

Genetic characterization of clones and varieties of *Cenchrus purpureus* with microsatellite markers

Caracterización genética de clones y variedades de *Cenchrus purpureus* con marcadores micro satélites.

C. González and R.O. Martínez

Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, Carretera Central, km. 47 ½ San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba
Email: cgonzalez@ica.co.cu

This study determined the genetic diversity in 15 varieties and clones of *Cenchrus purpureus* with 11 SSR microsatellite DNA markers identified in pearl millet (*Cenchrus americanus*). Results indicated polymorphism in the SSR markers, which amplified 68 fragments in total, of which 57 were polymorphic and 7 appeared in a single genotype. Markers CTM8 (DI = 0.88), PSMP2255 (DI = 0.71), PSMP2267 (DI = 0.74) and PGIRD56 (DI = 0.74) showed the highest diversity indexes. Dice distance coefficients ranged from 0.04 to 0.63, indicating high genetic variability among the accessions. Genotypes were divided into three groups in which King grass and OM-22 varieties were not included. The three groups were composed by the genotypes suitable for grazing. The use of these markers is suggested to evaluate genetic diversity in the 56 accessions conserved in the Instituto de Ciencia Animal germplasm bank.

Keywords: livestock, forage, genetic improvement

Napier grass (*Cenchrus purpureus* (Schumach)), also known as elephant grass, is a perennial autotetraploid ($2n = 4x = 28$ AABB) grass, native to Africa. This species is an important forage crop for tropical and subtropical regions, due to its high biomass production, resistance to diseases, forage quality and easy propagation (Anderson *et al.* 2016). Due to its high growth rate and a series of characteristics in biomass degradation, Napier grass has potential in the production of bioenergy and in the conversion of alcohol or methane (Rueda *et al.* 2016). It has also been used for soil and water conservation in areas with slopes, reflecting tolerance to drought, high photosynthetic rate and high efficiency in water use (Galindo *et al.* 2017).

In Cuba, King grass variety was generalized, which, due to its high yield and ecological plasticity, has occupied 85 % of the forage areas (Herrera 2009). That is why in the mid-1980s the improvement program was started by using *in vitro* tissue culture and mutagenesis by irradiation with ^{60}Co (Herrera *et al.* 1994).

Napier grass represents the secondary genetic pool of the pearl millet (*Cenchrus americanus*), since it contains a genome completely homologous with that of this species, while its second genome is of unknown origin (dos Reis *et al.* 2014). Hence, another route used for genetic improvement was the crossing of *Cenchrus*

En este trabajo se determinó la diversidad genética en 15 variedades y clones de *Cenchrus purpureus* con 11 marcadores de ADN microsatélites SSR identificados en millo perla (*Cenchrus americanus*). Los resultados indicaron polimorfismo en los marcadores SSR, que amplificaron en total 68 fragmentos de los cuales 57 fueron polimórficos y 7 aparecieron en un solo genotipo. Los marcadores CTM8 (DI=0.88), PSMP2255 (DI=0.71), PSMP2267 (DI=0.74) y PGIRD56 (DI=0.74) presentaron los mayores índices de diversidad. Los coeficientes de distancia de Dice oscilaron entre 0.04 y 0.63 indicando alta variabilidad genética entre las accesiones. Los genotipos se agruparon en tres grupos en los cuales no se incluyeron las variedades King grass ni OM-22. Los tres grupos se conformaron con los genotipos de porte idóneo para pastoreo. Se sugiere el uso de estos marcadores para evaluar la diversidad genética en las 56 accesiones conservadas en el banco de germoplasma del Instituto de Ciencia Animal.

Palabras clave: ganadería, forraje, mejoramiento genético.

La hierba Napier (*Cenchrus purpureus* (Schumach)), también conocida como pasto elefante, es una gramínea perenne autotetraploide ($2n=4x=28$ AABB) oriunda de África. Esta especie es un importante cultivo forrajero para las regiones tropicales y subtropicales, por su alta producción de biomasa, resistencia a enfermedades, calidad del forraje y fácil propagación (Anderson *et al.* 2016). Por su alta tasa de crecimiento y una serie de características en la degradación de la biomasa, la hierba Napier tiene potencialidades en la producción de bioenergía y en la conversión de alcohol o metano (Rueda *et al.* 2016). También ha sido utilizada para la conservación del suelo y el agua en áreas con pendientes, reflejando la tolerancia a la sequía, alta tasa fotosintética y alta eficiencia en el uso del agua (Galindo *et al.* 2017).

En Cuba se llegó a generalizar la variedad King grass que por su alto rendimiento y plasticidad ecológica, llegó a ocupar el 85% de las áreas forrajeras (Herrera 2009). Es por ello que a mediados de los 80 se comienza a desarrollar el programa de mejoramiento mediante la utilización del cultivo de tejidos *in vitro* y mutagénesis por irradiación con ^{60}Co (Herrera *et al.* 1994).

La hierba Napier representa la fuente de recurso genético secundario del millo de perla (*Cenchrus americanus*), pues contiene un genoma completamente homólogo con el de esta especie, mientras que su segundo genoma es de origen desconocido (dos Reis *et al.* 2014). De ahí que otra vía utilizada para el mejoramiento

purpureus CT-169 with pearl millet (*Cenchrus americanus*). In this way, the OM-22 was obtained, which, due to the size of its leaves and high regrowth capacity, is used for forage production (Martínez and González 2018).

Since the beginning of molecular DNA technologies, several molecular markers have been used for the study of genetic diversity, parental selection, genome mapping, comparative genomics and population structure, among other fields (Kage *et al.* 2016).

Knowledge of genetic diversity is useful for prospecting and conserving germplasm and provides the basis for the selection of parents in new improvement programs. The distribution and extent of genetic diversity depends on evolution, breeding systems, environmental factors and other factors usually associated with human action. For this reason, a better understanding of the distribution and extent of genetic variability is important for the conservation and utilization of genetic resources (Govindaraj *et al.* 2015).

The main criterion used for the distinction of the clones are the morphological and agronomic traits (Ray *et al.* 2017). Morphological characterization is a powerful tool for distinguishing different clones and contributes to introducing desired traits from one donor plant to another recipient. However, these traits are influenced by environmental conditions, so they cannot provide accurate information on the genetic relationships between clones (Nadeem *et al.* 2018). In some cases, enzymatic markers were used to confirm the identity of the most important clones. Nevertheless, these markers have the disadvantage that they present low levels of polymorphisms and are influenced by the phenological state of the plant (Cruz *et al.* 1993).

The objective of this research was to validate the use of SSR (Simple Sequence Repeat) markers to study the genetic variability between clones and varieties of *Cenchrus purpureus* obtained in breeding programs developed in the Instituto de Ciencia Animal.

Materials and Methods

Studied materials. Young and healthy leaves from 15 clones and varieties of *Cenchrus purpureus* (table 1), conserved in the germplasm bank of the Instituto de Ciencia Animal, located in the Miguel Sistachs Naya Experimental Center of Pastures and Forages, were collected in typical red ferralitic soil (Hernández *et al.* 2015). Varieties are conserved in the germplasm bank in plots of 25m².

