucept.
Keller	1.6	84.7	Res.	2.3	88.3	M.Res.-B
SC13	1.5	83.0	M.Res.-B	1.8	95.0	Res.
SC609	1.3	80.5	M.Res.-B	2.3	95.0	Res.
SC309	1.4	77.7	M.Res.-B	3.5	90.8	Sucept.
SC103	1.8	73.6	M.Res.-B	3.5	88.3	Sucept.
SC782	1.2	67.9	M.Res.-B	2.0	81.7	M.Res.-B
SC295	1.1	67.2	M.Res.-B	2.8	87.5	Sucept.
SC605	1.2	57.0	M.Res.-B	1.5	67.0	M.Res.-B
Tx2784	1.0	51.0	M.Res.-B	1.8	54.2	M.Res.-B
SC1494	2.0	91.5	M.Res.-A	4.0	93.3	M.Res.-A
6550Sumac	1.8	87.0	M.Res.-A	1.8	91.7	M.Res.-B
SC598	2.6	85.1	M.Res.-A	2.8	96.7	M.Res.-A
SC15	1.8	84.4	M.Res.-A	1.8	92.5	Res.
SC224	2.2	66.7	Sucept.	2.3	97.5	Res.
Acme_broom	2.1	63.7	Sucept.	1.3	93.3	Res.
SC59	3.0	76.2	Sucept.	3.3	94.2	M.Res.-A
Della	2.0	74.5	Sucept.	3.5	94.2	M.Res.-A
IS8525J	3.1	72.0	Sucept.	3.3	97.5	M.Res.-A
SC695	4.4	60.2	Sucept.	3.5	93.3	M.Res.-A
SC639	2.7	57.2	Sucept.	3.5	95.0	M.Res.-A
SC1203	2.7	56.2	Sucept.	4.3	92.5	M.Res.-A
SC574	3.8	53.2	Sucept.	3.5	97.5	M.Res.-A
PinkKafir	1.9	50.2	Sucept.	4.0	93.3	M.Res.-A
SC1328	2.8	31.2	Sucept.	2.8	95.8	M.Res.-A
SC1321	3.9	12.1	Sucept.	3.5	92.5	M.Res.-A
LianTangAi	1.9	47.0	Sucept.	2.0	75.0	M.Res.-B
Deer_broom	2.0	45.7	Sucept.	1.0	84.2	M.Res.-B
SC623	2.1	68.0	Sucept.	2.0	75.8	M.Res.-B
SC1429	2.4	76.0	Sucept.	2.0	79.2	M.Res.-B
SC60	4.5	27.9	Sucept.	2.3	88.3	M.Res.-B
El_Mota	2.0	73.1	Sucept.	4.3	90.8	Sucept.

Cont.Tabla 5.

SC124	3.3	66.2	Sucept.	3.0	89.2	Sucept.
SC1056	2.67	62.9	Sucept.	4.5	91.4	Sucept.
SC614	1.89	57.7	Sucept.	3.0	88.3	Sucept.
SC603	2.6	57.7	Sucept.	3.3	90.8	Sucept.
Marupantse	2.16	53.9	Sucept.	3.5	90.0	Sucept.
SC144	4.0	52.0	Sucept.	5.0	04.2	Sucept.
SC1330	3.0	40.0	Sucept.	5.0	85.8	Sucept.
SC1155	4.19	26.9	Sucept.	2.8	90.0	Sucept.
90M	3.15	25.8	Sucept.	5.0	07.5	Sucept.
SC855	2.47	23.0	Sucept.	4.0	09.2	Sucept.
SC1124	3.0	18.7	Sucept.	3.3	87.5	Sucept.
SC968	3.47	12.2	Sucept.	4.3	10.0	Sucept.
SC399	4.2	11.8	Sucept.	4.5	10.0	Sucept.
KS115	4.6	08.9	Sucept.	5.0	19.2	Sucept.
SC489	2.0	06.0	Sucept.	4.6	10.8	Sucept.

¹ Apariencia basada en el análisis visual de semillas en una escala de 1 (no mohos) a 5 (>50% de semillas con mohos)

² Germinación basado en el por ciento de 50 semillas que emergieron luego de 7 días

³ Categorías basadas en la distribución fenotípica observada en Experimento 1 y 2 utilizando los umbrales de 5% y 25%, respectivamente. Res = germinación mayor de 92.25% y 84.7%, y apariencia menor de 1.77 y 2.25 en Experimento 1 y 2, respectivamente. M.Res.-A = mayor de 92.25% y 84.7%, y apariencia mayor de 1.77 y 2.25 en Experimento 1 y 2, respectivamente. M.Res.-B = menor de 92.25% y 84.7%, y apariencia menor de 1.77 y 2.25 en Experimento 1 y 2, respectivamente. Sucept: menor de 92.25% y 84.7%, y apariencia mayor de 1.77 y 2.25 en Experimento 1 y 2, respectivamente.

resistente A, 5 moderadamente resistente B, y 16 susceptibles en Experimento 1. En total, 13 líneas mostraron una respuesta de resistencia o resistencia moderada en ambos experimentos (Tabla 6).

Las trece accesiones representan cinco subpoblaciones: Caudatum/Bicolor (Keller y SC1494), Guinea/Caudatum/Bicolor (E. Africa/India) (SC13 y SC15), Kafir (RedAmber, SC609, SC782, KansasOrange y RoxOrange), Milo/Feterita (SC598), Sudanense/Broomcorn/Guinea (SC605 y Tx2784).

Interacción de hongos con accesiones de sorgo

La respuesta de resistencia/susceptibilidad de 40 accesiones del PAS no varió entre las inoculaciones con suspensión de conidias de hongo y agua (control) (Tabla 7). Asimismo, para la apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas no hubo diferencias entre las panículas tratadas con *C. lunata*, *F. thapsinum*, *F. semittactum*, una mezcla de los tres hongos y agua.

Tabla 6 Accesiones, subpoblaciones y sus respectivos coeficientes ancestrales en el panel de diversidad de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] que fueron resistente o moderadamente resiste al moho de los granos en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico durante el año 2014 (Experimento 1) y 2015 (Experimento 2), respectivamente.

Número PI	Accesión	Subpoblación	Coefficiente Ancestral ¹
PI 656090	SC1494	Caudatum/Bicolor	0.774
PI 653617	Keller	Caudatum/Bicolor	0.532
PI 534124	SC15	Guinea/Baudatum/Bicolor (E. Africa/India)	0.919
PI 534123	SC13	Guinea/Caudatum/Bicolor (E. Africa/India)	0.909
PI 641836	RoxOrange	Kafir	0.979
PI 576364	SC782	Kafir	0.899
PI 35038	6550Sumac	Kafir	0.780
PI 576332	SC609	Kafir	0.780
PI 641824	KansasOrange	Kafir	0.707
PI 17548	RedAmber	Kafir	0.485
PI 576337	SC598	Milo/Feterita	0.970
PI 655999	Tx2784	Sudanense/Broomcorn/Guinea	0.949
PI 534096	SC605	Sudanense/Broomcorn/Guinea	0.723

¹ Coeficiente ancestral basado para las 10 subpoblaciones identificadas mediante el análisis de 47 marcadores de secuencias simples repetidas utilizando el programa STRCUTURE (Casa et al., 2008)

Tabla 7 Análisis de varianza para apariencia, porcentaje de germinación y peso de semillas para 40 accesiones del panel de asociación de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] expuestas 5 tratamientos en Isabela, Puerto Rico durante el año 2015. Los tratamientos consistieron en aspersiones durante anthesis con soluciones conteniendo conidias de: 1) *C. lunata*, 2) *F. thapsinum*, 3) *F. semittactum*, 4) mezcla de los tres hongos y 5) agua (control).

