



CIENCIA DE LOS PASTOS Y OTROS CULTIVOS

CUBAN JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE

Sitio de la revista: <https://cjascience.com> Cu-ID: <https://cu-id.com/1996/v59e13>



IDENTIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE LA REGIÓN DEL ESPACIADOR INTERNO TRANSCRITO DEL ADN_r EN *CENCHRUS PURPUREUS* (POACEAE)

IDENTIFICATION OF A FRAGMENT OF THE INTERNAL TRANSCRIBED SPACER REGION OF rDNA IN *CENCHRUS PURPUREUS* (POACEAE)

¹A.R. HERNÁNDEZ MONTESINOS*, ²MARÍA E. RECIO², ³MÓNICA CARVAJAL-YEPES²,
¹J. ARANGO², ²DAYMARA RODRÍGUEZ ALFONSO³,
¹DAYLENI FORTES GONZÁLEZ¹, ¹R.S. HERRERA GARCÍA¹

¹Instituto de Ciencia Animal, C. Central, km 47 ½, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Centro Internacional de Agricultura Tropical, km 17, Recta, Cali-Palmira, C.P.763537, Valle del Cauca, Colombia.

³Universidad Agraria de La Habana, A. Nacional, km 23 ½, San José de las Lajas, C.P. 32700, Mayabeque, Cuba.

*Email: andresraulhm@gmail.com

La región del espaciador interno transcrito (ITS), es fácil de amplificar por sus numerosas copias presentes en el genoma vegetal, pero no se reportan investigaciones de esta región en la especie forrajera *Cenchrus purpureus*. El presente estudio tuvo como objetivo identificar mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) un fragmento de la región ITS del ADN ribosomal del núcleo en *C. purpureus* mediante los cebadores ITS1/ITS4 y compararlo con dos muestras de *Urochloa* spp. En el estudio molecular se emplearon muestras de ADN de 62 accesiones de *C. purpureus* del banco de germoplasma de pastos y forrajes, pertenecientes al Instituto de Ciencia Animal y dos muestras de accesiones de *Urochloa* spp. del Programa de Recursos Genéticos de la Alianza de Bioversity International y el Centro Internacional de Agricultura Tropical. El ADN de las 62 accesiones de *C. purpureus* y muestras de *Urochloa* spp., amplificaron con los cebadores ITS1/ITS4. Los productos de amplificación revelaron una banda polimórfica nítida en los geles para cada accesión y tamaño aproximado de 1000 pb en *C. purpureus* y 850 pb en *Urochloa* spp. Los cebadores determinaron diferencias en las amplificaciones entre las muestras de *C. purpureus* y *Urochloa* spp. aunque no demostraron variabilidad entre accesiones de la misma especie. Estos marcadores moleculares se pueden utilizar para comprobar la amplificación, mediante PCR, de muestras de ADN de *C. purpureus* y en la diferenciación de especies en géneros de Poaceae.

The internal transcribed spacer (ITS) region is easy to amplify due to its numerous copies present in the plant genome, but there in not researchers of this region in the forage species *Cenchrus purpureus*. This study aimed to identify by Polymerase Chain Reaction (PCR) a fragment of the ITS region of the ribosomal DNA of the nucleus in *C. purpureus* using the primers ITS1/ITS4 and compare it with two samples of *Urochloa* spp. The molecular study used DNA samples from 62 *C. purpureus* accessions from the grass and forage germplasm bank belonging to Instituto de Ciencia Animal and two samples of *Urochloa* spp. accessions from the Genetic Resources Program of the Alliance of International Bioversity and the International Center for Tropical Agriculture. The DNA from the 62 *C. purpureus* accessions and *Urochloa* spp. controls were amplified with ITS1/ITS4 primers. The amplification products revealed a clear polymorphic band in the gels for each accesión and an approximate size of 1000 bp in *C. purpureus* and 850 bp in *Urochloa* spp. The primers determined differences in amplifications between samples of *C. purpureus* and *Urochloa* spp. although they did not show variability between accessions of the same species. These molecular markers can be used to verify PCR amplification of *C. purpureus* DNA samples and to differentiate species in Poaceae genera.

