

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN FOXTAIL MILLET (*Setaria italica*) USING ISSR MARKERS

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA SETARIA COLA DE ZORRA (*Setaria italica*) USANDO MARCADORES DE ISSR

Li Zhang^{1*}, Pan Liu¹, Aiyang Zhang², Gewen Zheng³, Guofang Xing¹, Juqing Jia¹

¹College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China (zhangli7912@163.com). ²Institute of Millet, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Changzhi 046011, China. ³China Seed Management Station, Agriculture Department of Shanxi Province, Taiyuan 030006, China.

ABSTRACT

Foxtail millet (*Setaria italica*), which originated in China, is an important crop with high genetic diversity. In recent years, several cultivars were developed, but parental cultivars resources are still limited. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers can be used with a high degree of automation and are advantageous tools for genetic diversity analysis. The objective of this study was to analyze genetic diversity in 30 cultivars of foxtail millet using the fluorescent ISSR technique. Eight ISSR markers were used to analyze the genetic diversity in 13 cultivars in Shanxi (SX), 7 in Hebei (HE), 4 in Inner Mongolia (IM), 2 in Shaanxi (SN), 2 in Henan (HA) and 2 in Liaoning (LN), respectively. A total of 122 bands, of which 105(84.5 %) were polymorphism bands, were obtained. The average number of polymorphic information content (PIC), marker index (MI) and resolving power (RP) of eight ISSR primers in this study was 0.9, 12.04 and 5.54, respectively. Nei's genetic distance varied from 0.56 to 0.93. Cluster analysis classified the 30 cultivars into three groups. The cultivars from SX province could be placed together in Group II, but SN, HE and IM were placed in Group I. Group III contained germplasm from different regions (SX, HE, HA and IM). In conclusion, our results indicate high genetic diversity among 30 Chinese foxtail millet cultivars, which could contribute to future breeding programs and functional genomic research.

Key words: Foxtail millet, genetic diversity, ISSR markers, polymorphic information content.

RESUMEN

La setaria (o mijo) cola de zorra (*Setaria italica*), originario de China, es un importante cultivo con una alta diversidad genética. En los años recientes se desarrollaron varios cultivares, pero los recursos de los cultivares parentales todavía son limitados. Los marcadores de repetición de secuencia inter-simple (ISSR) se pueden usar con un alto grado de automatización y son herramientas provechosas para el análisis de la diversidad genética. El objetivo de este estudio fue analizar la diversidad genética en 30 cultivares de setaria cola de zorra usando la técnica de ISSR fluorescente. Ocho marcadores ISSR se usaron para analizar la diversidad genética en 13 cultivares en Shanxi (SX), 7 en Hebei (HE), 4 en Mongolia Interior (IM), 2 en Shaanxi (SN), 2 en Henan (HA) y 2 en Liaoning (LN), respectivamente. Se obtuvieron 122 bandas, de las cuales 105 (84.5 %) eran bandas de polimorfismo. El número promedio de contenidos de información polimórfica (PIC), el índice de marcadores (MI) y el poder de resolución (RP) de ocho iniciadores ISSR en este estudio fueron 0.9, 12.04 y 5.54, respectivamente. La distancia genética de Nei varió de 0.56 a 0.93. El análisis de conglomerados clasificó los 30 cultivares en tres grupos. Los cultivares de la provincia SX se podrían colocar juntos en el Grupo II, pero SN, HE e IM se colocaron en el Grupo I. El Grupo III contenía germoplasmas de diferentes regiones (SX, HE, HA e IM). Por lo tanto, nuestros resultados indican una alta diversidad genética entre 30 cultivares chinos de setaria cola de zorra, lo que podría contribuir a futuros programas de reproducción e investigación genómica funcional.

Palabras clave: setaria cola de zorra, diversidad genética, marcadores ISSR, contenido de información polimórfica.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.
Recibido: January, 2018. Aprobado: October, 2018.
Publicado como NOTA en *Agrociencia* 53: 133-144. 2019.

INTRODUCTION

Foxtail millet (*Setaria italica*) is a naturally stress-tolerant C_4 species of the Poaceae family. It grows primarily in the Northern part of China, including Shanxi, Hebei, Inner Mongolia, Liaoning, Shaanxi, and Henan, where it represents an important strategic reserve crop (Wang *et al.*, 2012a; Diao *et al.*, 2014). Approximately 26 670 foxtail millet accessions (Wang *et al.*, 2012a) were collected in China and evaluation of their genetic diversity is the first step in the breeding process of the species (Tian *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012a).