The King grass variety was introduced in Cuba in the mid 70's (Gerardo *et al.* 1982). Mott variety was selected in 1977 by Professor Gerard Mott, from a progeny of the self-fertilized Merkeron cultivar in Georgia (Sollenberger *et al.* 1989). Clones N-9, N-28, N-11, N-26, U-4 and U-5 were obtained in breeding

genético fue el cruzamiento de *Cenchrus purpureus* CT-169 con millo de perla (*Cenchrus americanus*). Por esta vía se obtuvo el OM-22 que por el tamaño de sus hojas y alta capacidad de rebrote se utiliza para la producción de forraje (Martínez y González 2018).

Desde el inicio de las tecnologías moleculares de ADN, se han utilizado varios marcadores moleculares para el estudio de la diversidad genética, la selección de progenitores, mapeo de genomas, genómica comparativa y estructura de poblaciones, entre otros campos (Kage *et al.* 2016).

El conocimiento de la diversidad genética es útil para la prospección y conservación de germoplasmas, a su vez suministra las bases para la selección de progenitores en nuevos programas de mejoramiento. La distribución y la extensión de la diversidad genética dependen de la evolución, sistemas de mejoramiento, factores ambientales y a menudo de factores asociados a la acción del hombre. Por este motivo la mejor comprensión de la distribución y extensión de la variabilidad genética es importante para la conservación y utilización de los recursos genéticos (Govindaraj *et al.* 2015).

El principal criterio que se utiliza para la distinción de los clones son los rasgos morfológicos y agronómicos (Ray *et al.* 2017). La caracterización morfológica es una herramienta potente para distinguir diferentes clones y contribuye a introducir rasgos deseados de una planta donante a otra receptora. Sin embargo, estos rasgos están influenciados por las condiciones ambientales, por lo que no pueden brindar información precisa sobre las relaciones genéticas entre los clones (Nadeem *et al.* 2018). En algunos casos, se utilizaron marcadores enzimáticos para confirmar la identidad de los clones más importantes, sin embargo, estos marcadores tienen el inconveniente de que presentan bajos niveles de polimorfismos y están influenciados por el estado fenológico de la planta (Cruz *et al.* 1993).

El objetivo de este trabajo fue validar el uso de marcadores SSR (del inglés Single Strand Repeat) para estudiar la variabilidad genética entre clones y variedades de *Cenchrus purpureus* obtenidas en los programas de mejoramiento desarrollados en el Instituto de Ciencia Animal.

Materiales y Métodos.

Materiales estudiados. Se colectaron hojas jóvenes y sanas de 15 clones y variedades de *Cenchrus purpureus* (tabla 1) conservadas en el banco de germoplasma del Instituto de Ciencia Animal, ubicado en el Centro Experimental de Pastos y Forrajes "Miguel Sistachs Nay", en suelo Ferralítico rojo típico (Hernández *et al.* 2015). Las variedades se conservan en el banco de germoplasma en parcelas de 25m².

La variedad King grass fue introducida en Cuba a mediados de los 70 (Gerardo *et al.* 1982). La variedad Mott fue seleccionada en 1977 por el profesor Gerard Mott, a partir de una progenie del cultivar Merkeron autofecundado en Georgia (Sollenberger *et al.* 1989). Los clones N-9,

Table 1. Varieties and clons of *Cenchrus purpureus*

King grass	Variety
CT-115	Variety
OM-22	Variety
Mott	Variety
N-9	Clone
N-28	Clone
N-11	Clone
N-26	Clone
U-4	Clone
U-5	Clone
CT-806	Clone
CT-606	Clone
CT-452	Clone
CT-442	Clone
H-31	Clone

programs through the induction of mutations with physical and chemical agents (Herrera *et al.* 1994). Clones CT-806, CT-606, CT-452, CT-442 and H-31 were obtained in programs to develop varieties with resistance to drought and salinity, through the *in vitro* culture of CT-115 meristems (Herrera *et al.* 2003). The materials are conserved in plots of 25m², each consisting of 5 rows. Sampling was performed in March 2015.

DNA extraction. Leaves from 3 plants were extracted from each plot with the same regrowth age and samples composed of each material were formed. From each variety, the fourth leaf from the apex was taken and preserved in paper envelopes to be transferred to the Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB, initials in Spanish), where the DNA was purified. Small discs of each variety were cut and 300 mg of leaves were macerated in liquid nitrogen in 1.5 mL tubes. Genomic DNA was extracted using the CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) method (Doyle *et al.* 1990). Purity and concentration of the isolated DNA was determined using a NanoDrop Lite spectrophotometer, and by electrophoresis in 0.8 % agarose, dyed with ethidium bromide (5 µg / mL).

DNA amplification with microsatellite markers. Eleven pairs of microsatellite primers were evaluated in the 15 clones and varieties of *C. purpureus* (table 2). Markers were originally identified in pearl millet from genomic DNA analysis (Allouis *et al.* 2001 and Budak *et al.* 2003) and from expressed sequences (Mariac *et al.* 2006). Polymerase chain reaction was carried out in a final volume of 20 µl with the following formulation: GoTaq 1X buffer reaction, 0.5 uM primer pairs, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1 unit of Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega) and 45 ng of genomic DNA. Polymerase chain reaction was performed in a MiniCycler thermocycler with

N-28, N-11, N-26, U-4 and U-5 se obtuvieron en programas de mejoramiento mediante la inducción de mutaciones con agentes físicos y químicos (Herrera *et al.* 1994). Los clones CT-806, CT-606, CT-452, CT-442 y H-31 se obtuvieron en programas para desarrollar variedades con resistencia a la sequía y la salinidad, mediante el cultivo *in vitro* de meristemos de CT-115 (Herrera *et al.* 2003). Los materiales se conservan en parcelas de 25m² cada una compuesta por 5 surcos. El muestreo se realizó en marzo de 2015.

Extracción de ADN. Se extrajeron hojas de 3 plantas de cada parcela con la misma edad de rebrote y se conformaron muestras compuestas de cada material. De cada variedad se tomó la cuarta hoja desde el ápice y se preservaron en sobres de papel para trasladarlas hacia el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) donde se purificó el ADN. Se cortaron discos pequeños de cada variedad y se maceraron 300 mg de hojas en nitrógeno líquido en tubos de 1.5 mL. El ADN genómico se extrajo utilizando el método CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amonio) (Doyle *et al.* 1990). La pureza y la concentración del ADN aislado se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop Lite, y por electroforesis en agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio (5 µg/mL).

Amplificación de los ADN con los marcadores microsatélites. Se evaluaron 11 pares de cebadores de microsatélites en los 15 clones y variedades de *C. purpureus* (tabla 2). Los marcadores se identificaron originalmente en millo de perla a partir de análisis de ADN genómico (Allouis *et al.* 2001 y Budak *et al.* 2013) de secuencias que se expresan (Mariac *et al.* 2006). La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en volumen final de 20 µl con la siguiente formulación: buffer de reacción GoTaq 1X, 0.5 uM de pares de cebadores, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP, 1 unidad de Go Taq Flexi DNA Polimerasa (Promega) y 45ng de ADN genómico. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador

the following cycle: initial denaturation 94 °C (5min) followed by 35 cycles of 94 °C (45 s), followed by specific alignment temperature for each oligo (45 s), then 72 °C (1 min) and at the end an extension cycle of 72 °C for 30 minutes.

