



EVALUACIÓN DE CEBADORES ASGR p779/p780 EN LA DETERMINACIÓN DE LA APOMIXIS APOSPÓRICA EN *CENCHRUS PURPUREUS*

EVALUATION OF ASGR p779/p780 PRIMERS IN THE DETERMINATION OF APOSPORIC APOMIXIS IN *CENCHRUS PURPUREUS*

¹A. R. HERNÁNDEZ MONTESINOS*, ²MARÍA E. RECIO, ³MÓNICA CARVAJAL-YEPES, ²J. ARANGO, ³DAYMARA RODRÍGUEZ ALFONSO, ³DAYLENI FORTES GONZÁLEZ, ¹R. S. HERRERA GARCÍA

¹Instituto de Ciencia Animal, C. Central, km 47 ½, San José de las Lajas, C.P. 32700, 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

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los marcadores moleculares ASGR p779/p780, específicos para apomixis apospórica, en la determinación del tipo de reproducción en accesiones de *Cenchrus purpureus*. El estudio se desarrolló en la Alianza de Bioersity International y el Centro Internacional de Agricultura Tropical. Las muestras en estudio provienen de 62 accesiones de *C. purpureus* del Banco de germoplasma de pastos y forrajes del Instituto de Ciencia Animal. Se determinó el tipo de reproducción de las accesiones mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con la combinación de cebadores directo e inverso p779/p780 completamente ligados a la apomixis apospórica. No se obtuvo amplificación del ADN de las accesiones de *C. purpureus* y los controles *Urochloa* spp. negativos a la apomixis apospórica. Sin embargo, se obtuvo amplificación del ADN de los controles positivos a la apomixis apospórica en las accesiones de *Urochloa* spp. reportadas como apomicticas. Los productos de amplificación revelaron una banda polimórfica nítida en los geles con un tamaño aproximado de 950 pares de bases. Los cebadores p779/p780 amplificaron las accesiones de *Urochloa* positivas a la apomixis, pero no amplificaron los controles negativos ni las accesiones de *C. purpureus*. Estos resultados sugieren que (I) o las 62 accesiones de *C. purpureus* del ICA se reproducen de forma sexual y no presentan apomixis apospórica, o que (II) los cebadores no son específicos para esta especie.

The objective of this study was to evaluate the molecular markers ASGR p779/p780, specific for aposporic apomixis, in the determination of the type of reproduction in accessions of *Cenchrus purpureus*. The study was conducted at the Alliance of Bioersity International and the International Center for Tropical Agriculture. The samples under study come from 62 accessions of *C. purpureus* from the Germplasm Bank of Grasses and Forages of Instituto de Ciencia Animal. The type of reproduction of the accessions was determined by Polymerase Chain Reaction (PCR) with the combination of direct and reverse primers p779/p780 completely linked to the aposporic apomixis. It was not obtained DNA amplification from the *C. purpureus* accessions and the *Urochloa* spp. controls that were negative for aposporic apomixis. However, DNA amplification was obtained from positive controls to aposporic apomixis in *Urochloa* spp. accessions reported as apomictic. The amplification products revealed a well-defined polymorphic band on the gels with an approximate size of 950 base pairs. The p779/p780 primers amplified the apomixis-positive *Urochloa* accessions, but did not amplify the negative controls or the *C. purpureus* accessions. These results suggest that (I) or the 62 accessions of *C. purpureus* from ICA reproduce sexually and do not exhibit aposporic apomixis, or that (II) the primers are not specific to this species.

Palabras clave: ADN, marcador molecular, PCR, reproducción, *Urochloa*

Key words: DNA, molecular marker, PCR, reproduction, *Urochloa*

Recibido: 20 de julio de 2025

Aceptado: 22 de septiembre de 2025

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

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



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

La especie *Cenchrus purpureus* (Schumacher) Morrone es nativa del África Tropical. Es un geófito perenne o rizomatoso y crece principalmente en el bioma tropical estacionalmente seco. Se utiliza como alimento para animales y en la medicina; tiene usos ambientales y sociales, y se usa como combustible (POWO 2025). En *C. purpureus* se encuentran dos tipos de reproducción: sexual (por semillas) y asexual (por esquejes vegetativos) (Wessapak et al. 2023).