Fuente de variación	GL	Suma de Cuadrados		
		Apariencia ¹	Germinación ²	Peso ³
Bloque	3	1.51	5548 *	3.61 ***
Accesión	39	864.41 ***	561859 ***	69.12 ***
Tratamiento	4	2.27	2906	0.947
Accesión*Tratamiento	156	109.86	83415	22.45
Residual	905	632.66	509458	141.002

¹ Apariencia basada en el análisis visual de semillas en una escala de 1 (no mohos) a 5 (>50% de semillas con mohos)

² Germinación basado en el porcentaje de 50 semillas que emergieron luego de 7 días

³ Peso total de 100 semillas.

*, ** y *** refiere a valor de $p < .05$, $.01$ y $.001$, respectivamente.

GL = grados de libertad

DISCUSIÓN

La versatilidad de la planta de sorgo para adaptarse a múltiples condiciones climáticas y ambientales le ha permitido tener una amplia distribución en las diferentes zonas agrícolas del mundo. Consecuentemente, el cultivo enfrenta múltiples plagas de acuerdo a su zona agrícola y convierten al estudio, identificación y caracterización de cultivares resistentes a enfermedades como la herramienta más efectiva y económicamente viable de mantener y aumentar los rendimientos (Forbes et al., 1992). El banco de germoplasma de Estados Unidos contiene más de 40,000 accesiones de sorgo provenientes de más de 41 países, sin embargo, este alto número de accesiones imposibilita su completa evaluación para la identificación de nuevas fuentes de resistencia a enfermedades. El PAS es un conjunto de accesiones que representan gran parte de la diversidad del banco de germoplasma y punto de partida para la identificación de nuevas fuentes de resistencia. Por consiguiente, en esta investigación se evaluaron las accesiones de PAS para resistencia al moho de los granos con el objetivo de poder desarrollar nuevas variedades resistentes.

Panel de Asociación de Sorgo (PAS) y fuentes de resistencia al moho de los granos

La evaluación de panel de asociación de sorgo resultó en la identificación y caracterización de nuevas fuentes de resistencia al moho de los granos. Las accesiones RedAmber y RoxOrange mostraron los niveles más altos y consistentes de resistencia. RedAmber es un cultivar originario de África del Sur, mientras que Rox Orange es una variedad de sorgo dulce proveniente de la colección de Meridian, Mississippi (GRIN Database). Ambas accesiones pertenecen a la subpoblación Kafir con valores de coancestralidad de 0.485 y 0.979, respectivamente (Casa et al., 2008). Ciertamente, no todas las variedades que mostraron niveles altos o moderados de resistencia tienen que ser utilizados en un programa de mejoramiento. Las 13 accesiones resistentes (Tabla 7)

representan 5 subpoblaciones, donde cada una podría tener mecanismos de resistencia diferentes. Por consiguiente, las accesiones RoxOrange (Kafir), Tx2784 (Sudanense/Broomcorn/Guinea), y SC15 (Guinea/Caudatum/Bicolor (E. Africa/India), y SC598 (Milo/Feterita) pueden ser representativas de sus subpoblaciones al tener una membresía coancestral > 0.90 . La línea SC1494 es la más representativa de la subpoblación (Caudatum/Bicolor) con una membresía coancestral de 0.77. Estas líneas podrían ser utilizadas en un programa de mejoramiento con el objetivo de combinar fuentes alternas de resistencia para el desarrollo de nuevas variedades. Estudios anteriores han demostrado que cruzando diferentes fuentes de resistencia es posible obtener individuos con resistencia superiores a los parentales (i.e. segregación transgresiva) (Klein et al., 2001). Otro factor a considerar para el uso de estas líneas en programas de mejoramiento es su resistencia a otras enfermedades (Tabla 8). Nueve de las líneas presentan resistencia a alguna otra enfermedad, mientras que siete tienen resistencia a más de 2 enfermedades. Ciertamente la línea SC13 es muy valiosa para programas de mejoramiento al ser previamente asociada con resistencia a 6 enfermedades.

El bajo porcentaje de accesiones resistente al moho de los granos en PAS (4%) pudiera estar relacionado a factores ambientales durante la evaluación. Únicamente el 43% de las accesiones resistente en el Experimento 1 fueron confirmadas en Experimento 2. La humedad relativa ($>85\%$) y la temperatura ($<28^{\circ}\text{C}$), los factores más significativos en la evaluación para el moho de los granos (Tonapi et al., 2007), no variaron considerablemente entre ambos experimentos. Sin embargo, una alta incidencia del pulgón (áfido) amarillo del sorgo (*Melanaphis sacchari*) fue observada durante el Experimento 2. Estudios anteriores han demostrado que una alta infección del pulgón amarillo tiene un impacto significativo en la calidad del grano de sorgo (Armstrong et al., 2015). El bajo promedio de germinación durante el Experimento 2 (57.7%) pudiera estar

Tabla 8 Respuesta de resistencia a otras enfermedades para las líneas resistente al moho de los granos identificadas en el panel de diversidad de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench].

Accesiones	Ant ¹	MV ²	Roya ³	MGH ⁴	MZH ⁵	PT ⁶
RedAmber	2	S	1	-	-	-
SC605	1	-	2	-	-	-
SC13	1	R	1	R	4 y 1	R
SC609	-	S	-	-	-	-
SC782	1	R	2	-	-	-
KansasOrange	1	-	1	-	-	-
RoxOrange	1	-	1	-	-	-
Keller	-	-	-	-	-	-
SC1494	-	-	-	-	-	-
Tx2784	-	-	-	-	-	-
6550Sumac	1.5	S	3.5	-	-	-
SC598	-	S	-	-	-	-
SC15	-	-	-	-	-	R

¹ Ant.= Antracnosis (*Colletotrichum sublineolum*); escala de 1 (resistente) a 5 (suceptible). GRIN 2017

² MV= Mildiu vellosa (*Peronosclerospora sorghi*); S = suceptible y R = resistente. Rosenow y Frederiksen 1982; GRIN 2017

³ Roya (*Puccinia purpurea*); escala de 1 (resistente) a 5 (suceptible). GRIN 2017

⁴ MGH = Mancha gris de la hoja (*Cercospora fuscimaculans*); S= Suceptible y R= Resistente. GRIN 2017

⁵ MZH = Mancha zonada de la hoja (*Gloeocercospora sorghi*); escala de 1 (resistente) a 5 (suceptible). GRIN 2017