MiniCycler con el siguiente ciclo: desnaturalización inicial 94 °C (5min) seguido de 35 ciclos de 94 °C (45 s), seguido de temperatura de alineamiento específica para cada oligo (45 s), luego 72 °C (1 min) y al final un ciclo de extensión de 72 °C durante 30 minutos.

Table 2. Primer sequence, alignment temperature and expected size of fragments amplified by markers

I Identifier	Primer 5''	Primer 3''	AT 0C	Size
CTM-8 ¹	GCTGCATCGGAGATAGGGAA	CTCAGCAAGCACGCTGCTCT	52	210 pb
CTM-10 ¹	GAGGCAAAAAGTGGAAGACAG	TTGATTCCCGGTTCTATCGA	52	235 pb
CTM-59 ¹	TCCTCGACATCCTCCA	GACACCTCGTAGCACTCC	54	183 pb
PGIRD12 ²	GTTGCAAGCAGGAGTAGATCGA	CGCTCTGTAGGTTGAACTCCTT	52	128 pb
PGIRD13 ²	CAGCAGCGAGAAGTTTAGCA	GCGTAGACGGCGTAGATGAT	60	250 pb
PGIRD21 ²	GCTATTGCCACTGCTTCACA	CCACCATGCAACAGCAATAA	54	210 pb
PGIRD25 ²	CGGAGCTCCTATCATTCCAA	GCAAGCCACAAGCCTATCTC	58	165 pb
PGIRD56 ²	ATCACTCCTCGATCGGTAC	ACCAGACACACGTGCCAGT	58	145 pb
PSMP2235 ³	GCTTTTCTGCTTCTCCGTAGAC	CCCAACAATAGCCACCAATAAAGA	54	192 pb
PSMP2255 ³	CATCTAAACACAACCAATCTTGAAC	TGGCACTCTTAAATTGACGCAT	54	264 pb
PSMP2267 ³	GGAAGGCGTAGGGATCAATCTCAC	ATCCACCCGACGAAGGAAACGA	60	241 pb

¹Budak *et al.* (2003), ²Allouis *et al.* (2001) and ³Mariac *et al.* (2006)

Visualization of the amplified fragments. Amplification products were separated by electrophoresis in 6 % acrylamide and 7M urea in a 40cm x 36cm IBI device. Samples were previously denatured at 90 °C for 2 minutes. Gels were made up of 6 % acrylamide (19 acrylamide: 1 bis acrylamide), 0.5X TBE (89mM tris boric acid 89mM EDTA 2mM pH 8) and 7M urea. Electrophoresis conditions were 60W for 2 hours. Gels were dyed in silver nitrate solution and the size of fragments was estimated with 100 pb Promega marker.

Information analysis. The sharpest bands were considered as alleles and values of 1 were assigned if they were present and 0 if they were absent. The database was developed in Excel and imported into the DARwin6 program (Perrier *et al.* 2003) as a simple database. The distance matrix of Dice coefficients between pairs of clones and varieties was calculated (Nei and Li 1979). From the distance matrix, the dendrogram was created using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) method (Sneath and Sokal 1973). The cophenetic correlation analysis was performed to determine how well the UPGMA method represents the Dice coefficient matrix. The principal component analysis (PCA) was performed in the distance matrix. To identify the most informative pair of primers, the diversity index was calculated according to Milbourne *et al.* (1997). Band pattern that amplified each marker in each clone was considered as a simple genotype and the frequency of appearance of that band pattern was used to calculate the diversity index. The diversity index (DI) was calculated as $DI = 1 - \sum fg^2$, where fg is the frequency of each genotype in the 15 varieties and clones. A

Visualización de los fragmentos amplificados. Los productos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en acrilamida al 6 % y urea 7M en un aparato IBI 40 cm x 36cm. Las muestras fueron previamente desnaturalizadas a 90 °C durante 2 minutos. Los geles se conformaron con acrilamida 6 % (19 acrilamida: 1 bis acrilamida), TBE 0.5X (Tris 89 mM ácido bórico 89 mM EDTA 2mM pH 8) y urea 7M. Las condiciones de las electroforesis fueron 60W durante 2 horas. Los geles se tiñeron en solución de nitrato de plata y el tamaño de los fragmentos se estimó con marcador 100pb Promega.

Análisis de la información. Las bandas más nítidas se consideraron como alelos y se asignaron valores de 1 si estaban presentes y 0 si estaban ausentes. La base de datos se elaboró en Excel y se importó en el programa DARwin6 (Perrier *et al.* 2003) como base de datos simple. Se calculó la matriz de distancia de coeficientes de Dice entre pares de clones y variedades (Nei y Li 1979). A partir de la matriz de distancia se creó el dendrograma utilizando el método de pares de medias aritméticas no ponderadas UPGMA (del inglés unweighted pair group method with arithmetic mean) (Sneath y Sokal 1973). Se realizó el análisis de correlación copenética para determinar que tan bien el método UPGMA representa la matriz de coeficiente de Dice. El análisis de componentes principales (PCA) se realizó en la matriz de distancia. Para identificar la pareja de cebadores más informativa, se calculó el índice de diversidad según Milbourne *et al.* (1997). El patrón de bandas que amplificó cada marcador en cada clon se consideró como un simple genotipo y la frecuencia de aparición de ese patrón de bandas se utilizó para calcular el índice de diversidad. El índice de diversidad DI se calculó como $DI = 1 - \sum fg^2$ donde fg es la frecuencia

monomorphic marker will have DI equal to 0 while a polymorphic marker will have DI equal to 1.

Results

The 11 microsatellite markers amplified a total of 68 fragments in the evaluated 15 varieties and clones of *C. purpureus*. Out of these fragments, 57 were polymorphic (table 3). CTM8 and PSMP2267 markers amplified the largest number of polymorphic fragments while CTM-10 amplified only one. PGIRD12 marker did not amplify polymorphic bands, so it presented DI = 0. For the remaining markers, the DI diversity index ranged between 0.32 and 0.88 with a mean of 0.59.

de cada genotipo en las 15 variedades y clones. Un marcador monomórfico tendrá DI igual a 0 mientras que uno polimórfico tendrá DI igual a 1.

Resultados.