The research of genetic diversity of germplasm collections use molecular markers, such as SSRs (simple sequence repeats) and ISSRs (inter simple sequence repeats) (Reddy *et al.*, 2009; Powell *et al.*, 2006; Grover and Sharma, 2016). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers are based on the intermediate DNA segment located between two SSRs or microsatellites, which are widely distributed in the eukaryotic genome (Rakoczy-Trojanowska and Bolibok, 2004). Primers used for ISSR markers are single and relatively long, so that these markers can detect variations at as many genetic loci as possible, which is useful in demonstrating a high level of polymorphism (Bornet and Branchard, 2001; Gui *et al.*, 2007), but ISSR markers have limitations such as their dominant nature and less accuracy of estimation compared to SSR markers (Jiang *et al.*, 2007). Although there is some drawback in ISSR markers, they are still one of the most efficient techniques for characterization of genetic diversity. The ISSR analysis techniques were used for assessing genetic diversity in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Yadav *et al.*, 2007), Bromeliaceae (Zhang *et al.*, 2012), Chinese teasel (*Dipsacus chinensis*) (Chen *et al.*, 2013), faba bean (*Vicia faba*) (Wang *et al.*, 2012b), bluegrass (*Poa pratensis*) (Szenejko *et al.*, 2016), ginger (*Zingiber officinale*) (Ismail *et al.*, 2016), brown algae (*Saccharina japonica*) (Cui *et al.*, 2017) and insulin plant (*Costus pictus*) (Naik *et al.*, 2017).

Zhu *et al.* (2010) used 46 SSR markers in foxtail millet and found the highest genetic diversity in the Loess Plateau region, which suggests this was the site of origin of the foxtail millet and now it is widely distributed. Li *et al.* (2007) developed a modified polymerase chain reaction (PCR) amplification

INTRODUCCIÓN

La setaria cola de zorra (*Setaria italica*) es una especie C_4 naturalmente tolerante al estrés, de la familia Poaceae. Crece principalmente en la parte norte de China, incluyendo Shanxi, Hebei, Mongolia Interior, Liaoning, Shaanxi y Henan, donde es un importante cultivo de reserva estratégica (Wang *et al.*, 2012a; Diao *et al.*, 2014). Aproximadamente 26 670 ecotipos de setaria cola de zorra (Wang *et al.*, 2012a) se recolectaron en China y la evaluación de su diversidad genética es el primer paso en el proceso de reproducción de la especie (Tian *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012a).

La investigación de la diversidad genética de las colecciones de germoplasma utiliza marcadores moleculares, como los SSR (repeticiones de secuencia simple) y los ISSR (repeticiones de secuencia inter-simple) (Reddy *et al.*, 2009; Powell *et al.*, 2006; Grover y Sharma, 2016). Los marcadores de repetición de secuencia inter-simple (ISSR) se basan en el segmento de ADN intermedio ubicado entre dos SSR o microsatélites, que tienen una distribución amplia en el genoma eucariótico (Rakoczy-Trojanowska y Bolibok, 2004). Los iniciadores utilizados para los marcadores ISSR son simples y relativamente largos, de modo que pueden detectar variaciones en tantos loci genéticos como sea posible, lo cual es útil para demostrar un alto nivel de polimorfismo (Bornet y Branchard, 2001; Gui *et al.*, 2007), pero los marcadores ISSR tienen limitaciones, como su naturaleza dominante y menos precisión de estimación en comparación con los marcadores SSR (Jiang *et al.*, 2007). Aunque hay algunos inconvenientes en los marcadores ISSR, son una de las técnicas más eficientes para caracterizar la diversidad genética. Las técnicas de análisis ISSR se usaron para evaluar la diversidad genética en el mijo perla (*Pennisetum glaucum*) (Yadav *et al.*, 2007), Bromeliaceae (Zhang *et al.*, 2012), cardo chino (*Dipsacus chinensis*) (Chen *et al.*, 2013), haba (*Vicia faba*) (Wang *et al.*, 2012b), bluegrass (*Poa pratensis*) (Szenejko *et al.*, 2016), jengibre (*Zingiber officinale*) (Ismail *et al.*, 2016), alga parda (*Saccharina japonica*) (Cui *et al.*, 2017) y la planta de insulina (*Costus pictus*) (Naik *et al.*, 2017).

Zhu *et al.* (2010) usaron 46 marcadores SSR en la setaria cola de zorra y encontraron la mayor diversidad genética en la región de la meseta de Loess, lo cual sugiere que éste fue el sitio de origen de la

system using ISSR primers, suitable for *Setaria* species, such as foxtail millet and green foxtail millet (*S. viridis*); however, the optimized ISSR markers have not yet been used for studying genetic diversity in foxtail millet.