⁶ PT = Pudrición del tallo (*Fusarium* spp.); S= Suceptible y R= Resistente. Adeyanju, A. 2014

relacionado a la susceptibilidad de las accesiones al pulgón amarillo. Por ejemplo, el promedio de germinación de las 16 líneas susceptibles en ambos experimentos fue más bajo en el Experimento 2 (37.3%) que en el Experimento 1 (54.7%) (Tabla 7). Igualmente, el promedio de germinación entre las 13 líneas resistentes fue más bajo en el Experimento 2 (80.0%) en comparación con el Experimento 1 (87.3%). Por el contrario, las líneas que tuvieron una germinación similar en ambos experimentos (Red Amber, 98.3 y 91%; Keller, 88.3 y 84.7%; Tx2784, 54.2 y 51.0%; SC1494, 93.3 y 91.5%; 6550Sumac 91.7 y 87%; y SC1429, 79.2 y 76%) pudieran tener resistencia o tolerancia al áfido. Esto podría ser la causa de que las líneas SC719 y Sureño, consideradas resistentes fueron clasificadas como susceptibles.

Las accesiones clasificadas como resistentes en PAS varían en color de semilla. RoxOrange y KansasOrange tienen el pericarpio de color anaranjado, mientras que RedAmber es de color rojo.

Igualmente, la línea Tx2784 clasificada como resistente no tiene acumulación de taninos (Silva, 2015). Por consiguiente, es posible que estas líneas tengan diferentes mecanismos de resistencia y fuentes de resistencia presentes en la colección de sorgo. Evaluaciones recientes de germoplasma de la colección han identificado diferentes accesiones con resistencia (Cuevas et al., 2016; Prom and Erpelding, 2009; Prom et al., 2011; Ratnadass et al., 2003), sin embargo, estas son foto-periódicas sensitivas y requieren un proceso de conversión (i.e. entrecruces con variedades previamente adaptadas) antes de ser utilizadas en programas de mejoramiento. Ciertamente, el comparar genéticamente y fenotípicamente estas accesiones resistentes con las 13 líneas identificadas en el panel de diversidad ayudaría a determinar si representan nuevas fuentes de resistencia.

Evaluación de germoplasma para resistencia al moho de los granos

La respuesta de resistencia/susceptibilidad utilizando suspensión de conidias no provocó un aumento en la presión patogénica en comparación con las aspersiones con agua. Bandyopadhyay y Mughogho (1988) encontraron que la inoculación y uso de bolsas no era necesario cuando se utiliza irrigación aérea debido a la alta humedad relativa y presencia de esporas en el ambiente. Ciertamente, las condiciones ambientales en Isabela, Puerto Rico durante todo el año (humedad relativa >85%) mantiene unos altos niveles de esporas de hongos que proveen un ambiente idóneo para la evaluación de resistencia al moho de los granos. Futuros experimentos pueden prescindir de las inoculaciones y dirigirse a aumentar el número de accesiones para la evaluación.

Las variables más frecuentemente utilizadas para la evaluación de la respuesta de resistencia son la germinación, apariencia y peso de semillas (Cuevas et al., 2016; Prom y Erpelding, 2009; Prom et al., 2011). Ciertamente, el peso de semilla es disminuido por el moho de los granos y puede ser

utilizado como parámetro de evaluación cuando semillas no infectadas pueden ser producidas en el mismo experimento. En Puerto Rico las condiciones ambientales son ideales para el desarrollo del moho de los granos imposibilitando la producción de semillas no infectadas para comparación, por consiguiente, este carácter no debería ser utilizado en evaluaciones de germoplasma.

El utilizar accesiones resistentes que representan las diferentes subpoblaciones puede ser de gran ayuda para la investigación del moho de los granos. El desarrollo de poblaciones de líneas recombinantes utilizando las líneas RoxOrange, Tx2784, SC15, SC598 y SC1494 ayudaría a estudiar la herencia y delimitar regiones genómicas asociadas con las diferentes respuestas de resistencias. El eventual desarrollo de marcadores moleculares asociados con estas regiones podría ser utilizado en procesos de selección y evaluación en programas de mejoramiento. En adición, la selección asistida con marcadores podría facilitar la combinación de diferentes fuentes de resistencia para el desarrollo de nuevas variedades con una respuesta de resistencia más amplia.

REFERENCIAS

- Adeyanju, A. 2014. Genetic study of resistance to charcoal rot and Fusarium stalk rot diseases of sorghum (Doctoral dissertation, Kansas State University). 1–133.
- Adeyanju, A., C. Little, J. Yu, y T. Tesso. 2015. Genome-Wide Association Study on Resistance to Stalk Rot Diseases in Grain Sorghum. *G3; Genes|Genomes|Genetics* 5(6): 1165–1175. doi: 10.1534/g3.114.016394
- Armstrong, J.S., W.L. Rooney, G.C. Peterson, R.T. Villeneuve, M.J. Brewer, y D. Sekula-Ortiz. 2015. Sugarcane Aphid (Hemiptera: Aphididae): Host range and sorghum resistance including cross-resistance from greenbug sources. *Journal of Economic Entomology* 108(2): 576–582. doi:10.1093/jee/tou065
- Audilakshmi, S., J.W. Stenhouse, T.P. Reddy, y M.V.R. Prasad. 1999. Grain mould resistance and associated characters of sorghum genotypes. *Euphytica* 107(2): 91–103. doi:10.1023/A:1026410913896
- Audilakshmi, S., J.W. Stenhouse, y T.P. Reddy. 2005. Genetic analysis of grain mold resistance in white seed sorghum genotypes. *Euphytica* 145(1): 95–101. doi:10.1007/s10681-005-0534-6
- Axtell, J.D., Kirleis, A.W., Hassen, M.M., Mason, N D'Croz., Mertz, E.T., y Munck, L. (1981). Digestibility of sorghum proteins. *Proceeding National Academy Science* 78(3):1333-1335.
- Boyles, R.E., B.K. Pfeiffer, E.A. Cooper, B.L. Rauh, K.J. Zielinski, M.T. Myers, Z. Brenton, W.L. Rooney, y S. Kresovich. 2016. Genetic dissection of sorghum grain quality traits using diverse and segregating populations. *Theoretical and Applied Genetics*. doi:10.1007/s00122-016-2844-6
- Bueso, F.J., R.D. Waniska, W.L. Rooney, y F.P. Bejosano. 2000. Activity of antifungal proteins against mold in sorghum caryopses in the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3): 810–816. doi: 10.1021/jf9909712
- Cagampang, G. B., y A. W. Kirleis. 1984. Relationship of sorghum grain hardness to selected physical and chemical measurements of grain quality. *Cereal Chemistry Journal* 61(2): 100-105.
- Casa, A.M., G. Pressoir, P.J. Brown, S.E. Mitchell, W.L. Rooney, M.R. Tuinstra, C.D. Franks, y S. Kresovich. 2008. Community resources and strategies for association mapping in sorghum. *Crop Science* 48(1): 30–40. doi: 10.2135/cropsci2007.02.0080
- Childs, K.L., F.R. Miller, M.M. Cordonnier-Pratt, L.H. Pratt, P.W. Morgan, y J.E. Mullet. 1997. The sorghum photoperiod sensitivity gene, Ma3, Encodes a Phytochrome B. *Plant Physiology* 113(2): 611–619. doi:10.1104/pp.113.2.611