Palabras clave: forraje, genoma, ITS, marcador molecular, PCR

Key words: forage, genome, ITS, molecular marker, PCR

Recibido: 05 de enero de 2025

Aceptado: 30 de abril de 2025

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Declaración de contribución de autoría CRediT: A. R. Hernández Montesinos: Conceptualización, Visualización, Investigación, Redacción-borrador original. María E. Recio, Mónica Carvajal Yepes, J. Arango: Investigación, Supervisión, Redacción-borrador original. Daymara Rodríguez Alfonso: Investigación. Dayleni Fortes González, R. Herrera García: Investigación, Redacción-borrador original.



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



Introducción

Cenchrus purpureus (Schumach.) Morrone con anterioridad *Pennisetum purpureum*, es una de las gramíneas forrajeras más relevantes en sistemas ganaderos tropicales y se destaca su empleo en la alimentación de rumiantes mediante el corte o pastoreo. Además, se reportan otros usos como planta ornamental y medicinal, en la industria se emplea su fibra para la fabricación de papel y como biocombustible (Nguyen et al. 2021, Tan et al. 2022, Wessapak et al. 2023 y POWO 2025).

En el Instituto de Ciencia Animal (ICA) de la República de Cuba, se conservan accesiones de *C. purpureus* desarrolladas mediante el programa de mejoramiento genético de este género orientado a incrementar la producción de biomasa, calidad nutricional y tolerancia a estreses abióticos como la salinidad y sequía (Herrera 2022, Fortes et al. 2023 y Álvarez et al. 2024). Esta colección se evaluó en cuanto a producción de forraje y respuesta al pastoreo mediante indicadores morfológicos y de calidad (Herrera et al. 2019) y marcadores moleculares como las isoenzimas, la Secuencia Simple Repetida (SSR) y regiones entre secuencias simples repetidas (ISSR) (Cruz et al. 1993, González y Martínez 2019 y Álvarez 2021).

Los marcadores moleculares son herramientas fundamentales para caracterizar la diversidad genética, optimizar la conservación de germoplasma y diseñar estrategias de selección asistida (Özbek 2024). En la actualidad existen cebadores específicos para estudiar la diversidad genética en plantas como son los marcadores de código de barras de ADN vegetal *rbcL* y *matK* los cuales se emplean en estudios filogenéticos en plantas con flores y coníferas (de Vere et al. 2012 y Jones et al. 2021). Sin embargo, existen otros marcadores obtenidos de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosomal nuclearse, que destacan por su utilidad en la identificación de diferentes niveles evolutivos como son los hongos, bacterias y plantas, en este último resalta su empleo en estudios filogenéticos a nivel de género y especie debido a su alta tasa de sustitución nucleotídica y amplia disponibilidad en bases de datos (Alaklabi 2021).

En Poaceae, esta región ha esclarecido relaciones taxonómicas en géneros como *Sorghum* (Sun et al. 1994), *Urochloa* (González y Morton 2005), *Chloris* (Liao et al. 2020), *Phalaris* (Al Rahbawi et al. 2021) y la especie *Cenchrus americanus* (L.) Morrone (Almutairi 2021). Sin embargo, no se informan estudios, en la literatura consultada,

donde se utilicen los cebadores ITS en *C. purpureus*, lo cual limita su información genómica, lo que a su vez restringe su aplicación en estudios filogenéticos y de diversidad intraespecífica, y su manejo en programas de mejoramiento genético.

En Cuba, los estudios mediante marcadores moleculares en *C. purpureus* son escasos y se han centrado en marcadores tradicionales, limitando la comprensión de su diversidad genómica. Por ello, este estudio tuvo el objetivo de identificar un fragmento de la región ITS utilizando los cebadores universales ITS1/ITS4 en *C. purpureus* y contribuir al conocimiento genético-molecular para futuros análisis filogenéticos y de selección asistida.

Materiales y Métodos

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de ADN, perteneciente al edificio de Semillas del Futuro, en la Alianza de Bioversity International y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Valle del Cauca, Colombia.

Material vegetal: las muestras en estudio se obtuvieron de 62 accesiones de *C. purpureus*, con similar edad de rebrote y condiciones de cultivo, conservadas en del banco de germoplasma de pastos y forrajes, perteneciente al Centro Experimental de Pastos y Forrajes Miguel Sistachs Naya del Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, ubicado en los 22° 53' LN y los 82° 02' LO a 80 m.s.n.m. Adicionalmente, se incluyeron dos muestras de *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster - CIAT 606 y *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C. M. Evrard) Crins - CIAT 6713 del Programa de Recursos Genéticos de la Alianza de Bioversity International y el Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia.