We hypothesized that the application of ISSR analysis would offer great potential for determining genetic diversity in foxtail millet. The objective of this study was to analyze genetic diversity in 30 cultivars of foxtail millet by constructing the ISSR fingerprinting that would aid in selecting the appropriate millet germplasms for breeding.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Thirty foxtail millet cultivars from six provinces [13 cultivars from Shanxi (SX), 7 from Hebei (HE), 4 from Inner Mongolia (IM), 2 from Shaanxi (SN), 2 from Henan (HA) and 2 from Liaoning (LN), respectively], were obtained from Shanxi Agricultural University (Table 1, Figure 1). Seeds were sown in the field and approximately 1 g of young leaves was harvested from 20-day-old seedlings of each cultivar. The leaves were placed in a centrifuge tube, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C prior to DNA extraction.

DNA isolation

The cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method was used to extract genomic DNA from millet leaves. The precipitated DNA was washed with 70 % ethanol, air-dried, and then dissolved into 100 μ L double distilled water. The DNA quality was determined by electrophoresis on 1 % agarose gel and the DNA concentration was checked using an ultra-low-volume spectrophotometer (Nanodrop). The samples were stored at -20 °C for further use.

ISSR primer selection

During selection of the primers used in this study, the relevant characteristics of the repeated sequences in the millet genome and the ISSR primer sequences used in studies of pearl millet were taken into consideration (Yadav *et al.*, 2007; Wellington *et al.*, 2013). Thus, 50 universal primers, consisting of di-nucleotide or penta-nucleotide repeats, were selected. Based on reproducibility, stability, and polymorphism, eight of these 50 ISSR primers produced more bands with a strong signal and a clear background (Table 2).

setaria cola de zorra y ahora tiene una distribución amplia. Li *et al.* (2007) desarrollaron un sistema de amplificación de reacción en cadena de la polimerasa modificada (PCR) usando iniciadores ISSR, adecuados para las especies de *Setaria*, como la setaria cola de zorra y la setaria cola de zorra verde (*S. viridis*); sin embargo, los marcadores ISSR optimizados aún no se usan para estudiar la diversidad genética en la setaria cola de zorra.

Nuestra hipótesis es que la aplicación del análisis ISSR ofrecería un gran potencial para determinar la diversidad genética en la setaria cola de zorra. El objetivo de este estudio fue analizar la diversidad genética en 30 cultivares de setaria cola de zorra mediante la construcción de la huella digital ISSR que ayudaría a seleccionar los germoplasmas de setaria adecuados para la reproducción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Treinta cultivares de setaria cola de zorra de seis provincias [13 cultivares de Shanxi (SX), 7 de Hebei (HE), 4 de Mongolia Interior (IM), 2 de Shaanxi (SN), 2 de Henan (HA) y 2 de Liaoning (LN), respectivamente], se obtuvieron de la Universidad de Agricultura de Shanxi (Cuadro 1, Figura 1). Las semillas se sembraron en el campo y se cosechó aproximadamente 1 g de hojas jóvenes de plántulas de 20 d en cada cultivar. Las hojas se colocaron en un tubo de centrifuga, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C antes de la extracción del ADN.

Aislamiento de ADN

El método de bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) se usó para extraer el ADN genómico de las hojas de setaria. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70 %, se secó al aire y luego se disolvió en 100 μ L de agua destilada doble. La calidad del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y la concentración de ADN se verificó usando un espectrofotómetro de volumen ultra bajo (Nanodrop). Las muestras se almacenaron a -20 °C para su uso posterior.

Selección de iniciadores ISSR

Durante la selección de los iniciadores usados en este estudio, se consideraron las características relevantes de las secuencias repetidas en el genoma de la setaria y las secuencias de los

Table 1. Name and origin of 30 foxtail millet (*Setaria italica*).**Cuadro 1. Nombre y origen de 30 cultivares de setaria de cola de zorra (*Setaria italica*).**