- Chung, K.T., T.Y. Wong, C.I. Wei, Y.W. Huang, y Y. Lin. 1998. Tannins and human health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38(6): 421–464. doi: 10.1080/10408699891274273
- Codex Alimentarius Commission. (2011). Discussion paper on mycotoxins in Sorghum. Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX Committee on contaminants in foods' 5th Session held in The Hague, The Netherlands on 21 – 25 March 2011.
- Cuevas, H.E., C. Zhou, H. Tang, P.P. Khadke, S. Das, Y.R. Lin, Z. Ge, T. Clemente, H.D. Upadhyaya, C.T. Hash, y A.H. Paterson. 2016. The evolution of photoperiod-insensitive flowering in sorghum, a genomic model for panicoid grasses. *Molecular Biology and Evolution* 33(9): 2417–2428. doi:10.1093/molbev/msw120
- Dabholkar, A.R., y S.S. Baghel. 1980. Inheritance of resistance to grain mould of sorghum. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding (The)* 40(2):472–476.
- Das, I.K., A. Annapurna, y J.V. Patil. 2013. Effect of panicle characters and plant height on premature seed rot caused by fusarium grain mold in sorghum. *Indian Journal of Plant Protection*. 41(3): 238–243.
- De Wet, J.M.J., Harlan, J.R., Huckabay, J.P. y Lu, M.H. (1966). *Biosystematics of sorghum, a report of progress*. Oklahoma Agricultural Experiment Station Proceedings Series. p 539.
- Erpelding, J.E., y L.K. Prom. 2006. Seed mycoflora for grain mold from natural infection in sorghum germplasm grown at Isabela, Puerto Rico and their association with kernel weight and germination. *Plant Pathology Journal* 5(1): 106–112. doi:10.3923/ppj.2006.106.112
- Esele, J.P. 1993. The association of genes controlling caryopsis traits with grain mold resistance in sorghum. *Phytopathology* 83(5): 490–495. doi: 10.1094/phyto-83-490
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2012. Crops primary equivalent. Retrieved on 12th July 2014 de www.faostat.fao.org.
- Forbes, G.A., R. Bandyopadhyay, y G. Garcia. 1992. A review of sorghum grain mold. p. 253-264. In *Sorghum and Millets Diseases: A Second World Review*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru-502 324, India.
- Frederiksen, R. A., y F. Miller. 1972. Proposal for release and increase: ATx622, BTx622, ATx623, BTx623, ATx624, BTx624. TAES Form 96 D72: Seed Release Committee of the Texas Agricultural Experiment Station, College Station.
- Frederiksen, R. A. 1986. *Compendium of sorghum diseases*. APS Press, St. Paul, MN número páginas American Phytopathological Society in cooperation with Dept. of Plant Pathology and Microbiology, Texas A and M University.
- Glueck, J.A., y L.W. Rooney. 1980. Chemistry and structure of grain in relation to mold resistance. p. 119–140. In *Proceedings of the International Workshop on Sorghum*

- Diseases. Hyderabad, India, 11-15 December 1978. Grain molds. ICRISAT, Patancheru, India.
- Harlan, J.R., y J.M.J.D. Wet. 1972. A simplified classification of cultivated sorghum. *Crop Science* 12(2): 172-176. doi:10.2135/cropsci1972.0011183X001200020005x
- Hart, G.E., K.F. Schertz, Y. Peng, y N.H. Syed. 2001. Genetic mapping of Sorghum bicolor (L.) Moench QTLs that control variation in tillering and other morphological characters. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 103(8): 1232–1242. doi:10.1007/s001220100582
- Hayes, C.M., G.B. Burow, P.J. Brown, C. Thurber, Z. Xin, y J.J. Burke. 2015. Natural variation in synthesis and catabolism genes influences dhurrin content in sorghum. *The Plant Genome* 8(2): 1–9. doi: 10.3835/plantgenome2014.09.0048
- Hibberd, C.A., D.G. Wagner, R.L. Schemm, E.D. Mitchell, R.L. Hintz, y D.E. Weibel. 1982. Nutritive characteristics of different varieties of sorghum and corn grains. *Journal of Animal Science* 55(3): 665–672. doi:10.2527/jas1982.553665x
- Isakeit, T., W. Rooney, S.D. Collins, y L.K. Prom. 2008. Reaction of sorghum hybrids to anthracnose, grain mold and grain weathering in Burleson County, Texas, 2007. *Plant Disease Management Reports* (online). Report 2:fc003. doi.10.1094/pdmr02.
- Jambunathan, R., y V. Subramanian. 1988. Grain quality and utilization of sorghum and pearl millet. In *Biotechnology in Tropical Crop Improvement. Proceedings of the International Biotechnology Workshop, Patancheru, India, 12-15 janvier 1987*, p. 133139. Patancheru, ICRISAT.
- Katilé, S.O., R. Perumal, W.L. Rooney, L.K. Prom, y C.W. Magill. 2010. Expression of pathogenesis-related protein PR-10 in sorghum floral tissues in response to inoculation with *Fusarium thapsinum* and *Curvularia lunata*. *Molecular Plant Pathology* 11(1): 93-103. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00580.x
- Kimber, C.T., J.A. Dahlberg, y S. Kresovich. 2013. The gene pool of *sorghum bicolor* and its improvement. *Genomics of the Saccharinae*: 23–41. doi: 10.1007/978-1-4419-5947-8_2
- Klein, R.R., J.E. Mullet, D.R. Jordan, F.R. Miller, W.L. Rooney, M.A. Menz, C.D. Franks, y P.E. Klein. 2008. The Effect of Tropical Sorghum Conversion and Inbred Development on Genome Diversity as Revealed by High-Resolution Genotyping. *Crop Science* 48(Supplement_1). doi: 10.2135/cropsci2007.06.0319tpg
- Klein, R.R., R. Rodriguez-Herrera, J.A. Schlueter, P.E. Klein, Z.H. Yu, y W.L. Rooney. 2001. Identification of genomic regions that affect grain-mould incidence and other traits of agronomic importance in sorghum. *Theoretical and Applied Genetics* 102(2-3): 307–319. doi:10.1007/s001220051647
- Krausz, J.P., y T. Isakeit. 1998. Sorghum ergot: New disease threat to the sorghum industry. OAKTrust Home. Available at <http://oaktrust.library.tamu.edu/handle/1969.1/87797> (verified 13 March 2017).