Los 11 marcadores microsatélites amplificaron en total 68 fragmentos en las 15 variedades y clones *C. purpureus* evaluadas. De estos fragmentos 57 fueron polimórficos (tabla 3). Los marcadores CTM8 y PSMP2267 amplificaron la mayor cantidad de fragmentos polimórficos mientras que el CTM-10 amplificó solamente uno. El marcador PGIRD12 no amplificó bandas polimórficas, por lo que presentó DI=0. Para el resto de los marcadores el índice de diversidad

Table 3. Diversity index, amount of fragments and polymorphic frgments that amplified the 11 microsatellite markers in the varieties and clones of *Cenchrus purpureus*

Marker	No. alleles	No. polymorphic alleles	DI
CTM8	12	12	0.88
CTM10	3	1	0.32
CTM59	4	3	0.79
PSMP2235	2	2	0.39
PSMP2255	6	6	0.71
PSMP2267	16	16	0.74
PGIRD12	4	0	0
PGIRD13	7	7	0.58
PGIRD21	4	2	0.44
PGIRD25	5	3	0.32
PGIRD56	5	5	0.74

Table 4 shows the number of bands that amplified the 10 SSR polymorphic primers in 15 clones and varieties of *Cenchrus purpureus*. The amount of bands per marker per genotype ranged between 9 and 1 with a mean of 3.13. The marker that amplified the highest number of bands per genotype was PSMP2267 with mean 6. Seven unique bands were detected. Three of these bands amplified with CTM59 marker in genotypes CT-442, OM-22 and N-28, three others with the marker PGIRD56 in the genotypes CT-442, Mott and King grass and one with the marker PSMP2255 in the clone H-31.

The genetic distance matrix was calculated with data of the 64 fragments amplified in the 15 varieties and clones by the 10 polymorphic markers. The genetic distance ranged between 0.04 (CT-606: CT-806) and 0.63 (Mott:H-31), with mean of 0.37 (table 5). Distance coefficients of H-31 were also high with clones U-4, N-28, U-5 and King grass variety. CT-115 variety maintained the highest distance coefficients with the clones H-31, CT-606, CT-806 and OM-22 variety. King grass variety presented high distance coefficients with the clones H-31, CT-806 and CT-606.

Using Dice distance coefficients and UPGMA

DI osciló entre 0.32 y 0.88 con media 0.59.

En la tabla 4 se presenta la cantidad de bandas que amplificaron los 10 cebadores polimórficos de SSR en 15 clones y variedades de *Cenchrus purpureus*. La cantidad de bandas por marcador por genotipo osciló entre 9 y 1 con media 3.13. El marcador que amplificó mayor número de bandas por genotipo fue el PSMP2267 con media 6. Se detectaron 7 bandas únicas. Tres de estas bandas amplificaron con el marcador CTM59 en los genotipos CT-442, OM-22 y N-28. Otras tres con el marcador PGIRD56 en los genotipos CT-442, Mott y King grass y una con el marcador PSMP2255 en el clon H-31.

Se calculó la matriz de distancia genética con los datos de los 64 fragmentos amplificados en las 15 variedades y clones por los 10 marcadores polimórficos. La distancia genética osciló entre 0.04 (CT-606:CT-806) y 0.63 (Mott:H-31), con media 0.37 (tabla 5). También fueron altos los coeficientes de distancia de H-31 con los clones U-4, N-28, U-5 y la variedad King grass. La variedad CT-115 mantuvo los mayores coeficientes de distancia con los clones H-31, CT-606, CT-806 y la variedad OM-22. La variedad King grass presentó altos coeficientes de distancia con los clones H-31, CT-806 y CT-606.

Table 4. Amount of bands amplified per each marker in each genotype of *Cenchrus purpureus*

	CTM8	CTM10	CTM59	PSMP2235	PSMP2255	PSMP2267	PGIRD13	PGIRD21	PGIRD25	PGIRD56
N-9	4	2	2	2	2	5	2	3	3	2
H-31	3	3	3	2	1	4	4	4	4	3
CT-452	3	2	4	2	2	9	5	3	3	2
N-26	4	2	2	2	6	4	3	4	3	2
CT-442	3	2	1	2	2	9	3	3	3	1
OM-22	3	2	1	2	3	7	5	4	3	3
U-4	4	2	3	2	6	5	3	2	3	3
CT-115	3	2	2	2	3	6	3	3	3	2
N-11	3	2	4	2	2	7	3	3	3	3
Mott	3	2	2	2	6	6	3	2	3	1
N-28	4	2	1	2	6	6	3	3	3	2
CT-806	3	3	2	2	4	7	4	4	4	3
U-5	3	2	2	2	6	6	3	3	3	2
CT-606	4	3	3	2	4	7	3	4	4	3
King grass	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1
Mean	3.3	2.2	2.3	2	3.7	6	3.3	3.2	3.2	2.2

Table 5. Genetic distance matrix of 15 varieties and clones of *Cenchrus purpureus* with data of 10 SSR

	N-9	H-31	CT-452	N-26	CT-442	OM-22	U-4	CT-115	N-11	Mott	N-28	CT-806	U-5	CT-606
H-31	0.50													
CT-452	0.20	0.53												
N-26	0.42	0.56	0.43											
CT-442	0.22	0.52	0.13	0.40										
OM-22	0.45	0.49	0.46	0.34	0.47									
U-4	0.31	0.61	0.30	0.25	0.33	0.44								
CT-115	0.15	0.55	0.13	0.40	0.14	0.47	0.33							
N-11	0.16	0.48	0.17	0.40	0.22	0.47	0.30	0.15						
Mott	0.35	0.63	0.30	0.28	0.30	0.38	0.15	0.30	0.30					
N-28	0.23	0.61	0.23	0.27	0.22	0.33	0.14	0.22	0.29	0.13				
CT-806	0.48	0.26	0.54	0.44	0.49	0.25	0.49	0.52	0.52	0.50	0.42			
U-5	0.37	0.61	0.26	0.17	0.29	0.47	0.17	0.29	0.35	0.23	0.16	0.52		
CT-606	0.52	0.27	0.54	0.45	0.53	0.29	0.53	0.56	0.52	0.54	0.46	0.04	0.52	
King grass	0.39	0.60	0.41	0.31	0.46	0.43	0.38	0.38	0.37	0.39	0.37	0.56	0.33	0.57

grouping method, the dendrogram of 15 clones and varieties was created (figure 1). Cophenetic correlation was $r=0.98$ ($p<0.0001$), which indicated that grouping method properly represented the genetic distance matrix.

The varieties and clones formed 5 groups for the 0.1 cut value. King grass and OM-22 varieties were not grouped with any of the genotypes. The first group consisted of clones CT-806, H-31 and CT-606. The

Utilizando los coeficientes de distancia de Dice y el método de agrupamiento UPGMA se creó el dendrograma de los 15 clones y variedades (figura 1). La correlación cofenética fue de $r=0.98$ ($p<0.0001$) lo cual indicó que el método de agrupamiento representó adecuadamente la matriz de distancia genética.

Las variedades y clones conformaron 5 grupos para el valor de corte 0.1. Las variedades King grass y OM-22 no se agruparon con ninguno de los genotipos. El primer

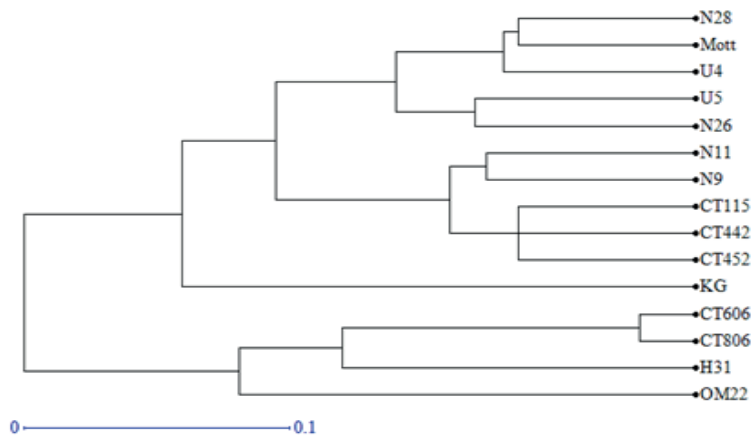


Figure 1. Dendrogram obtained by the UPGMA analysis of the distance matrix calculated with the 64 fragments amplified by the 10 SSR markers in 15 varieties and clones of *Cenchrus purpureus*.

second group consisted of clones CT-442, CT-452, N-11, N-9 and the variety CT-115. Clones U-5, U-4, N-26, N-28 and the Mott variety were included in the third group.