Extracción y amplificaciones del ADN: para la extracción del ADN genómico se utilizó el método MATAB (Risterucci et al. 2000) modificado. La amplificación del ADN se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la combinación de cebadores directo e inverso ITS1/ITS4 descritos por White et al. 1990 (tabla 1).

La mezcla para la PCR se realizó en un volumen final de 12 µL, utilizando 4 µL de buffer 2X Promega (GoTaq® Green Master Mix), 0,2 µL de ITS1 e ITS4, con una concentración final 0,2 µM en cada cebador y 6,6 µL de agua ultrapura (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Catalog number: 10977015-Invitrogen) y 1 µL de ADN genómico con una concentración de 10 ng.

Tabla 1. Lista de cebadores y sus secuencias empleadas en el estudio

Cebador	Dirección	Secuencia 5'----- 3'	Fuente
ITS1	Directo	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'	(White et al. 1990)
ITS4	Inverso	3'TCCTCCGCTTATTGATATGC5'	

La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus Gradient Thermal Cyclers Cole-Parmer® USA. La reacción de PCR se llevó a cabo siguiendo un programa de aproximadamente 2 horas de duración. El perfil térmico consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos compuestos por: desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 45 segundos. Finalmente, se realizó una extensión final a 72 °C durante 10 minutos para completar la síntesis de los fragmentos amplificados.

Separación de los productos de PCR: los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % preparado con GelRed™ (Biotium) como agente intercalante. La corrida se realizó en tampón TBE 0.5X a 100 V durante aproximadamente 2 horas. Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder, INVITROGEN®.

Visualización de los productos de PCR: la visualización y análisis de los fragmentos amplificados de ADN se realizó mediante fotografía, con el Fotodocumentador BIO-RAD ChemiDoc MP Imaging System Universal Hood III, USA.

Resultados y Discusión

El ADN de las 62 accesiones de *C. purpureus* y las muestras de *U. decumbens* y *U. ruziziensis*, amplificaron con los cebadores ITS1/ITS4. Los productos de amplificación revelaron, en la mayoría de las muestras, una banda polimórfica nítida en los geles. Sin embargo, en algunos casos se pudo observar amplificación de bandas dobles en las accesiones 6, 28, 31, 42, 47, 49, 51, 52, 59 y 61 así como bandas débiles en las accesiones 29, 30, 46, 50 y 53 o difusas

en las accesiones 5, 17, 32, 40, 47 y 49. Los fragmentos amplificados presentaron un tamaño aproximado de 850 pb en *Urochloa* spp y 1000 pb en las accesiones de *C. purpureus* (figura 1).

Las diferencias moleculares, entre especies y géneros, que se halló en el presente estudio están de acuerdo con Ghosh *et al.* (2017), los cuales afirman que los ITS se consideran como fuente útil de caracteres para la identificación de diferentes grupos de plantas Angiospermas, ya que generan importantes polimorfismos dentro de la misma entidad taxonómica, en particular para género y especie. Además, la región ITS no es codificante de aminoácidos y por lo tanto están sujetas a elevada variabilidad, debido a su naturaleza ubicua, rápida evolución, se encuentran altamente representadas en el genoma y se pueden amplificar con cantidades mínimas de ADN.

La amplificación de 1000 y 850 pb de los cebadores ITS en *C. purpureus* y *Urochloa* spp. respectivamente, difieren a lo referido por Baldwin *et al.* (1995) los cuales plantearon que la región ITS es pequeña y uniforme en las plantas con flores y su longitud total se encuentra entre 600 a 700 bp. Por el contrario, Liston *et al.* (1996), describen longitudes menores de esta región para las Angiospermas se encuentran entre 565 y 700 bp, en contraste, la región de los ITS de gimnospermas es considerablemente más larga y tiene un mayor rango de variación que va desde 750 hasta 3125 bp.

Los estudios de la región ITS en las especies *C. purpureus*, *U. decumbens* y *U. ruziziensis* son escasos. Sin embargo, Chen *et al.* (2010) en una investigación en 15 especies del género *Cenchrus* de zonas como Fujian, Jiangsu y Hainan en China, reportaron amplificación de 573 a 586 pb para los híbridos de *C. purpureus* x *C. americanus*.