- Lin, Y. R., K. F. Schertz, y A. H. Paterson. 1995. Comparative analysis of QTLs affecting plant height and maturity across the Poaceae, in reference to an interspecific sorghum population. *Genetics* 141(1): 391-411.
- Mace, E.S., y D.R. Jordan. 2010. Location of major effect genes in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Theoretical and Applied Genetics* 121(7): 1339–1356.doi:10.1007/s00122-010-1392-8
- Mace, E.S., y D.R. Jordan. 2011. Integrating sorghum whole genome sequence information with a compendium of sorghum QTL studies reveals uneven distribution of QTL and of gene-rich regions with significant implications for crop improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 123(1): 169–191. doi:10.1007/s00122-011-1575-y
- Macfaddin, J. F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Menz, M.A., R.R. Klein, N.C. Unruh, W.L. Rooney, P.E. Klein, y J.E. Mullet. 2004. Genetic diversity of public inbreds of sorghum determined by mapped AFLP and SSR markers. *Crop Science* 44(4): 1236–1244. doi:10.2135/cropsci2004.1236
- Morris, G.P., D.H. Rhodes, Z. Brenton, P. Ramu, V.M. Thayil, S. Deshpande, C.T. Hash, C. Acharya, S.E. Mitchell, E.S. Buckler, J. Yu, y S. Kresovich. 2013a. Dissecting genome-wide association signals for loss-of-function phenotypes in sorghum flavonoid pigmentation traits. *G3: Genes|Genomes|Genetics* 3(11): 2085–2094. doi: 10.1534/g3.113.008417
- Morris, G.P., P. Ramu, S.P. Deshpande, C.T. Hash, T. Shah, H.D. Upadhyaya, O. Riera-Lizarazu, P.J. Brown, C.B. Acharya, S.E. Mitchell, J. Harriman, J.C. Glaubitz, E.S. Buckler, y S. Kresovich. 2013b. Population genomic and genome-wide association studies of agroclimatic traits in sorghum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(2): 453–458.doi: 10.1073/pnas.1215985110
- Mukuru, S.Z. 1992. Breeding for grain mold resistance. p. 273–285. In *Sorghum and millets diseases: a second world review*. ICRISAT, Patancheru, India.
- Murphy, R.L., R.R. Klein, D.T. Morishige, J.A. Brady, W.L. Rooney, F.R. Miller, D.V. Dugas, P.E. Klein, y J.E. Mullet. 2011. Coincident light and clock regulation of pseudoreponse regulator protein 37 (PRR37) controls photoperiodic flowering in sorghum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(39): 16469–16474. doi: 10.1073/pnas.1106212108
- Murty, D.S., y L.R. House. 1984. Components of generation means for resistance to grain mold-causing fungi *Curvularia* and *Fusarium* in sorghum. *Cereal Research Communications* 12(3/4):237–244.
- National Agricultural Statistics Service. (2013). *Crop Production*. USDA. U.S.

- Paterson, A.H., J.E. Bowers, R. Bruggmann, I. Dubchak, J. Grimwood, H. Gundlach, G. Haberer, U. Hellsten, T. Mitros, A. Poliakov, J. Schmutz, M. Spannagl, H. Tang, X. Wang, T. Wicker, A.K. Bharti, J. Chapman, F.A. Feltus, U. Gowik, I.V. Grigoriev, E. Lyons, C.A. Maher, M. Martis, A. Narechania, R.P. Ojilliar, B.W. Penning, A.A. Salamov, Y. Wang, L. Zhang, N.C. Carpita, M. Freeling, A.R. Gingle, C.T. Hash, B. Keller, P. Klein, S. Kresovich, M.C. Mccann, R. Ming, D.G. Peterson, M.-U.-R., D. Ware, P. Westhoff, K.F.X. Mayer, J. Messing, y D.S. Rokhsar. 2009. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457(7229): 551–556. doi:10.1038/nature07723
- Pereira, M., y M. Lee. 1995. Identification of genomic regions affecting plant height in sorghum and maize. *Theoretical and Applied Genetics* 90(3-4): 380–388. doi:10.1007/BF00221980
- Prom, L.K., R.D. Waniska, A.I. Kollo, W.L. Rooney, y F.P. Bejosano. 2005. Role of chitinase and sormatin accumulation in the resistance of sorghum cultivars to grain mold. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(14): 5565–5570. doi:10.1021/jf050367t
- Prom, L.K., T. Isakeit, R. Perumal, J.E. Erpelding, W. Rooney, y C.W. Magill. 2011. Evaluation of the Ugandan sorghum accessions for grain mold and anthracnose resistance. *Crop Protection* 30(5): 566–571. doi:10.1016/j.cropro.2010.12.025
- Prom, L.K., y J.E. Erpelding. 2009. New sources of grain mold resistance among sorghum accessions from Sudan. *Journal of Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10:457-463.
- Rami, J.F., P. Dufour, G. Trouche, G. Fliedel, C. Mestres, F. Davrieux, P. Blanchard, y P. Hamon. 1998. Quantitative trait loci for grain quality, productivity, morphological and agronomical traits in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 97(4): 605–616. doi:10.1007/s001220050936
- Ratnadass, A., D. Butler, P. Marley, R. Bandyopadhyay, D. Hess, y I. Akintayo. 2003. Sorghum head-bugs and grain molds in West and Central Africa: II. Relationships between weather, head-bug and mold damage on sorghum grains. *Crop Protection* 22(6): 853–858. doi:10.1016/S0261-2194(03)00067-X
- Rhodes, D.H., L. Hoffmann, W.L. Rooney, P. Ramu, G.P. Morris, y S. Kresovich. 2014. Genome-wide association study of grain polyphenol concentrations in global sorghum [*Sorghum bicolor*(L.) Moench] Germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(45): 10916–10927. doi: 10.1021/jf503651t
- Rodríguez-Herrera, R., R.D. Waniska, y W.L. Rooney. 1999. Antifungal proteins and grain mold resistance in sorghum with nonpigmented testa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(11): 4802–4806. doi: 10.1021/jf9903814
- Rodriguez-Herrera, R., W. Rooney, D. Rosenow, y R. Frederiksen. 2000. Inheritance of grain mold resistance in grain sorghum without a pigmented testa. *Crop Science* 40(6): 1573–1578. doi:10.2135/cropsci2000.4061573x