| No | Name | Origin | Latitude (N)/longitude (E) |
|----|---------------|---------------------|----------------------------|
| 1 | Yan'an 12 | Shaanxi (SN) | 36° 36' / 109° 28' |
| 2 | Yan'an 13 | Shaanxi (SN) | 36° 36' / 109° 28' |
| 3 | Shanxi millet | Shanxi (SX) | 36° 05' / 112° 32' |
| 4 | Jinfen 20 | Shanxi (SX) | 36° 08' / 111° 05' |
| 5 | Lüliang 8 | Shanxi (SX) | 37° 37' / 111° 17' |
| 6 | Jingu 21 | Shanxi (SX) | 37° 87' / 112° 53' |
| 7 | Changzhi 36 | Shanxi (SX) | 36° 18' / 113° 08' |
| 8 | Changzhi 38 | Shanxi (SX) | 36° 18' / 113° 08' |
| 9 | Changzhi 39 | Shanxi (SX) | 36° 18' / 113° 08' |
| 10 | Datong 11 | Shanxi (SX) | 40° 12' / 113° 30' |
| 11 | Datong 14 | Shanxi (SX) | 40° 12' / 113° 30' |
| 12 | Dongfangliang | Shanxi (SX) | 37° 87' / 112° 53' |
| 13 | Jingu 31 | Shanxi (SX) | 40° 12' / 113° 30' |
| 14 | Black millet | Shanxi (SX) | 40° 12' / 113° 30' |
| 15 | Goushiruangu | Shanxi (SX) | 40° 12' / 113° 30' |
| 16 | Zhangza 10 | Hebei (HE) | 38° 03' / 114° 48' |
| 17 | Zhangza 5 | Hebei (HE) | 38° 03' / 114° 48' |
| 18 | Zhangza 3 | Hebei (HE) | 38° 03' / 114° 48' |
| 19 | Jigu 25 | Hebei (HE) | 38° 03' / 114° 48' |
| 20 | Jigu 29 | Hebei (HE) | 38° 03' / 114° 48' |
| 21 | Kanghangu | Hebei (HE) | 38° 03' / 114° 48' |
| 22 | Chengde 464 | Hebei (HE) | 38° 03' / 114° 48' |
| 23 | Anyang millet | Henan (HA) | 36° 01' / 114° 35' |
| 24 | Yugu 1 | Henan (HA) | 36° 01' / 114° 35' |
| 25 | Chigu 8 | Inner Mongolia (IM) | 42° 28' / 118° 87' |
| 26 | Neimeng 993 | Inner Mongolia (IM) | 42° 28' / 118° 87' |
| 27 | Chigu 3 | Inner Mongolia (IM) | 42° 28' / 118° 87' |
| 28 | Gold millet | Inner Mongolia (IM) | 42° 28' / 118° 87' |
| 29 | Zhaoyang 108 | Liaoning (LN) | 41° 48' / 123° 25' |
| 30 | Zhaogu 18 | Liaoning (LN) | 41° 48' / 123° 25' |

ISSR reaction conditions and procedures

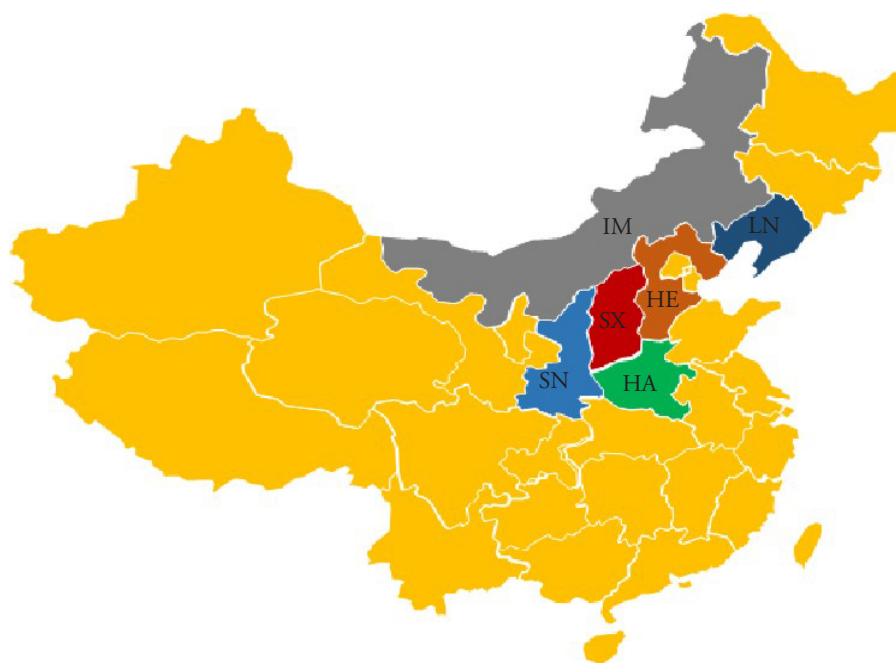
The PCR amplification of ISSR markers labeled with different fluorescent dye was carried out in 20 μL reaction volume, and consisted of 2 μL template DNA at 30 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 2 μL 10X PCR buffer, 2 μL primers at 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1.5 μL dNTPs at 0.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 5 μL MgCl_2 at 2.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0.25 μL Taq polymerase at 0.025 U μL^{-1} and 7.25 μL double-distilled water.

PCR amplification was performed in a thermo cycler (Mastercycler, Eppendorf, USA) using the following program: pretreatment at 94 °C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 45–50 °C (depending on the primers) for 45 s, elongation at 72 °C for 2 min, and a final elongation step at 72 °C for 10 min (Korbie and Mattick, 2008). The amplified products were separated using an ABI377 DNA Analyzer (Applied Biosystems) for high throughput capillary electrophoresis. The samples, including

iniciadores ISSR utilizadas en los estudios de la setaria (o mijo) perla (Yadav *et al.*, 2007; Wellington *et al.*, 2013). Por lo tanto, se seleccionaron 50 iniciadores universales, que consisten en repeticiones de di-nucleótido o penta-nucleótido. Con base en la reproducibilidad, la estabilidad y el polimorfismo, ocho de estos 50 iniciadores ISSR produjeron más bandas con una señal fuerte y un fondo claro (Cuadro 2).