La apomixis es el fenómeno de reproducción clonal por semilla y ocurre de forma natural en más de 400 especies vegetales (Xu et al. 2022). En el género *Cenchrus* se estima que al menos ocho especies presentan apomixis, aunque la exactitud numérica varía debido a la complejidad biológica del fenómeno y a la presencia de modos reproductivos facultativos (combinación de apomixis y sexualidad) en varias especies (Kumar et al. 2019).

Los estudios de identificación de la apomixis en *C. purpureus*, se realizaron por Hanna (1981) y González y Hanna (1984) para lo cual emplearon marcadores morfológicos y determinaron en todos los casos la forma de reproducción sexual en accesiones de *C. purpureus* e híbridos de *C. purpureus* x *Cenchrus americanus* (L.) Morrone. Sin embargo, la información genética sobre la presencia de las regiones genómicas que intervienen en este modo de reproducción no se ha descrito en *C. purpureus*.

Entre los marcadores moleculares vinculados al modo de reproducción en especies apomíticas en Poaceae, se encuentra el ASGR (apospory-specific genomic region, por sus siglas en inglés) p779/p780 específicos para apomixis apospórica. Desarrollados por Akiyama et al. (2011), a partir de secuencias de los exones cuatro y siete del gen ASGR-BBM-like2 de *Pennisetum squamulatum* (L.) syn. *Cenchrus squamulatus* (Fresen.) Morrone y que amplifica una región que incluye tres intrones de 950, 266 y 154 pares de bases (pb).

Los cebadores ASGR p779/p780 se utilizaron para determinar el modo de reproducción de accesiones de *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs y cuatro especies de *Urochloa* (*Urochloa brizantha* (A. Rich.) R. D. Webster, *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster, *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga y *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C. M. Evrard) Crins) del Programa de Recursos Genéticos de la Alianza de Bioversity International y el Centro Internacional de

Agricultura Tropical (Alianza), en Colombia (Worthington et al. 2016 y Worthington et al. 2019).

Son escasos, en la literatura disponible, los estudios en los cuales se utilizan los cebadores p779/p780 en *C. purpureus*. Con la finalidad de aportar información sobre las características genéticas y reproductivas que contribuyan a los programas de mejoramiento genético de *C. purpureus*, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar los marcadores moleculares ASGR p779/p780, específicos para apomixis apospórica, en la determinación del tipo de reproducción en accesiones de *C. purpureus* de la colección del Instituto de Ciencia Animal (ICA).

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 (Alianza), 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.

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 p779/p780 descritos por Worthington et al. (2016) (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), con una concentración final de 0.66X, 0.12 µL de p779 y p780, con una concentración final 0.2 µM en cada cebador y 6.76 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. Como controles se utilizaron muestras de ADN de accesiones de *Urochloa*, con reproducción apomítica y sexual, del Programa de Recursos Genéticos de la Alianza de Bioversity International y el Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia (tabla 2).

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

Cebador	Dirección	Secuencia 5'---- 3'	Fuente
p779	Directo	5'TATGTACGACAAGAATATG'3	(Worthington et al. 2016)
p780	Inverso	3'TGTAACCATAACTCTCAGCT'5	

Tabla 2. Descripción de los controles apomícticos y sexuales utilizados en el estudio

Especie	Accesión	Tipo de reproducción	Control	Denominación
<i>U. decumbens</i>	CIAT 606	Apomíctica	Positivo	(C+)
<i>U. ruziziensis</i>	CIAT 6713	Sexual	Negativo	(C-)
<i>U. ruziziensis</i>	CIAT 26168	Sexual	Negativo	(D-)
<i>U. brizantha</i>	CIAT 16338	Apomíctica	Positivo	(E+)
<i>U. ruziziensis</i>	CIAT 26295	Sexual	Negativo	(F-)
<i>U. brizantha</i>	CIAT 16776	Apomíctica	Positivo	(G+)
<i>U. brizantha</i>	CIAT 16447	Apomíctica	Positivo	(H+)

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 94 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos compuestos por: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 52 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 60 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

Los resultados evidenciaron que el ADN de las 62 accesiones de *C. purpureus* y los controles negativos a la apomixis apospórica de *U. ruziziensis*, no amplificaron con los cebadores ASGR p779/p780. Sin embargo, se obtuvo amplificación del ADN de los controles positivos a la apomixis en las accesiones de *U. decumbens* y *U. brizantha*. Los productos de amplificación revelaron una banda polimórfica nítida en los geles para las accesiones apomícticas. Los fragmentos amplificados presentaron un tamaño aproximado de 950 pb (figura 1).