- Rooney, L.W. y S.O. Serna-Saldivar. 1991. Sorghum. P. 233-270. In: Handbook of Cereal Science and Tecnology. Marcel Dekker, New York.
- Salvador, Z.H., H.M. Antonio, M.J. Ayala, S.R. Guzmán, B.C. Armando, T.M. Alvarado y C.V. Ruth. 2006. Control de enfermedades. Guía Técnica del Sorgo. p 25.
- Sharma, R., V.P. Rao, H.D. Upadhyaya, V.G. Reddy, y R.P. Thakur. 2010. Resistance to Grain Mold and Downy Mildew in a Mini-Core Collection of Sorghum Germplasm. Plant Disease 94(4): 439–444.doi:10.1094/PDIS-94-4-0439
- Silva, N. 2015. Quantificação de amido e proteínas totais em grãos de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench-Família: Poaceae] visando à alimentação humana.60 f., il. Dissertação (Mestrado em Botânica)—Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- Singh, S.D., y R. Andyopadhyay. 2000. Grain mold. p. 38–40. In Compendium of Sorghum Diseases. 2nd ed. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Stephens, J.C., y R.F. Holland. 1954. Cytoplasmic male-sterility for hybrid sorghum seed production. Agronomy Journal 46(1): 20–23
- Stephens, J.C., F.R. Miller, and D.T. Rosenow. 1967. Conversion of Alien Sorghums to Early Combine Genotypes1. Crop Science 7(4): 396.
doi:10.2135/cropsci1967.0011183x000700040036x
- Sukumaran, S., W. Xiang, S.R. Bean, J.F. Pedersen, S. Kresovich, M.R. Tuinstra, T.T. Tesso, M.T.Hamblin, y J. Yu. 2012. Association mapping for grain quality in a diverse sorghum collection. The Plant Genome Journal 5(3): 126–135.
doi:10.3835/plantgenome2012.07.0016
- Thakur RP, Reddy BVS, Indira S, Rao VP, Navi SS, Yang XB y Ramesh S. 2006. Sorghum grain mold. Information Bulletin No. 72. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Patancheru 502324, Andhra Pradesh, India: 32 pp. ISBN 92-9066-488-6. Order code IBE 072.
- Thurber, C.S., J.M. Ma, R.H. Higgins, y P.J. Brown. 2013. Retrospective genomic analysis of sorghum adaptation to temperate-zone grain production. Genome Biology 14(6). doi: 10.1186/gb-2013-14-6-r68
- Tonapi, V.A., R.R. Mundada, S.S. Navi, R.K. Reddy, R.P. Thakur, R. Bandyopadhyay, S. Varanavasiappan, y N. Seetharama. 2007. Effect of temperature and humidity regimes on grain mold sporulation and seed quality in sorghum (*Sorghum bicolor*(L.) Moench). Archives of Phytopathology and Plant Protection 40(2): 113–127.
doi:10.1080/03235400500355626
- United States Pharmacopeial Convention. 2007. The United States pharmacopeia, 31st ed., Amended Chapters 61, 62, 111. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

- Waniska, R.D., R.T. Venkatesha, A. Chandrashekar, S. Krishnaveni, F.P. Bejosano, J.M. Jeoung, J. Jayaraman, S. Muthukrishnan, y G.H. Liang. 2001. Antifungal proteins and other mechanisms in the control of sorghum stalk rot and grain mold. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10): 4732–4742. doi: 10.1021/jf010007f
- Yu, J., J.B. Holland, M.D. McMullen, and E.S. Buckler. 2008. Genetic Design and Statistical Power of Nested Association Mapping in Maize. *Genetics* 178(1): 539–551. doi: 10.1534/genetics.107.074245
- Yu, J., M.T. Hamblin, y M.R. Tuinstra. 2013. Association Genetics Strategies and Resources. *Genomics of the Saccharinae*: 187–203. doi:10.1007/978-1-4419-5947-8_9
- Zhu, C., M. Gore, E.S. Buckler, y J. Yu. 2008. Status and Prospects of Association Mapping in Plants. *The Plant Genome Journal* 1(1): 15–20. doi: 10.3835/plantgenome2008.02.0089

ANEXOS

Anexo 1 Temperatura, humedad relativa y precipitación promedio de los municipios de Isabela y Mayagüez durante los meses de evaluación del 2014 y 2015.

	Temperatura (°C)			Humedad Relativa (%)		
	Mín.a	Máx.b	Means ± S.D.c	Mín.a	Máx.b	Means ± S.D.c
Isabela						
2014						
Enero	18.64	27.33	22.95 ± 0.64	81	96	89.23 ± 4.91
Febrero	18.73	26.93	22.86 ± 0.43	78	96	89.43 ± 4.77
Marzo	14.12	23.62	19.15 ± 22.11	74	96	88.33 ± 5.98
Abril	19.81	28.75	24.37 ± 0.65	80	94	86.47 ± 4.11
2015						
Abril	19.82	28.52	24.23 ± 0.62	76	95	88.27 ± 4.98
Mayo	20.78	29.5	25.31 ± 0.47	70	94	84.45 ± 5.75
Junio	22.45	30.06	26.19 ± 0.48	78	95	87.30 ± 4.95
Julio	22.82	29.35	26.13 ± 0.70	78	96	86.23 ± 5.01
Agosto	22.71	29.53	26.00 ± 0.69	78	95	88.87 ± 4.01
Mayagüez						
2014						
Abril	19.18	32.09	24.59 ± 0.89	89	100	98.24 ± 02.92
Mayo	20.38	31.94	25.23 ± 0.52	87	100	96.67 ± 04.56
Junio	21.22	32.79	26.32 ± 0.67	-	-	-
Julio	21.27	32.92	26.22 ± 0.67	-	-	-
Agosto	22.13	32.96	26.48 ± 0.95	83	100	92.00 ± 07.71

a Temperatura Mínima.

b Temperatura Máxima.

c Desviación estándar.

Anexo 2 Mínimo cuadrado promedio de apariencia, porciento de germinación y peso de semillas para 360 accesiones del panel de asociación de sorgo evaluado en Isabela y Mayagüez, Puerto Rico en el año 2014.