Condiciones y procedimientos de reacción de ISSR

La amplificación por PCR de los marcadores ISSR etiquetados con diferentes tintes fluorescentes se realizó en 20 μL de volumen de reacción, y consistió en 2 μL de ADN de plantilla a 30 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 2 μL de amortiguador de PCR 10X, 2 μL de iniciadores a 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1.5 μL de dNTP a 0.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 5 μL de MgCl_2 a 2.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0.25 μL de Taq polimerasa a 0.025 U μL^{-1} y 7.25 μL de agua bidestilada.



SX: Shanxi, HE: Hebei, IM: Inner Mongolia, SN: Shaanxi, HA: Henan, LN: Liaoning.

Figure 1. Map of locations of provenance of 30 foxtail millet cultivars in six provinces of China.

Figura 1. Mapa de ubicaciones de la procedencia de 30 variedades de setaria de cola de zorra en seis provincias de China.

1.0 μ L PCR product, 0.5 μ L of ROX-1000 size standards, and 8.5 μ L loading buffer of which the major ingredient contained polyacrylamide and dextran-blue, were electrophoresed at 7.5 kV for 2h. Then, DNA fragments were recorded automatically and analyzed by GENESCAN software. The size of the products was determined by comparison with ROX-1000 standard (Applied Biosystems, USA).

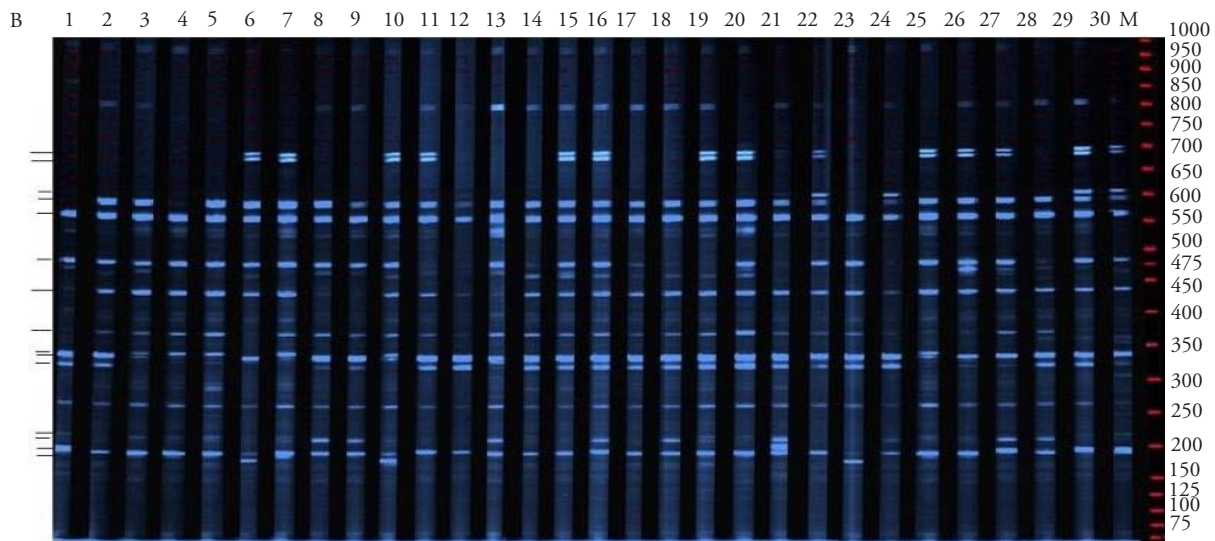
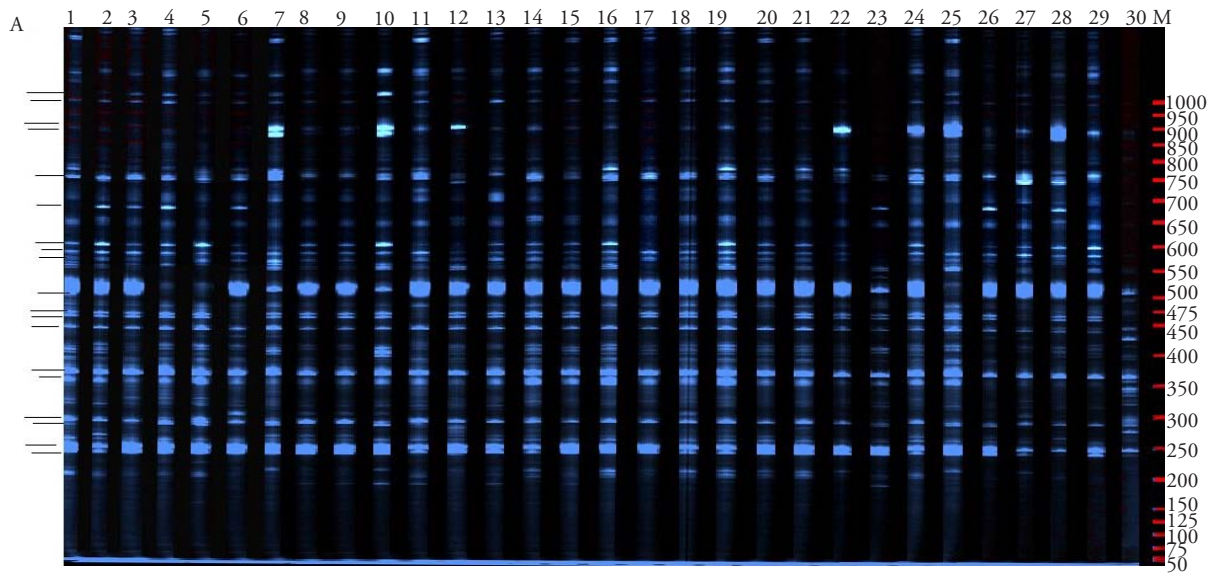
Statistical analysis