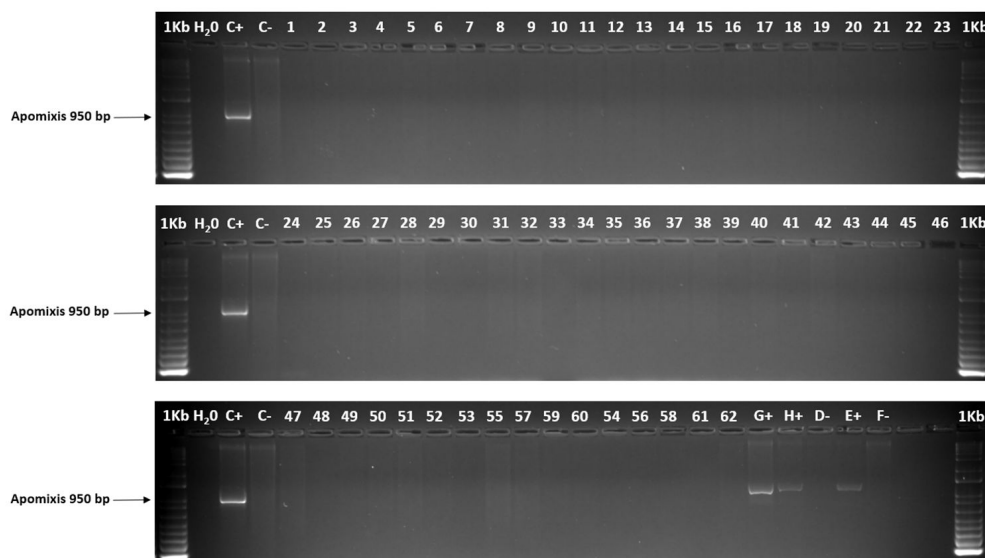


Figura 1. Productos de PCR con la amplificación de los controles de *Urochloa* spp. positivos a apomixis apospórica y las 62 muestras de *C. purpureus* sin amplificación con los cebadores ASGR p779/p780. Controles *U. decumbens* (C+), *U. ruziziensis* (C-) (D-) (F-), *U. brizantha* (E+) (G+) (H+)

Según Cook *et al.* (2020) y la plataforma Genesys PGR (2025), las accesiones *U. ruziziensis* 6713, 26168 y 26295 empleadas como controles negativos en la presente investigación, son materiales de reproducción sexual. Sin embargo, las accesiones *U. decumbens* CIAT 606, *U. brizantha*, 16338, 16776 y 16447 son de reproducción apomítica, lo que es coherente con los resultados obtenidos en la PCR. Los controles de *Urochloa* spp son indicadores importantes en el presente estudio ya que reflejan la presencia o ausencia de la apospórea y su diversidad en especies de un mismo género.

Los resultados de la PCR demostraron que para las muestras de la especie *C. purpureus* no hubo amplificación del fragmento en ninguno de los casos. Esto sugiere que las 62 accesiones de *C. purpureus*, conservadas en la colección del ICA no se reproduce mediante apomixis apospórica; o que estos cebadores no son específicos para esta especie, ya que no se contaron con controles positivos para el género *Cenchrus*. Aunque la información sobre el uso de los cebadores ASGR p779/p780 en *C. purpureus* es limitada puede causar incertidumbre sobre si son compatibles con la plantilla de ADN. Sin embargo, los resultados del presente estudio, podrían estar confirmando el modo de reproducción sexual en *C. purpureus* definido por Hanna (1981) y González y Hanna (1984) para lo cual emplearon marcadores morfológicos y determinaron las características reproductivas de accesiones de *C. purpureus* e híbridos de *C. purpureus* x *C. americanus*.