Accesión	Apariencia ¹	Germinación ² (%)	Peso ³ (g)	Accesión	Apariencia ¹	Germinación ² (%)	Peso ³ (g)
RedAmber	2.01***	90.6**	1.41*	SC987	3.01	69.7	1.42
RoxOrange	2.01***	88.9**	1.70	SC115	3.01	68.1	1.64
SC13	1.68***	88.7*	1.57	SC334	3.01	67.2	2.57
Acme_broom	1.26***	85.6*	1.19***	SC949	3.01	66.4	1.43*
SC15	1.76***	84.7*	1.65	SC1057	3.01	66.4	1.72
SC224	2.26***	89.3**	1.45*	SC701	3.01	63.1	2.77*
SC609	2.26***	87.2*	1.86	SC991	3.01	54.7	1.85
SC598	2.76***	88.9**	1.06***	Soberano	3.01	52.2	2.55
SC1328	2.76***	88.1**	2.53	SC67	3.01	48.1	1.52
SC155	2.50*	88.3	1.91	WaconiaAmber	3.01	44.7	1.47
SC605	1.51***	59.3	1.39*	SC937	3.01	38.9	0.97***
94Q64	1.52***	66.1	2.15	SC498	3.02	49.5	2.48
Greenleaf	1.68***	72.4	1.04***	SC603	3.26	83.1	1.36**
Tx2784	1.76***	46.4	1.24***	SC1124	3.26	79.7	3.17***
6550Sumac	1.76***	83.9	1.37**	SC283	3.26	75.6	2.18
SC782	2.01***	73.9	1.05***	SC1154	3.26	74.7	2.26
SC623	2.01***	68.1	1.39*	SC333	3.26	74.7	2.83**
SC1429	2.01***	71.4	1.99	SC319	3.26	74.7	1.64
LianTangAi	2.01***	67.2	2.06	SC214	3.26	71.4	2.49
KansasOrange	2.01***	77.2	1.37**	SC979	3.26	62.2	3.00***
Tx2785	2.26***	66.2	1.40*	SC720	3.26	58.9	2.16
Sugardrip	2.26***	72.2	1.60	BTx399	3.26	56.4	2.13
SC84	2.26***	50.6	1.52	ShanQuiRed	3.26	51.7	2.55
SC60	2.26***	80.6	2.30	SC659	3.26	50.6	1.53
SC213	2.26***	52.2	1.45*	Sureno	3.26	45.6	2.08
Keller	2.26***	80.6	1.70	SC53	3.26	39.9	1.51
ICSV745	2.26***	66.4	1.80	BTx626	3.26	36.4	1.97
SC621	2.51***	63.1	1.01***	RTx2903	3.26	29.7	1.62
SC562	2.51***	74.7	3.29***	Tx2910	3.35	56.8	1.50
NTemimissa	2.51***	65.1	1.96	SC309	3.51	83.1	1.63
Deer_broom	2.51***	77.2	1.97***	Marupantse	3.51	82.2	3.00***
Wiley	2.76***	10.6	1.45	CSM64	3.51	82.2	2.83
Tx2909	2.76***	55.3	1.48	MR733	3.51	81.4	2.79*
Town	2.76***	44.7	2.47	SC103	3.51	80.6	1.55
SC942	2.76***	55.6	1.44*	BAZ9505	3.51	78.9	1.97*
SC650	2.76***	58.9	2.55	SC1416	3.51	78.1	2.20
SC322	2.76***	60.6	2.26	El_Mota	3.51	78.1	2.03
SC295	2.76***	79.7	1.99	SC58	3.51	70.3	2.43
SC1439	2.76***	70.6	1.4*	SC21	3.51	69.7	1.77
SC1319	2.76***	55.6	2.98***	90EON329	3.51	69.7	2.13
SC1155	2.76***	82.2	1.73	QL3India	3.51	68.8	1.94
SanChiSan	2.76***	75.0	2.51	SC655	3.51	67.2	2.31
Malisor_84_	2.76***	59.7	1.76	SC305	3.51	66.4	1.66
ICSV400	2.76***	73.9	3.43***	SC1212	3.51	65.6	1.55
CE260_13	2.76***	68.9	1.98	SC566	3.51	63.9	2.80*
IS8525J	3.26	89.7**	1.99	SC645	3.51	63.8	1.81
SC574	3.51	89.7**	1.91	CE151_263	3.51	60.6	2.92***
SC639	3.51	87.2*	1.97	SC557	3.51	58.9	1.51
SC59	3.26	86.4*	1.73	SC641	3.51	55.6	2.06
PinkKafir	4.01	85.6*	1.97	SC1103	3.51	47.2	2.74*
SC695	3.51	85.6*	2.89***	SC971	3.51	46.4	2.03
SC1494	4.01	85.6*	2.69	Sepon83	3.51	43.9	2.09
SC1321	3.51	84.7*	3.02***	SC42	3.51	39.7	1.25***
SC1203	4.26	84.7*	1.74	SC970	3.51	31.8	2.36
Della	3.76	83.1*	2.13	SRN40	3.51	31.4	3.47***
BTx378	2.76	71.4	2.28*	SC648	3.51	30.6	1.26***
SC124	3.01	81.4	2.15	SC1465	3.52	36.2	1.40
SC614	3.01	80.6	1.76	SC888	3.52	71.1	2.64
ICSV1089BF	3.01	75.6	2.73	SC170_6_18	3.52	69.5	3.48
Macia	3.01	75.6	2.7	SC624	3.68	77.6	1.25*
SC175	3.01	75.6	2.12	Mota_Maradi	3.68	70.9	2.39
BTx3197	3.01	73.1	1.95	SC1471	3.68	59.6	2.13

Accesión	Apariencia ¹	Germinación ² (%)	Peso ³ (g)
SC672	3.76	78.1	1.84
SC1356	3.76	77.2	2.78*
SC328	3.76	71.4	1.60
SC6	3.76	71.4	1.55
BTx635	3.76	71.4	2.34
SC1201	3.76	71.4	2.20
SC57	3.76	69.7	3.37***
SC441	3.76	69.7	1.67
Pinolero_2	3.76	68.9	2.71
SC64	3.76	68.1	2.37
SC325	3.76	63.1	1.60
SC606	3.76	62.2	1.10***
RTx2917	3.76	60.6	2.10
SC1251	3.76	58.7	2.47
Chiltex	3.76	57.2	2.83
SC303	3.76	55.6	1.18***
SC964	3.76	55.6	2.09
SC373	3.76	54.7	2.03
SC1104	3.76	53.9	1.24***
SC299	3.76	50.6	3.07***
SC748	3.76	50.6	2.65
CombHegari	3.76	39.8	3.15***
SC425	3.76	39.7	2.53
SC424	3.76	38.1	1.69
SC833	3.76	37.2	1.63
SC563	3.76	34.3	2.41
WhiteKafir	3.76	33.1	2.07
SC982	3.76	29.7	3.09***
SC803	3.76	19.7	3.08***
SC564	4.00	30.0	1.89
01MN1589_B	4.01	63.1	2.18
44M	4.01	38.3	2.86
SC418	4.01	56.5	2.55
BTx3042	4.01	77.2	2.15
SC1426	4.01	73.1	2.31
SC184	4.01	72.2	1.9
SC56	4.01	70.6	2.65
SC599	4.01	70.6	1.7
SC525	4.01	68.9	3.00***
SC1218	4.01	68.1	3.62***
SC118	4.01	65.6	2.05
SC121	4.01	65.6	1.6
SC625	4.01	65.6	1.64
Jocoro	4.01	64.7	2.34
N268B	4.01	63.9	2.34
SC1320	4.01	61.4	2.64
SC1108	4.01	59.7	1.17***
SC110	4.01	58.1	2.43
Combine7079	4.01	57.2	1.84
SC637	4.01	57.2	2.13
SC324	4.01	56.4	2.05
SC423	4.01	56.4	2.23
SC610	4.01	55.6	1.74
BTx2928	4.01	55.6	2.46
SC702	4.01	54.7	3.43***
KAT83370	4.01	53.9	2.77*
TexBHKafir	4.01	53.1	2.56
SC757	4.01	51.4	2.60
Segaolane	4.01	49.7	2.58
SC941	4.01	48.1	1.69
SC279	4.01	47.8	2.90***
StdBHKafir	4.01	45.6	2.53
SC1063	4.01	43.3	1.00***
SC798	4.01	39.7	2.51
RTx2907	4.01	39.7	2.23
Tx2911	4.01	38.1	1.28***
Tx2741	4.01	26.4	2.26
SC52	4.01	21.0	1.82