Bands on the gel image (Figure 2) were used to construct a binary (0 and 1) matrix (Supplemental Table 1) by assigning a value of 1 for the presence of a band and 0 for the absence of band for each locus. To determine the most informative primer, some parameters including the number of total bands (NTB), number of and percentage of polymorphic bands (NPB and PPB), polymorphic information content (PIC), marker index (MI) and resolving power (RP) were calculated. The PIC value, which indicates the efficiency of each primer, was calculated following the formula described by Anderson *et al.* (1993): $PIC_i = 1 - \sum p_i^2$, where p_i is the frequency of the i th allele at a given locus. The MI, which determines the usefulness of the primers, was calculated according to Powell *et al.* (1996): $MI = EMR \times PIC$. The EMR (effective multiplex ratio) is the average number of polymorphic

La amplificación por PCR se realizó en un termociclador (Mastercycler, Eppendorf, EE.UU.) con el siguiente programa: pretratamiento a 94 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, recocido a 45-50 °C (dependiendo de los iniciadores) durante 45 s, alargamiento a 72 °C por 2 min, y un alargamiento final a 72 °C por 10 min (Korbie y Mattick, 2008). Los productos amplificados se separaron usando un analizador de ADN ABI377 (Applied Biosystems) para electroforesis capilar de alto rendimiento. Las muestras, que incluyen 1.0 μ L de producto de PCR, 0.5 μ L de los estándares de tamaño ROX-1000 y 8.5 μ L de amortiguador de carga cuyo ingrediente principal contenía poliacrilamida y azul de dextrano, se sometieron a electroforesis a 7.5 kV por 2 h. Luego, los fragmentos de ADN se registraron automáticamente y se analizaron con el software GENESCAN. El tamaño de los productos se determinó por comparación con el estándar ROX-1000 (Applied Biosystems, EE.UU.).

Análisis estadístico

Las bandas en la imagen de gel (Figura 2) se usaron para construir una matriz binaria (0 y 1) (Cuadro Suplementario 1) asignando el valor de 1 para la presencia de una banda y 0 para la ausencia de banda para cada lugar. Para determinar cuál era el iniciador más informativo, se calcularon algunos parámetros,