Los resultados hallados en la presente investigación en las 62 accesiones de *C. purpureus* respaldaron los resultados de Akiyama *et al.* (2011), los cuales demostraron que los cebadores específicos ASGR p779/p780 tienen una vinculación perfecta con la región genómica ASGR en otras especies de *Cenchrus* y los géneros *Urochloa* y *Megathyrsus*, donde se confirmó su excelente capacidad diagnóstica para el modo reproductivo apomítico. Además, estos cebadores apoyan la hipótesis de un origen común para la apomixis apospórica en la tribu Paniceae (Akiyama *et al.* 2011, Worthington *et al.* 2016 y Worthington *et al.* 2019).

Por otra parte, los resultados mostraron que los cebadores ASGR p779/p780 amplificaron consistentemente el fragmento característico de aproximadamente 950 pb en los controles apomíticos de *Urochloa*, mientras que no generaron amplificación en los controles sexuales ni en las 62 accesiones de *C. purpureus* evaluadas. Esta respuesta fue coherente con el comportamiento reproductivo conocido de los controles utilizados y confirma la funcionalidad del sistema de PCR implementado (Worthington *et al.* 2016 y Worthington *et al.* 2019).

La ausencia de amplificación en *C. purpureus* puede interpretarse bajo dos hipótesis principales. La primera, y más probable con base en la literatura disponible, es que

las accesiones evaluadas presentan un modo de reproducción sexual. Estudios clásicos realizados mediante marcadores morfológicos ya habían reportado sexualidad en *C. purpureus* y en híbridos con *C. americanus* (Hanna 1981 y González y Hanna 1984), lo cual coincide con la falta de detección del marcador asociado a la apomixis en el presente trabajo. Asimismo, estudios comparativos en el género *Cenchrus* indican que no todas las especies poseen la región ASGR ni expresan apomixis, y que la sexualidad es frecuente dentro del grupo (Akiyama *et al.* 2011 y Santos *et al.* 2025).

La segunda hipótesis considera la posibilidad de que los cebadores p779/p780 no sean plenamente compatibles con el fondo genético de *C. purpureus*. Investigaciones en especies apomíticas del género *Cenchrus* han mostrado que la región ASGR puede experimentar reordenamientos cromosómicos o localizarse en posiciones distintas según la especie (Goel *et al.* 2006), lo cual podría afectar la conservación de las secuencias blanco para la amplificación. Adicionalmente, aunque el marcador p779/p780 ha demostrado alta precisión diagnóstica en especies de *Urochloa*, *Megathyrsus* y algunas especies de *Cenchrus*, también se ha documentado que su asociación no es perfecta en poblaciones segregantes (da Costa Lima 2023 y Santos *et al.* 2025), por lo que su desempeño puede variar entre taxones.

En este sentido, aunque los resultados respaldan la interpretación de reproducción sexual en las accesiones evaluadas, se recomienda incluir en futuros trabajos controles apomíticos pertenecientes al género *Cenchrus* para fortalecer la validación interespecífica del marcador y descartar diferencias específicas de secuencia. Asimismo, la integración de análisis citoembriológicos o enfoques genómicos permitiría confirmar la presencia o ausencia de la región ASGR-BBML y profundizar en la caracterización del modo de reproducción de *C. purpureus*.

Conclusiones

Los cebadores ASGR p779/p780 mostraron una amplificación clara y específica en las accesiones apomíticas de *Urochloa* spp. no se visualizó amplificación en los controles sexuales ni en las 62 accesiones de *C. purpureus* evaluadas. Estos resultados, junto con la evidencia previa disponible para la especie, sugieren que las accesiones analizadas de *C. purpureus* se reproducen de manera sexual y no presentan apomixis apospórica.

No obstante, debido a la falta de controles apomíticos del género *Cenchrus*, se recomienda validar estos resultados utilizando materiales apomíticos del mismo género, así como complementar este análisis con métodos citoembriológicos o genómicos que permitan confirmar con mayor precisión el modo de reproducción en *C. purpureus*.

Agradecimientos

A la Beca Carbon Sequestration de la Alianza de Bioversity International y el Centro Internacional de Agricultura Tropical 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. A la Dr. C. Constanza Quintero por facilitar los cebadores utilizados en este trabajo.