Accesión	Apariencia ¹	Germinación ² (%)	Peso ³ (g)
SC855	4.01	1.4	2.1
SC91	4.02	20.7	2.48
R9189	4.02	69.5	1.98
SC326_7	4.02	57.8	1.65
RTx2783	4.02	54.5	1.26
Dorado	4.02	46.1	2.39
Tx2882	4.02	14.5	1.08
SC1246	4.26	68.9	2.53
Kuyuma	4.26	68.1	1.72
DwfYellMilo	4.26	67.2	2.74**
N290B	4.26	65.6	1.85
BTx641	4.26	65.6	2.59
BOK12	4.26	65.6	2.9***
QL3_Texas	4.26	65.4	2.28
RCV	4.26	64.7	2.36
AR2003	4.26	63.6	0.84***
SC206	4.26	60.6	1.44*
BTx406	4.26	58.9	1.81
SC449	4.26	49.7	1.23***
SC663	4.26	49.7	1.96
RTAM2566	4.26	47.2	1.57
SC1079	4.26	47.2	2.01
SC749	4.26	44.7	1.80
SC1271	4.26	43.9	2.28
SC108	4.26	43.1	1.81
SC467	4.26	42.2	0.93***
N263B	4.26	41.4	1.71
RTX2536	4.26	38.9	2.68
SC984	4.26	38.1	3.30***
SC725	4.26	31.4	2.42
Tx2891	4.26	25.6	1.37**
SC473	4.26	23.9	1.62
SC85	4.26	21.4	1.36**
58M	4.26	13.1	2.04
SC968	4.26	2.2	0.99***
SC1424	4.34	57.6	1.57
CombKafir61	4.34	56.5	2.31
SC382	4.34	37.6	3.22**
SC399	4.35	2.9	1.80
SC910	4.35	44.0	1.46
P850029	4.35	67.4	2.21
Wray	4.35	55.1	2.15
SC1056	4.51	83.6	2.35
RedKafirBaz	4.51	77.2	2.40
SC192	4.51	75.6	1.69
SC1337	4.51	74.7	2.30
SC465	4.51	72.2	2.68
SC49	4.51	63.1	3.08***
SC145	4.51	63.1	1.94
SC301	4.51	61.4	2.92***
Redbine61	4.51	60.6	2.41
SC502	4.51	58.9	2.81**
SC413	4.51	58.1	2.38
SC1080	4.51	54.7	1.99
SC1211	4.51	53.1	2.43
RTx435	4.51	51.4	2.25
SC673	4.51	51.4	2.63
BTxARG_2	4.51	48.1	1.74
SC532	4.51	48.1	2.04
BTx631	4.51	47.2	2.55
SC265	4.51	43.5	1.8
SC572	4.51	40.6	1.84
SC1055	4.51	39.7	2.37
P_722	4.51	39.7	1.23***
SC480	4.51	38.9	1.84
SC420	4.51	36.4	1.80
SC630	4.51	36.4	2.38
SC760	4.51	36.1	2.25

Accesión	Apariencia ¹	Germinación ² (%)	Peso ³ (g)	Accesión	Apariencia ¹	Germinación ² (%)	Peso ³ (g)
BTx623	4.51	33.9	1.92*	SC1014	5.00	52.9	2.76*
SC671	4.51	33.1	1.78	SC1017	5.00	52.2	2.49
RTAM428	4.51	32.8	1.90	SC135	5.00	52.2	2.4
SC805	4.51	32.2	1.71	P898012	5.00	48.9	2.71
SC1047	4.51	32.2	2.3	SC396	5.00	46.4	3.09***
SC704	4.51	24.7	1.61	BTx615	5.00	46.4	2.50
M35_2	4.51	21.4	1.89	SC679	5.00	45.6	1.44*
SC1484	4.51	3.9	1.35**	SC79	5.00	41.8	1.86
Cowley	4.52	74.5	2.36	SC628	5.00	40.6	1.82
SC1451	4.68	55.3	3.81***	Hegari	5.00	38.2	2.56
SC558	4.68	37.4	1.59	RTx433	5.00	38.1	2.18
Rio	4.76	80.6	1.92	Caprock	5.00	38.1	1.84
SC17	4.76	78.8	1.44*	SC348	5.00	35.1	3.59***
SC317	4.76	63.1	1.79	B_KS67	5.00	34.7	1.69
RTX432	4.76	62.2	1.54	N250B	5.00	34.7	1.77
SC1345	4.76	58.9	2.48	BTx642	5.00	34.5	2.74
ICSV401	4.76	58.1	2.15	SC1077	5.00	32.1	1.32*
SC1019	4.76	57.2	2.49	SC587	5.00	29.5	1.64
P9517	4.76	56.4	2.45	SC1476	5.00	27.4	1.34*
SC1085	4.76	56.4	2.85**	SC500	5.00	27.0	1.47
IS3620C	4.76	56.4	1.22***	SC1214	5.00	26.2	2.67
SC627	4.76	55.6	2.61	SC414	5.00	24.0	1.82
BTx2752	4.76	53.9	2.79	SpurFeter	5.00	23.9	3.8***
CS3542	4.76	53.9	2.42	SC734	5.00	23.9	1.55
SC320	4.76	53.1	2.72	Feter_Gish	5.00	23.1	2.95***
SC66	4.76	45.6	2.05	SC1070	5.00	23.1	2.57
SC1489	4.76	44.7	2.29	SC38	5.00	22.8	1.36
Ajabsido	4.76	41.4	2.57	SC1033	5.00	22.5	1.73
SC1074	4.76	40.3	2.66	SC411	5.00	21.8	1.78
SC240	4.76	37.2	1.51	RTx437	5.00	21.1	1.12
SC170	4.76	34.7	2.11***	SC569	5.00	21.1	2.82**
SC199	4.76	33.6	1.83	SC51	5.00	20.6	2.06
SC1158	4.76	32.2	2.09	KS19	5.00	19.7	1.64
SC23	4.76	30.6	2.01	SC25	5.00	16.8	1.22***
60M	4.76	29.7	2.33	SC1076	5.00	16.4	2.03
RTx436	4.76	28.9	2.22	RTx430	5.00	16.0	3.13
80M	4.76	24.0	2.15	SC120	5.00	15.6	1.91
SC708	4.76	23.1	2.37	SC55	5.00	15.6	2.21
RTx431	4.76	21.4	1.54	SC33	5.00	13.1	0.88***
SC35	4.76	20.6	1.41*	RTx434	5.00	12.9	1.9
SC738	4.76	19.6	2.04	KS115	5.00	11.4	4.19***
SC63	4.76	18.1	2.84**	88V1081	5.00	11.1	1.84
SC929	4.76	13.1	1.42*	SC391	5.00	11.1	2.32
SC489	4.76	3.1	1.07***	SC22	5.00	8.3	1.42
K887	4.76	3.1	1.67	RTX2737	5.00	4.5	1.8
SC1330	5.00	78.1	3.00***	SC706	5.00	1.1	1.96
SC223	5.00	76.4	2.59	100M	5.00	0.0	1.7
SC1038	5.00	63.9	2.13	90M	5.00	0.0	1.67
SC323	5.00	63.1	2.47	SC144	5.00	0.0	1.75
EarlyHegari	5.00	61.4	2.51				
Plainsman	5.00	53.1	2.49				

¹ Apariencia basada en el análisis visual de semillas en una escala de 1 (no mohos) a 5 (>50% de semillas con mohos)

² Germinación basado en el por ciento de 30 semillas q emergieron luego de 7 días

³ Peso total de 100 semillas.

*, ** y *** refiere a diferencias significativas de la media de la población con valor de p < .05, .01 y .001, respectivamente