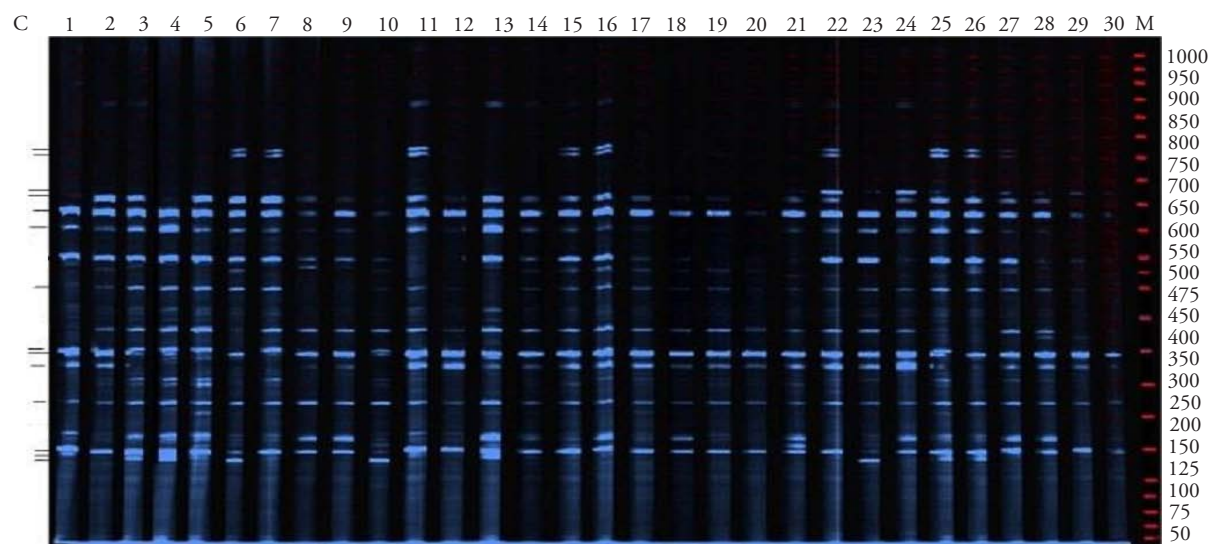


Figure 2. Capillary electrophoresis of amplified products obtained after PCR using ISSR primers. M indicates the marker (50–1000). The numbers in the upper part of the gel indicate the different foxtail millet cultivars. Polymorphic loci are indicated by black arrows at the left. A) primer 807; B) primer 888; C) primer 902.

Figura 2. Electroforesis capilar de productos amplificados obtenidos después de la PCR usando iniciadores ISSR. M indica el marcador (50–1000). Los números en la parte superior del gel indican los diferentes cultivares de setaria de cola de zorra. Los loci polimórficos están indicados por flechas negras a la izquierda. A) iniciador 807; B) iniciador 888; C) iniciador 902.

fragments. The R_p , which indicates the discriminatory potential of the primers, was calculated based on Prevost and Wilkinson (1999) formula: $R_p = \sum I_b$, where I_b represented the information band and was calculated using the formula: $I_b = 1 - (2 \times [0.5 - p])$. Nei's average genetic distance between accessions was calculated by PowerMarker and a phylogenetic tree was generated by using

incluyendo el número de bandas totales (NTB), el número y porcentaje de bandas polimórficas (NPB y PPB), el contenido de información polimórfica (PIC), el índice de marcador (MI) y el poder de resolución (RP). El valor PIC, que indica la eficiencia de cada cebador, se calculó con la fórmula descrita por Anderson *et al.* (1993): $PIC_i = 1 - \sum P_i^2$, donde p_i es la frecuencia

Table 2. ISSR primers used in the genetic diversity analysis of foxtail millet (*Setaria italica* L.) cultiva.

Cuadro 2. Iniciadores ISSR usados en el análisis de diversidad genética de cultivares de setaria cola de zorra (*Setaria italica* L.).

| ISSR Primer | Sequence 5'-3' | ISSR polymorphism data | | | | | |
|-------------|----------------------|------------------------|-------------------|-------|------|----------------|-------|
| | | Total no. of bands | Polymorphic bands | P (%) | PIC | R _p | MI |
| 807 | (AG) ₈ T | 23 | 21 | 91.3 | 0.94 | 8.64 | 19.8 |
| 826 | (AG) ₈ C | 19 | 14 | 73.6 | 0.94 | 4.88 | 13.17 |
| 836 | (AG) ₈ YA | 19 | 19 | 100.0 | 0.94 | 7.86 | 17.86 |
| 840 | (GA) ₈ YT | 7 | 7 | 100.0 | 0.82 | 2.00 | 5.75 |
| 886 | VDV(CT) ₇ | 14 | 10 | 71.4 | 0.90 | 5.10 | 9.01 |
| 888 | BDB(CT) ₇ | 15 | 14 | 93.3 | 0.90 | 6.08 | 12.63 |
| 890 | VHV(GT) ₇ | 9 | 5 | 55.6 | 0.85 | 1.72 | 4.25 |
| 902 | (GT) ₆ AY | 16 | 15 | 93.7 | 0.92 | 8.02 | 13.86 |
| mean | | 15.2 | 13.1 | 84.5 | 0.90 | 5.54 | 12.04 |

%P: percentage polymorphism, PIC; polymorphic information content, DI: diversity index, R_p: resolving power, MI: marker indices. ♦
% P: porcentaje de polimorfismo, PIC; contenido de información polimórfica, ID: índice de diversidad, R_p: poder de resolución, MI: índices de marcador.

NTSYSpc-2.11F software. The SimQual procedure was used to obtain similarity coefficient matrices. The UPGMA method of the SHAN procedure was used to process the information to obtain a clustering tree plot.