The ACP was performed in the genetic distance matrix to confirm the groups observed in the dendrogram (figure 2). The first axis represented 47.19% of the variation and the second 21.89 %.

grupo estuvo conformado por los clones CT-806, H-31 y CT-606. El segundo grupo estuvo integrado por los clones CT-442, CT-452, N-11, N-9 y la variedad CT-115. En el tercer grupo se incluyeron los clones U-5, U-4, N-26, N-28 y la variedad Mott.

Se realizó el ACP en la matriz de distancia genética para confirmar los grupos observados en el dendrograma (figure 2). El primer eje representó el 47.19 % de la

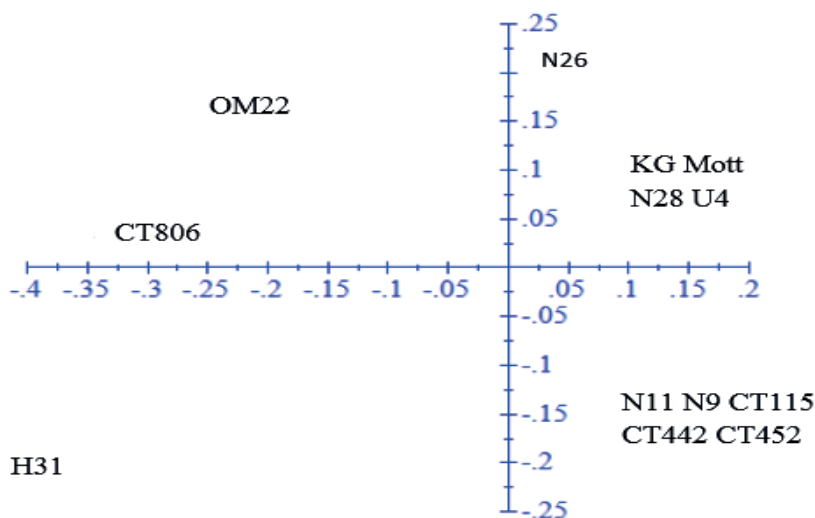


Figure 2. Principal component analysis in the genetic distance matrix calculated with 64 fragments amplified by 10 SSR markers in 15 clones and varieties of *Cenchrus purpureus*

In the ACP, the same groups were verified but with some modifications. Clones H-31 and N-26 tended to disperse from the rest of clones with which they were grouped in the dendrogram, while King grass was included in the second group of the dendrogram. OM-22 variety remained distant from the rest of the clones and varieties.

Discussion

In other collections, several systems of DNA markers have been used to study the variation and

variación y el segundo el 21.89%.

En el ACP se verificaron los mismos grupos pero con algunas modificaciones. Los clones H-31 y N-26 tendieron a dispersarse del resto de los clones con los que se agruparon en el dendrograma, mientras que el King grass se incluyó en el segundo grupo del dendrograma. La variedad OM-22 se mantuvo distante del resto de los clones y variedades.

Discusión.

En otras colecciones se han utilizado varios sistemas

genetic relationship between accessions of Napier grass at molecular level. Simple sequence repeat (SSR), also known as microsatellites, are sequences with repetitions of 2-5 base pairs, which have become the main type of marker, due to their co-dominance, abundance in the genome, high reproducibility and high transfer rates between species (Singh and Singh 2015).

SSR marker primers from *C. americanus* amplified in the genomic DNA samples of the 15 clones and varieties of *C. purpureus*. Although 84 % of the amplified fragments were polymorphic, this proportion was low compared to 98 % reported by Sousa Azevedo *et al.* (2012) and 93 % reported by Kandel *et al.* (2016). Differences could be associated to the fact that these authors evaluated a greater number of individuals, among which accessions from the center of origin of this species were included, which increases the genetic variability.

It must be taken into account that most of the evaluated accessions come from breeding programs that had as parent either the King grass or CT-115. The selection cycles that led to these varieties could affect genetic variability. In this sense, other research has verified that clones from improvement programs conserved by the ILRI (International Livestock Research Institute), have lower polymorphism (81 %) than traditional accessions used by farmers (Kawube *et al.* 2015). However, this first result suggests that markers used are a powerful tool for the genetic characterization of the remaining 56 accessions conserved in the ICA germplasm bank.

The number of amplified fragments per marker in each genotype ranged between 1 and 9. The amplification of each marker should generate 1 to 4 bands of variable intensity depending on the dose of each allele, since the species is tetraploid. However, in this study, some markers amplified a greater number of bands. This result was also reported by López *et al.* (2014) in a collection of 20 wild accessions that although they grow as weeds, present potential to produce energy.

Methodologies of molecular markers are complicated by polyploidy, since multiple loci can be generated when trying to evaluate a single locus (Mason 2015). Autopolyploidy that are formed from phylogenetically related species tend to show greater duplication of genomic regions (Wendel *et al.* 2018). Small-scale duplications may also occur as a result of translocation mechanisms of non-homologous segments or activation of retrotransposons (Vicent and Casacuberta 2017).

Amplification of duplicated loci may also contribute to the increase in the number of bands as it was detected in the markers PSMP2267, CTM8, PSMP2255 and PGIRD13. This performance has been also reported by López *et al.* (2014).

de marcadores de ADN para estudiar la variación y relación genética entre accesiones de hierba Napier a nivel molecular. Las secuencias simples repetidas, también conocidas como micro satélites (SSR), son secuencias con repeticiones de 2-5 pares de base, las cuales se han vuelto el principal tipo de marcador, debido a su co-dominancia, abundancia en el genoma, alta reproducibilidad y altas tasas de transferencia entre especies (Singh y Singh 2015).

Los cebadores de marcadores SSR provenientes de *C. americanus* amplificaron en las muestras de ADN genómico de los 15 clones y variedades de *C. purpureus*. Si bien el 84 % de los fragmentos amplificados fueron polimórficos, esta proporción resultó baja comparada con el 98 % reportado por Sousa Azevedo *et al.* (2012) y el 93 % informado por Kandel *et al.* (2016). Las diferencias pudieran estar asociadas al hecho de que estos autores evaluaron mayor número de individuos, entre los que se incluyeron accesiones provenientes del centro de origen de esta especie, lo cual aumenta la variabilidad genética.