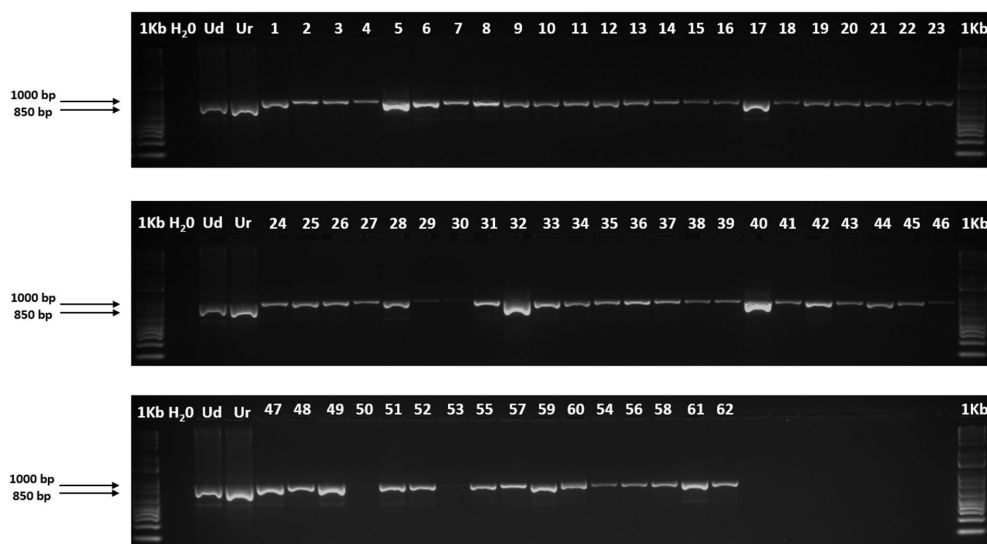


Figura 1. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5 % de los productos de PCR con la amplificación de las 62 accesiones de *C. purpureus* con los cebadores ITS1/ITS4, y muestras de *U. decumbens* - CIAT 606 (Ud) y *U. ruziziensis* - CIAT 6713 (Ur)

Además, en la especie *C. americanus* $2n=2x=14$ cromosomas y genoma AA, genéticamente homóloga a *C. purpureus* $2n=4x=28$ cromosomas y genoma A'A'BB, Almutairi (2021) halló una longitud de 772 a 774 pb para la amplificación de la región ITS, en un estudio de seis cultivares locales de millo perla de Arabia Saudí y su semejanza con 31 accesiones de India y Francia.

Por otra parte, en un estudio filogenético molecular en 22 especies del género *Urochloa* se determinó que la amplificación de la región ITS varió de 582 pb en *U. decumbens*, a 587 pb en *Urochloa eruciformis* (Sm.) Nelson & Fern. Casas, *Urochloa xantholeuca* (Hack. ex Schinz) H. Scholz, *U. ruzizensis*, y *Urochloa mosambicensis* (Hack.) Dandy (González y Morton 2005). Los resultados en cuanto a número de pares de bases en *C. purpureus* y en *Urochloa* spp. se pueden explicar según lo informado por Baldwin et al. (1995), los cuales expusieron que se calcula aproximadamente 300 bp por cada espaciador ITS, pero dependiendo de la familia de plantas, ITS 1 puede ser mayor o menor y potencialmente más informativo. Por lo que, Bult y Zimmer (1993) indicaron que los espaciadores ITS son más variables en comparación con las regiones codificadoras que están conservadas en el genoma.

La variabilidad en la amplificación de la región ITS en las Angiospermas, en comparación con los resultados obtenidos en *C. purpureus* y en *Urochloa* spp., se puede observar en otras especies de Poaceae como el estudio realizado por Hsiao et al. (1995) en 26 especies de gramíneas. En la investigación los autores hallaron que la región ITS varió de 585 a 602 bp entre las tribus Oryzeae, Aveneae, Brachypodieae, Bromaeae, Meliceae, Poeae, Stipeae y Triticeae.

Además, Hsiao et al. (1998) continuaron el estudio y ampliaron la muestra a 200 especies de gramíneas. Los resultados del trabajo revelaron variaciones de 584 a 633 pb para la región ITS en seis subfamilias Bambusoideae, Pooideae, Arundinoideae, Centothecoideae, Chloridoideae y Panicoideae. En ambas investigaciones se evidenciaron las diferencias de esta región en Poaceae y confirmaron el carácter ubicuo en el genoma vegetal.