Referencias

- Akiyama, Y., Goel, S., Conner, J.A., Hanna, W.W., Yamada-Akiyama, H. & Ozias-Akins, P. 2011. Evolution of the apomixis transmitting chromosome in *Pennisetum*. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 1-16, ISSN: 1471-2148. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/289>.
- Cook, B.G., Pengelly, B.C., Schultze-Kraft, R., Taylor, M., Burkart, S., Cardoso Arango, J.A., González Guzmán, J.J., Cox, K., Jones, C. & Peters, M. 2020. Tropical Forages: An interactive selection tool. 2nd and Revised Edn. International Center for Tropical Agriculture (CIAT), Cali, Colombia and International Livestock Research Institute (ILRI), Nairobi, Kenya. www.tropicalforages.info.
- da Costa Lima Moraes, A., Mollinari, M., Ferreira, R.C.U., Aono, A., de Castro Lara, L.A., Pessoa-Filho, M., Lima Barrios, S.C., Franco Garcia, A.A., Borges do Valle, C., Pereira de Souza, A. & Vigna, B.B.Z. 2023. Advances in genomic characterization of *Urochloa humidicola*: exploring polyploid in inheritance and apomixis. *Theoretical and Applied Genetics*, 136(11): 238, ISSN: 1432-2242. <https://doi.org/10.1101/2023.08.31.555743>.
- Genesys PGR. 2025. Available at: <https://www.genesys-pgr.org/> [Consulted: July 15, 2025].
- Goel, S., Chen, Z., Akiyama, Y., Conner, J. A., Basu, M., Gualtieri, G., Hanna, W.W. & Ozias-Akins, P. 2006. Comparative physical mapping of the apospory-specific genomic region in two apomictic grasses: *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. *Genetics*, 173(1): 389-400, ISSN: 3049-7094. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.054429>.
- González, B. & Hanna, W.W. 1984. Morphological and fertility responses in isogenic triploid and hexaploid pearl millet x napiergrass hybrids. *Journal of Heredity*, 75(4): 317-318, ISSN: 1465-7333. <http://jhered.oxfordjournals.org/>.
- Hanna, W.W. 1981. Method of reproduction in napiergrass and in the 3x and 6x allopolyploid hybrids with pearl millet. *Crop Science*, 21: 123-126, ISSN: 1435-0653. <https://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183X002100010033x>.
- Kumar, S., Saxena, S., Rai, A., Radhakrishna, A. & Kaushal, P. 2019. Ecological, genetic, and reproductive features of *Cenchrus* species indicate evolutionary superiority of apomixis under environmental stresses. *Ecological Indicators*, 105: 126-136, ISSN: 1872-7034. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.05.036>.
- 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: July 15, 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>.
- Santos, L., Ragalzi, C., Gesteira, G., Vilela, M., Raposo, A., Jank, L., Santos, M. & Môro, G. 2025. Performance of the molecular marker p779/p780 for classifying mode of reproduction and its association with agronomic traits in a guineagrass breeding program. *Euphytica*, 221(7): 113, ISSN: 1573-5060. <https://doi.org/10.1007/s10681-025-03556-x>.
- 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>.
- Worthington, M., Ebina, M., Yamanaka, N., Heffelfinger, C., Quintero, C., Zapata, Y. P., Perez, J.G., Selvaraj, M., Ishitani, M., Duitama, J., de la Hoz, J.F., Rao, I., Dellaporta, S., Tohme, J. & Arango, J. 2019. Translocation of a parthenogenesis gene candidate to an alternate carrier chromosome in apomictic *Brachiaria humidicola*. *BMC genomics*, 20(41): 1-18, ISSN: 1471-2164. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5392-4>.
- Worthington, M., Heffelfinger, C., Bernal, D., Quintero, C., Zapata, Y.P., Perez, J.G., De Vega, J., Miles, J., Dellaporta, S. & Tohme, J. 2016. A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. *Genetics*, 203(3): 1117-1132, ISSN: 3049-7094. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.190314>.
- Xu, Y., Jia, H., Tan, C., Wu, X., Deng, X. & Xu, Q. 2022. Apomixis: genetic basis and controlling genes. *Horticulture Research*, 9: 1-10, ISSN: 2052-7276. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac150>.