Se debe tener en cuenta que la mayoría de las accesiones evaluadas proceden de programas de mejoramiento que tuvieron como progenitor o bien el King grass o el CT-115. Los ciclos de selección que condujeron a estas variedades pudieron afectar la variabilidad genética. En este sentido, otras investigaciones han verificado que los clones procedentes de programas de mejora conservados por el ILRI (del inglés International Livestock Research Institute), presentan menor polimorfismo (81 %) que las accesiones tradicionales utilizadas por los campesinos (Kawube *et al.* 2015). No obstante, este primer resultado sugiere que los marcadores utilizados constituyen una herramienta potente para la caracterización genética de las restantes 56 accesiones conservadas en el banco de germoplasma del ICA.

La cantidad de fragmentos amplificados por marcador en cada genotipo osciló entre 1 y 9. La amplificación de cada marcador debió generar de 1 a 4 bandas de intensidad variable en dependencia de la dosis de cada alelo, pues la especie es tetraploide. Sin embargo, en el presente estudio algunos marcadores amplificaron mayor número de bandas. Este resultado fue reportado también por López *et al.* (2014) en una colección de 20 accesiones silvestres que si bien crecen como malezas, presentan potencial para producir energía.

Las metodologías de los marcadores moleculares se complejizan por la poliploidia, pues se pueden generar múltiples loci cuando se intenta evaluar un solo locus (Mason, 2015). Los autopoliploides que se forman a partir de especies filogenéticamente relacionadas, tienden a mostrar mayor duplicación de regiones genómica (Wendel *et al.* 2018). También pueden ocurrir duplicaciones a pequeña escala, como resultado de mecanismos de translocación de segmentos no homólogos o activación de retrotransposones (Vicent y Casacuberta 2017).

La amplificación de loci duplicados también puede contribuir al aumento en el número de bandas como

The bands amplified by the markers provide genetic information that allows distinguishing clones and varieties. However, the markers of CTM and PGIRD series amplified a smaller number of bands than those reported by López *et al.* (2014), which ranged between 3 (CTM10) and 28 (PGIRD13). It should be taken into account that, in this study, 6 varieties selected to produce energy were evaluated, plus 10 wild accessions collected in natural areas and fields along the strait of Florida. For this reason, diversity index could be higher, ranging between 0.68 (PGIRD21) and 0.94 (CTM59). In another study, these 10 markers amplified between 4 and 22 bands, with the CTM8 and PSMP2267 markers having the highest number of alleles with 18 and 22 respectively (Sousa *et al.* 2012). It should be regarded that these authors evaluated 107 accessions from the germplasm bank of EMBRAPA, so it is expected that there is greater genetic variability, due to heterogeneity of the origin of parents.

However, the number of alleles detected with the markers CTM8, CTM59, PSMP2267 and PGIRD25 was similar to that reported by Negawo *et al.* (2018) with 13, 3, 15 and 5 alleles respectively, in a collection of 170 clones conserved in the ILRI germplasm bank. Meanwhile, the number of alleles detected with the markers CTM10, PSMP2235, PSMP2255, PGIRD13, PGIRD21 and PGIRD56 was lower than that reported by these authors with 7, 8, 23, 11, 6 and 8 bands, respectively. The results suggest that it would be beneficial to use only the CTM8 and PSMP2267 markers to evaluate a greater number of clones conserved in the ICA germplasm bank. However, markers PSMP2255 and PGIRD13 should not be discarded.

Coefficients of genetic distance were similar to those reported by López *et al.* (2014) that ranged between 0.05 and 0.47 with mean of 0.32 and those reported by Sousa *et al.* (2012) that oscillated between 0 and 0.75 with mean of 0.35. The dendrogram based on UPGMA analysis grouped clones and varieties into 5 groups. In the first group, similarity coefficients ranged between 0.96 and 0.83 with mean of 0.81. In the second group, they ranged between 0.87 and 0.88 with a mean of 0.84, while in the third group, they varied between 0.87 and 0.72 with a mean of 0.81. King grass variety maintained coefficients of similarity with the CT-115 (0.62) lower than that reported by Sousa *et al.* (2012), which was more than 0.85. On the other hand, Mott variety maintained coefficients of similarity with CT-115 (0.70) and King grass (0.61), similar to that reported by these authors.

In general, genetic improvement programs prefer to use, as progenitors, plants with traits of economic value that are genetically unrelated at the same time. For example, Kandel *et al.* (2016) proposed the use of accessions with genetic distance coefficients

se detectó en los marcadores PSMP2267, CTM8, PSMP2255 y PGIRD13. Este comportamiento ha sido reportado también por López *et al.* (2014).

Las bandas amplificadas por los marcadores suministran información genética que permite distinguir los clones y variedades. Sin embargo, los marcadores de la serie CTM y PGIRD amplificaron menor número de bandas que las reportadas por López *et al.* (2014), que oscilaron entre 3 (CTM10) y 28 (PGIRD13). Se debe tener en cuenta que en dicho estudio se evaluaron 6 variedades seleccionadas para producir energía, más 10 accesiones silvestres colectadas en áreas naturales y campos a lo largo del estrecho de la Florida. Por este motivo el índice de diversidad pudo ser superior oscilando entre 0.68 (PGIRD21) y 0,94 (CTM59). En otro estudio, estos 10 marcadores amplificaron entre 4 y 22 bandas, siendo los marcadores CTM8 y PSMP2267 los de mayor número de alelos con 18 y 22 respectivamente (Sousa *et al.* 2012). Se debe tener en cuenta que estos autores evaluaron 107 accesiones provenientes del banco de germoplasma de EMBRAPA por lo que es de esperar que exista mayor variabilidad genética, debido a la heterogeneidad de las procedencias de los progenitores.

Sin embargo la cantidad de alelos detectados en el presente estudio con los marcadores CTM8, CTM59, PSMP2267 y PGIRD25 fue similar a la reportada por Negawo *et al.* (2018) con 13, 3, 15 y 5 alelos respectivamente, en una colección de 170 clones conservados en el banco de germoplasma del ILRI. Mientras, la cantidad de alelos detectados con los marcadores CTM10, PSMP2235, PSMP2255, PGIRD13, PGIRD21 y PGIRD56 fue inferior a la reportada por estos autores con 7, 8, 23, 11, 6 y 8 bandas respectivamente. Los resultados obtenidos sugieren que sería provechoso utilizar solamente los marcadores CTM8 y PSMP2267 para evaluar mayor número de clones conservados en el banco de germoplasma del ICA. Sin embargo no, deben ser descartados los marcadores PSMP2255 y PGIRD13.

Los coeficientes de distancia genética fueron similares a los reportados por López *et al.* (2014) que oscilaron entre 0,05 y 0,47 con media 0,32 y a los reportados por Sousa *et al.* (2012) que oscilaron entre 0 y 0.75 con media 0.35. El dendrograma basado en el análisis de UPGMA agrupó a los clones y variedades en 5 grupos. En el primer grupo los coeficientes de similitud oscilaron entre 0,96 y 0,83 con media 0.81. En el segundo grupo oscilaron entre 0,87 y 0,88 con media 0.84, mientras que en el tercero variaron entre 0,87 y 0,72 con media 0.81. La variedad King grass mantuvo coeficientes de similitud con el CT-115 (0,62) inferior al reportado por Sousa *et al.* (2012) que fue de más de 0.85. Por otra parte la variedad Mott mantuvo coeficientes de similitud con CT-115 (0.70) y King grass (0.61) similares a la reportada por estos autores.