Los marcadores ITS tienen herencia bi-paterna, lo que permite revelar casos de hibridación y poliploidía en géneros y especies de Poaceae (Wang et al. 2022). Sin embargo, en *C. purpureus* y en *Urochloa* spp los cebadores ITS1/ITS4 no presentaron bandas polimórficas lo que no permitió determinar con claridad la diversidad genética entre accesiones de la misma entidad taxonómica. Además, no se pudo observar diferencias en cuanto a los híbridos de *C. purpureus* x *C. americanus* que están presentes en el germoplasma en estudio. Estos resultados se pueden deber a que es necesario la inclusión de otros pares de iniciadores que complementen a los utilizados o la secuenciación del genoma, como indicaron Hsiao et al. (1998) los cuales observaron

que la utilización de diferentes combinaciones de iniciadores (ITS1/ITS4, ITS1/ITS2 e ITS3/ITS4), permitieron determinar la variabilidad del ADN ribosómico nuclear entre las especies de Poaceae.

Esto contradice los resultados de Ahmadi et al. (2022), los cuales plantearon que los marcadores ITS pueden utilizarse como herramienta de evaluación más adecuada para analizar las relaciones interespecíficas e intraespecíficas en el momento de distinguir diferentes genotipos, ya que los cambios nucleotídicos disminuyen en la medida que avanza la evolución, de modo que solo se producen unos pocos cambios en los nucleótidos. En este sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que los ITS son más efectivos para identificar variabilidad entre especies de diferentes géneros y no son eficientes para determinar diferencias genéticas entre accesiones de la misma especie.

Los productos de amplificación de *C. purpureus* revelaron, en algunos casos presencia de bandas dobles, débiles o difusas. González (2002) y Nadeem et al. (2018), refieren que estas características en la amplificación de los patrones de bandas se pudieron deber a la composición del gel y el buffer, así como las condiciones de voltaje e intensidad de corriente. Además, de que algunos de los cebadores utilizados pueden tener más de una región de hibridación en el ADN genómico de las muestras estudiadas, la existencia de intrones en las subunidades del ADNr, y la técnica de amplificación o la amplificación de ADN procedente de alguna contaminación externa. Por lo que es necesario comprobar la influencia de estos factores en la amplificación de los cebadores ITS en ensayos posteriores.

Conclusiones

Se concluye que los cebadores ITS1/ITS4 son eficaces para amplificar el ADN de accesiones de *C. purpureus* y *Urochloa* spp., demostrando su utilidad como herramienta para evaluar la calidad del ADN extraído y su capacidad de amplificación mediante PCR. Sin embargo, estos cebadores no poseen la resolución suficiente para distinguir diferencias genéticas entre accesiones de ambas especies dentro del fragmento de la región ITS analizado.

Aunque los marcadores ITS pueden utilizarse para verificar la amplificación de muestras de *C. purpureus* y para la diferenciación general entre especies del género en la familia Poaceae, se recomienda complementar estos análisis con técnicas de secuenciación para lograr una caracterización genética más precisa.

La información generada en este estudio amplía el conocimiento genético-molecular de *C. purpureus* y crea las condiciones iniciales para futuros estudios filogenéticos en el género *Cenchrus*, así como para la aplicación de estrategias de selección asistida en programas de mejoramiento y conservación de su germoplasma.

Agradecimientos

A la Beca Carbon Sequestration de la Alianza de Bioversity International y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) por los fondos para realizar la investigación. A los colegas de Forrajes Tropicales y del Laboratorio de ADN por el apoyo durante la estancia de investigación. Adicionalmente, los autores agradecen al Laboratorio de Sanidad de Germoplasma del CIAT por facilitar los cebadores utilizados en este trabajo.

Referencias

- Ahmadi, H., Solouki, M., Fazeli-Nasab, B., Heidari, F. & Sayyed, R.Z. 2022. Internal transcribed spacer (ITS) regions: A powerful tool for analysis of the diversity of wheat genotypes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 60(2): 137-143, ISSN: 0975-1009. <http://op.niscair.res.in/index.php/IJEB/article/view/34886>.
- Al Rahbawi, S.M., Al-Edhari, A.H. & Sardar, A.S. 2021. Phylogenetic Study of the Genus *Phalaris* L. (Poaceae) based on Nuclear Internal Transcript Region (ITS) in Iraq. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25(3): 8278-8281, ISSN: 2067-8282. <http://annalsofscb.ro/index.php/journal/article/view/2368>.
- Alaklabi, A. 2021. *Ficus* Species Genetic Diversity Based on Internal Transcribed Spacer (ITS) Region Analysis. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, H. Botany*, 12(1): 21-27, ISSN: 2090-3820. <https://doi.org/10.21608/eajbsh.2021.148134>.
- Almutairi, Z.M. 2021. Molecular identification and phylogenetics of local pearl millet cultivars using internal-transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 19(4): 339-346, ISSN: 1479-2621. <https://doi.org/10.1017/S1479262121000393>.
- Álvarez Báez, Y. 2021. Comportamiento productivo de nuevas variedades de *Cenchrus purpureus* en el Valle del Cauto, Cuba. Tesis de Doctorado. Universidad de Granma. Cuba. p. 99.
- Álvarez, Y., Herrera, R.S., Ramírez, J.L., Verdecia, D.M., Benítez, D. & López, S. 2024. Performance of *Cenchrus purpureus* varieties tolerant to salinity under the edaphoclimatic conditions of Granma province, Cuba. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 58: e01, ISSN: 2079-3480. <https://cu-id.com/1996/v58e01>.
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. & Donoghue, M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82(2): 247-277, ISSN: 2162-4372. <https://www.jstor.org/stable/2399880>.
- Bult, C. & Zimmer, E. 1993. Nuclear ribosomal RNA sequences for inferring tribal relationships within Onagraceae. *Systematic Botany*, 18(1): 48-63, ISSN: 1548-2324. <https://www.jstor.org/stable/2419787>.
- Chen, Z.T., Huang, Q.L., Pan, W.B. & Huang, Y.B. 2010. Sequence analysis of the rDNA ITS region of *Pennisetum* species (Poaceae). *Acta Prataculturae Sinica*, 19(4): 135, ISSN: 1004-5759. <http://cyxb.magtech.com.cn/EN/Y2010/V19/I4/135>.
- Cruz, R., Sosa, A., Herrera, R.S. & Martínez, R.O. 1993. Identificación electroforética de *Pennisetum purpureum* cv. King grass. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 27(2): 219-223, ISSN: 2079-3480. <https://cjascience.com/index.php/CJAS>.
- de Vere, N., Rich, T.C.G., Ford, C.R., Trinder, S.A., Long, C., Moore, C.W., Satterthwaite, D., Davies, H., Allainguillaume, J., Ronca, S., Tatarinova, T. Garbett, H., Walker, K. & Wilkinson, M.J. 2012. DNA Barcoding the Native Flowering Plants and Conifers of Wales. *PLoS ONE*, 7(6): e37945, ISSN: 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037945>.
- Fortes, D., Herrera, R.S. & Herrera, M. 2023. Morphoagronomic performance of *Cenchrus purpureus* new clones. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 57: 8, ISSN: 2079-3480. <https://cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/1105>.
- Ghosh, J. S., Bhattacharya, S. & Pal, A. 2017. Molecular phylogeny of 21 tropical bamboo species reconstructed by integrating non-coding internal transcribed spacer (ITS1 and 2) sequences and their consensus secondary structure. *Genetica*, 145(3): 319-333, ISSN: 1573-6857. <https://doi.org/10.1007/s10709-017-9967-9>.
- González, A.C. 2002. Detección del polimorfismo genético mediante marcadores bioquímicos en plantas. En: Marcadores moleculares: nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Cornide, M. T. (Coord.). Ed. Félix Varela, La Habana, Cuba. pp. 36-63. ISBN: 959-258-351-X.
- González, A.T. & Morton, C.M. 2005. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(1): 36-44, ISSN: 1095-9513. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.06.003>.
- González, C. & Martínez, R.O. 2019. Genetic characterization of clones and varieties of *Cenchrus purpureus* with microsatellite markers. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 53(3): 307-318, ISSN: 2079-3480. <https://cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/914>.
- Herrera, R., García, M. & Cruz, A.M. 2019. Study of morphoagronomic indicators of *Cenchrus purpureus* clones for biomass production. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 53(2): 189-196, ISSN: 2079-3480. <https://cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/886>.