En general los programas de mejoramiento genético prefieren utilizar como progenitores plantas con rasgos de valor económico que al mismo tiempo estén genéticamente poco relacionadas. Por ejemplo, Kandel *et*

between 0.50 and 0.47 as progenitors. On the other hand, Sousa *et al.* (2012) proposed accessions with genetic distance of 0.85. The difference in the values proposed by both authors is related to the extension of the genetic variability of the accessions. This depends on the geographical origin of the accessions (Harris *et al.* 2010). For example, ILRI collections have been shown to have greater allelic richness than those of EMBRAPA, since they come from varied regions where the center of origin of this species is thought to be (Negawo *et al.* 2018). In the present study, the highest distance coefficients were presented by clone H-31 with clones U-4 (0.61), N-28 (0.61), U-5 (0.61) and King grass (0.60) and Mott (0.63) varieties. The genetic distance between King grass and CT-606 (0.57) was also high. However, it is necessary to study the agronomic performance of these individuals before proposing them as progenitors in future breeding programs.

On the other hand, the lowest value of genetic distance (0.04) was observed in clones CT-606 and CT-806. This value is not low enough to consider that these clones are identical because other authors consider that accessions are still different when they have values of 0.02 (Kandel *et al.* 2016).

The analysis of principal components allowed a better visualization of the variability of clones and provided information on the distances among accessions. The variation proportion explained with the two axes was higher than that reported by Sousa *et al.* (2012), with three axes of 36 % and the one reported by Negawo *et al.* (2018) of 23 % with two axes. Differences are associated with the fact that more than 100 accessions were evaluated in these two studies. Most of the clones maintained similar relationships to those described with the UPGMA analysis, and only clones N-26 and H-31 tended to disperse from the groups described above. King grass variety was also closer to the third group.

Conclusions

Markers used in this study allowed to distinguish the 15 clones and varieties according to their similarities, so it is suggested to use the markers CTM8, PSMP2255, PSMP2267 and PGIRD13 for the evaluation of clones of the germplasm bank from the Institute of Animal Science.

al. (2016) proponen el uso de accesiones con coeficientes de distancia genética entre 0.50 y 0.47 como progenitores. En cambio Sousa *et al.* (2012) proponen accesiones con distancia genética de 0.85. La diferencia en los valores propuestos por ambos autores está relacionada con la extensión de la variabilidad genética de las accesiones. Esta depende de la procedencia geográfica de las accesiones (Harris *et al.* 2010). Por ejemplo, se ha demostrado que las colecciones de ILRI presentan mayor riqueza alélica que las de EMBRAPA, pues estas proceden de variadas regiones donde se piensa que está el centro de origen de esta especie (Negawo *et al.* 2018). En nuestras condiciones los mayores coeficientes de distancia los presentó el clon H-31 con los clones U-4 (0.61), N-28 (0.61), U-5 (0.61) y las variedades King grass (0.60) y Mott (0.63). También fue alta la distancia genética entre King grass y CT-606 (0.57). No obstante, es preciso estudiar el comportamiento agronómico de estos individuos antes de proponerlos como progenitores en futuros programas de mejoramiento.

Por otra parte, el menor valor de distancia genética (0.04) se observó en los clones CT-606 y CT-806. Este valor no es lo suficientemente bajo como para considerar que estos clones son idénticos pues otros autores consideran que las accesiones aún son diferentes cuando tienen valores de 0.02 (Kandel *et al.* 2016).

El análisis de componentes principales permitió visualizar mejor la variabilidad de los clones y aportó información sobre las distancias entre las accesiones. La proporción de la variación explicada con los dos ejes fue superior a la reportada por Sousa *et al.* (2012), con tres ejes de 36 % y a la reportada por Negawo *et al.* (2018) de 23 % con dos ejes. Las diferencias están asociadas al hecho de que en estos dos estudios se evaluaron más de 100 accesiones. La mayoría de los clones mantuvieron relaciones similares a las descritas con el análisis UPGMA, y solamente los clones N-26 y H-31 tendieron a dispersarse de los grupos anteriormente descritos. También la variedad King grass se acercó más al tercer grupo.

Conclusiones.

Los marcadores utilizados permitieron distinguir los 15 clones y variedades en función de sus similitudes por lo que se sugiere utilizar los marcadores CTM8, PSMP2255, PSMP2267 y PGIRD13 para la evaluación de los clones del banco de germoplasma del Instituto de Ciencia Animal.

References

- Allouis, S., Qi, X., Lindup, S., Gale, M.D. & Devos, K.M. 2001. Construction of a BAC library of pearl millet, *Pennisetum glaucum*. Theoretical and Applied Genetics 102 (8): 1200–1205. ISSN: 1432-2242 DOI <https://doi.org/10.1007/s001220100559>.
- Anderson, W.F., Sarath, G., Edme, S., Casler, M.D., Mitchell, R.B., Tobias, C.M., Hale, A.L., Sattler, S.E. & Knoll, J.E. 2016. Dedicated herbaceous biomass feedstock genetics and development. BioEnergy Research. 9 (2): 399–411. ISSN: 1939-1242 DOI <https://doi.org/10.1007/s12155-015-9709-8>.
- Budak, H., Pedraza, F., Cregan, P.B., Baenziger, P.S. & Dweikat, I. 2003. Development and utilization of SSRs to estimate the degree of genetic relationships in a collection of pearl millet germplasm. Crop Science. 43 (6): 2284–2290. doi:10.2135/