- Herrera, R.S. 2022. Evaluation of *Cenchrus purpureus* varieties tolerant to drought in the western region of Cuba. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 56(2): 135-143, ISSN: 2079-3480. <https://cjas.science.com/index.php/CJAS/article/view/1049>.
- Hsiao, C., Chatterton, N. J., Asay, K. H. & Jensen, K. B. 1995. Molecular phylogeny of the Poaceae (Poaceae) based on nuclear rDNA (ITS) sequences. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 389-398, ISSN: 1432-2242. <https://doi.org/10.1007/BF00221981>.
- Hsiao, C., Jacobs, S.W.L., Chatterton, N.J. & Asay, K.H. 1998. A molecular phylogeny of the grass family (Poaceae) based on the sequences of nuclear ribosomal DNA (ITS). *Australian Systematic Botany*, 11(6): 667-688, ISSN: 1446-5701. <https://doi.org/10.1071/SB97012>.
- Jones, L., Twyford, A.D., Ford, C.R., Rich, T.C., Davies, H., Forrest, L.L., Hart, M.L., McHaffie, H., Brown, M.R., Hollingsworth, P.M. & De Vere, N. 2021. Barcode UK: A complete DNA barcoding resource for the flowering plants and conifers of the United Kingdom. *Molecular Ecology Resources*, 21(6): 2050-2062. ISSN: 1755-0998. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13388>.
- Liao, H.C., Ming-Hui, C. & Chih-Hui, C. 2020. Barcode of nuclear ribosomal internal transcribed spacer regions (ITS) as a useful tool to recognize a newly naturalized and potentially invasive weed, *Chloris pilosa* Schumacher. (Poaceae), in Taiwan. *Taiwania*, 65(2): 129, ISSN: 0372-333X. <https://doi.org/10.6165/tai.2020.65.129>.
- Liston, A., Robinson, W.A., Oliphant, J.M. & Álvarez-Buylla, E.R. 1996. Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers of non-flowering seed plants. *Systematic Botany*, 21(2): 109-120, ISSN: 1548-2324. <https://doi.org/10.2307/2419742>.
- Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G. & Baloch, F.S. 2018. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2): 261-285, ISSN: 1310-2818. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>.
- Nguyen, B.T., Le, L.B., Pham, L.P., Nguyen, H.T., Tran, T.D. & Van Thai, N. 2021. The effects of biochar on the biomass yield of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schumacher) and properties of acidic soils. *Industrial Crops and Products*, 161: 113224, ISSN: 1872-633X. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113224>.
- Özbek, Ö. 2024. Molecular Markers Used to Reveal Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships in Crop Plants. *OBM Genetics*, 8(4): 1-25, ISSN: 2577-5790. <https://doi.org/10.21926/obm.genet.2404274>.
- POWO. 2025. Plants of the World Online. Kew Royal Botanic Gardens. Available at: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77106033-1>. [Consulted: January 03, 2025].
- Risterucci, A., Grivet, L., N'Goran, Pieretti, J., Flament, M. & Lanaud, C. 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 948-955, ISSN: 0040-5752. <https://doi.org/10.1007/s001220051566>.
- Sun, Y., Skinner, D.Z., Liang, G.H. & Hulbert, S.H. 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 26-32, ISSN: 1432-2242. <https://doi.org/10.1007/BF00226978>.
- Tan, F., He, L., Zhu, Q., Wang, Y., Chen, C. & He, M. 2022. *Pennisetum hybridum*: a potential energy crop with multiple functions and the current status in China. *BioEnergy Research*, 15: 850-862, ISSN: 1939-1242. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10263-7>.
- Wang, J., Yan, Z., Zhong, P., Shen, Z., Yang, G. & Ma, L. 2022. Screening of universal DNA barcodes for identifying grass species of Gramineae. *Frontiers in Plant Science*, 13: 998863, ISSN: 1664-462X. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.998863>.
- Wessapak, P., Ngernsaengsaruy, C. & Duangjai, S. 2023. A taxonomic revision of *Cenchrus* L. (Poaceae) in Thailand, with lectotypification of *Pennisetum macrostachyum* Benth. *PhytoKeys*, 234: 1-33, ISSN: 1314-2003. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.234.106486>.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky & T. White (eds.). Academic Press, INC. San Diego California. pp. 315-322. ISBN: 0-12-372181-4.