- cropsci2003.2284. ISSN: 1435-0653.
- Cruz, R., Herrera, R.S., Martínez, R.O. & Sosa, A. 1993. Electrophoretic identification of *Pennisetum purpureum* cv. king grass mutants. Cuban Journal of Agricultural Science, 27 (2): 219–223.
- dos Reis, G.B., Mesquita, A.T., Torres, G.A., Andrade-Vieira, L.F., Vander Pereira, A. & Davide, L.C. 2014. Genomic homeology between *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum* (Poaceae). Comparative cytogenetics. 8 (3): 199. DOI: 10.3897/CompCytogen.v8i3.7732.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. & Hortorium, L.B. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12 (13): 39-40.
- Galindo, V., Calle, Z., Chará, J. & Armbrecht, I. 2017. Facilitation by pioneer shrubs for the ecological restoration of riparian forests in the Central Andes of Colombia. Restoration Ecology 25 (5): 731-737. ISSN: 1061-2971. DOI:10.1111/rec.12490.
- Gerardo, J., Rodríguez, R. & Solano, J.C. 1982. Evaluación zonal de pastos introducidos en Cuba. 9. Condiciones de secano, San Cristobal. Pastos y Forrajes. 5(2): 129–139. ISSN: 2078-8452.
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M. & Srinivasan, M. 2015. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. Genetics Research International. Volume 2015, ISSN: 2090-3154 DOI: 10.1155/2015/431487.
- Harris, K., Anderson, W. & Malik, R. 2010. Genetic relationships among napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) nursery accessions using AFLP markers. Plant Genetic Resources. 8 (1): 63-70. ISSN: 1479-263X DOI:10.1017/S1479262109990165.
- Hernández, J. A., Pérez, J. J. M., Bosch, I. D. & Castro, S. N. 2015. Clasificación de los suelos de Cuba 2015. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA, 93p; ISBN:978-959-7023-77-7.
- Herrera, R.S. 2009. Mejoramiento de *Pennisetum purpureum* en Cuba. Cuban Journal of Agricultural Science. 43 (4): 424-429. ISSN: 0034-7485.
- Herrera, R.S., Chaple, Z., Cruz, A.M., Romero, A., García, M. 2003. Obtainment of *Pennisetum purpureum* plantlets resistant to drought and salinity. Technical note. Cuban Journal of Agricultural Science 37 (2): 187–189. ISSN: 0864-0408.
- Herrera, R.S., Cruz, R. & Martínez, R.O. 1994. A study of king grass (*Pennisetum purpureum* sp.) mutants obtained by nuclear techniques and chemical mutagens. 5. Pigments. Cuban Journal of Agricultural Science. 30 (2): 205-209. ISSN: 0034-7485.
- Kage, U., Kumar, A., Dhokane, D., Karre, S. & Kushalappa, A.C. 2016. Functional molecular markers for crop improvement. Critical reviews in biotechnology. 36 (5): 917-930. ISSN: 0738-8551 DOI: 10.3109/07388551.2015.1062743.
- Kandel, R., Singh, H.P., Singh, B.P., Harris-Shultz, K.R. & Anderson, W.F. 2016. Assessment of genetic diversity in Napier Grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) using microsatellite, single-nucleotide polymorphism and insertion-deletion markers from Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.). Plant molecular biology reporter. 34 (1): 265-272. ISSN: 1572-9818 DOI <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0918-2>.
- Kawube, G., Alicai, T., Wanjala, B., Njahira, M., Awalla, J. & Skilton, R. 2015. Genetic Diversity in Napier Grass (*Pennisetum purpureum*) Assessed by SSR Markers. Journal of Agricultural Science. 7 (7): 147. ISSN: 1916-9752 DOI:10.5539/jas.v7n7p147.
- López, Y., Seib, J., Woodard, K., Chamusco, K., Sollenberger, L., Gallo, M., Flory, S.L. & Chase, C. 2014. Genetic diversity of biofuel and naturalized napiergrass (*Pennisetum purpureum*). Invasive Plant Science and Management. 7 (2): 229-236. doi:10.1614/IPSM-D-13-00085.1 ISSN: 1939-7291.
- Mariac, C., Luong, V., Kapran, I., Mamadou, A., Sagnard, F., Deu, M., Chantereau, J., Gerard, B., Ndjunga, J. & Bezançon, G. 2006. Diversity of wild and cultivated pearl millet accessions (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.) in Niger assessed by microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics. 114 (1): 49-58. ISSN: 1432-2242 DOI <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0409-9>.
- Martínez, R.O. & González, C. 2018. Evaluation of varieties and hybrids of elephant grass *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum purpureum* x *Pennisetum glaucum* for forages production. Cuban Journal of Agricultural Science. 51 (4): 477-487. ISSN 2079-3480.
- Mason, A.S. 2015. Challenges of genotyping polyploid species, In: Plant Genotyping. Ed., Batley J. Humana Press, New York, NY pp. 161–168. ISBN: 978-1-4939-1966-6 DOI https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6_12.
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W., Waugh, R. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. Molecular breeding. 3 (2): 127-136. ISSN: 1380-3743 DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1009633005390>.
- Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A. & Labhane, N. 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 DOI: 10.1080/13102818.2017.1400401.
- Negawo, A.T., Jorge, A., Hanson, J., Teshome, A., Muktar, M.S., Azevedo, A.L.S., Ledo, F.J., Machado, J.C. & Jones, C.S. 2018. Molecular markers as a tool for germplasm acquisition to enhance the genetic diversity of a Napier grass (*Cenchrus purpureus* syn. *Pennisetum purpureum*) collection. Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales 6 (2): 58-69. ISSN: 2346-3775 DOI: [https://doi.org/10.17138/tgft\(6\)58-69](https://doi.org/10.17138/tgft(6)58-69).
- Nei, M., Li, W.-H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences. 76 (10): 5269-5273. ISSN: 0027-8424 DOI:10.1073/pnas.76.10.5269.
- Perrier, X., Flori, A. & Bonnot, F. 2003. Data analysis methods. In: Genetic diversity of cultivated tropical plants. Ed., Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X., Glaszmann, J. C. Enfield, Science Publishers Montpellier. pp 43 - 76. ISBN 1-57808-264-1.
- Ray, J., Herrera, R., Benítez, D., Díaz, D. & Arias, R. 2017. Multivariate analysis of the agronomic performance and forage quality of new clones of *Pennisetum purpureum* drought tolerant in Valle del Cauto, Cuba. Cuban Journal of Agricultural Science. 50 (4): 639-648. ISSN 2079-3480.

- Rueda, J.A., Ortega-Jiménez, E., Hernández-Garay, A., Enríquez-Quiroz, J.F., Guerrero-Rodríguez, J.D. & Quero-Carrillo, A.R. 2016. Growth, yield, fiber content and lodging resistance in eight varieties of *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone intended as energy crop. *Biomass Bioenergy*. 88 (2016): 59–65. ISSN: 0961-9534 DOI: 10.1016/j.biombioe.2016.03.007.
- Singh, B.D. & Singh, A.K. 2015. *Marker-assisted plant breeding: principles and practices*. Springer New Delhi Heidelberg New York Dordrecht London. 542pp ISBN 978-81-322-2316-0 DOI <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2316-0>.
- Sneath, P.H. & Sokal, R.R. 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. Ed. San Francisco, W.H. Freeman and Company. 573pp ISBN : 0716706970.
- Sollenberger, L.E., Prine, G.M., Ocumpaugh, W.R., Hanna, W.W., Jones Jr, C.S., Schank, S.C. & Kalmbacher, R.S. 1989. Registration of “Mott” dwarf elephantgrass. *Crop Science*. 29 (3): 827–828.
- Sousa Azevedo, A.L., Costa, P.P., Machado, J.C., Machado, M.A., Pereira, A.V. & José da Silva Lédo, F. 2012. Cross species amplification of *Pennisetum glaucum* microsatellite markers in *Pennisetum purpureum* and genetic diversity of napier grass accessions. *Crop Science*. 52: 1776–1785. ISSN: 0011-183X DOI:10.2135/cropsci2011.09.0480.
- Vicient, C.M. & Casacuberta, J.M. 2017. Impact of transposable elements on polyploid plant genomes. *Annals of Botany*. 120 (2): 195-207. ISSN: 0305-7364 DOI:10.1093/aob/mcx078.
- Wendel, J.F., Lisch, D., Hu, G. & Mason, A.S. 2018. The long and short of doubling down: polyploidy, epigenetics, and the temporal dynamics of genome fractionation. *Current opinion in genetics & development*. 49: 1-7. ISSN: 0959-437X DOI:10.1016/j.gde.2018.01.004 .

Received: May 21, 2019