RESULTS AND DISCUSSION

ISSR polymorphism analysis

Eight primers were selected based on reproducibility, stability, and polymorphism (Table 2 and Figure 2). The number of total bands produced by each ISSR primers ranged from 7 (UBC840) to 23 (UBC807), with an average number 15.2. The percent polymorphism (%P) of each primer varied from 55.6 % (UBC890) to 100 % (UBC836 and UBC840) and the average number of polymorphic bands were 13.1. Moreover, polymorphic information content (PIC) values of the ISSR primers ranged from 0.82 (UBC840) to 0.94(UBC807, UBC826 and UBC836), with an average of 0.9, while marker indices (MI) varied from 4.25(UBC890) to 19.8(UBC807) with an average of 12.04. The resolving power (Rp) was 5.54 on average and the information were summarized in Table 2.

ISSR markers were used to assess genetic diversity in different plant accessions. Souframanien and Gopalakrishna (2004) used ISSR markers to determine the genetic differences among varieties of blackgram (*Vigna mungo*) and obtained 104 polymorphic fragments from 16 ISSR primers. Vaillancourt *et al.* (2008) studied genetic differences in wheat and found 87.4 % polymorphism. In our study, the value of 15.2 bands in average obtained from ISSR primers is higher than that of 7.3 bands observed by Kumari *et al.* (2011); this difference could be attribute to the detection methods of capillary electrophoresis used in this our where resolution is higher than that of agarose gel.

The polymorphic information content (PIC) and marker index (MI) indicates the efficiency of the primer for detecting the polymorphism within a population (Anderson *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1996). The average number of PIC and MI of eight ISSR primers in our study was 0.9 and 12.04, respectively. This result indicates the efficiency of these eight ISSR primers, which can be widely used in future genetic diversity analysis of foxtail millet and other millet crops. Similar results were reported by Reddy *et al.* (2009) in rice.

del alelo *i* en un locus dado. El IM, que determina la utilidad de los iniciadores se calculó de acuerdo con Powell *et al.* (1996): $MI = EMR \times PIC$. La RME (relación múltiple efectiva) es el número promedio de fragmentos polimórficos. El Rp, que indica el potencial discriminatorio de los iniciadores, se calculó con base en la fórmula de Prevost y Wilkinson (1999): $Rp = \sum Ib$, donde Ib representó la banda de información y se calculó con la fórmula: $Ib = 1 - (2x | 0.5 - p)$.

La distancia genética promedio de Nei entre los ecotipos se calculó mediante PowerMarker y se generó un árbol filogenético usando el software NTSYSpc-2.11F. El procedimiento SimQual se utilizó para obtener matrices de coeficientes de similitud. El método UPGMA del procedimiento SHAN se usó para procesar la información y obtener un diagrama de árbol de agrupamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del polimorfismo ISSR

Ocho iniciadores se seleccionaron según la reproducibilidad, estabilidad y polimorfismo (Cuadro 2 y Figura 2). El número total de bandas producidas por cada iniciador ISSR varió de 7 (UBC840) a 23 (UBC807), con un número promedio de 15.2. El porcentaje de polimorfismo (% P) de cada iniciador varió de 55.6 % (UBC890) a 100 % (UBC836 y UBC840) y el número promedio de bandas polimórficas fue 13.1. Además, los valores del contenido de información polimórfica (PIC) de los iniciadores ISSR variaron de 0.82 (UBC840) a 0.94 (UBC807, UBC826 y UBC836), con un promedio de 0.9, mientras que los índices de marcadores (MI) variaron de 4.25 (UBC890) a 19.8 (UBC807) con un promedio de 12.04. El poder de resolución (Rp) fue 5.54 en promedio y la información se resumió en el Cuadro 2.

Marcadores ISSR se usaron para evaluar la diversidad genética en diferentes ecotipos de plantas. Souframanien y Gopalakrishna (2004) utilizaron marcadores ISSR para determinar las diferencias genéticas entre las variedades de blackgram (*Vigna mungo*) y obtuvieron 104 fragmentos polimórficos de 16 iniciadores ISSR. Vaillancourt *et al.* (2008) estudiaron las diferencias genéticas en el trigo y encontraron un 87.4 % de polimorfismo. En nuestro estudio, el valor de 15.2 bandas en promedio obtenido de los iniciadores ISSR es mayor que el de las 7.3 bandas observadas por Kumari *et al.* (2011); esta diferencia podría atribuirse a los métodos de detección de electroforesis capilar usados en este estudio, donde la resolución es mayor que la del gel de agarosa.

The resolving power (Rp) determines the discriminatory potential of the markers (Prevost and Wilkinson, 1999). UBC807 had highest Rp value while UBC890 had the lowest Rp value. The same trend can be obtained from the MI parameter in our study.

The ISSR amplification showed clear and identifiable signals (Figure 2). For primer UBC807, a total of 23 bands were produced and 18 bands were amplified from Yugu1 and Jigu29; however, only five bands were identified in Goushiruangu. For primer UBC902, the cultivar with the maximum number of amplified bands was Neimeng 993 with 13 bands; however, only three bands were present in Goushiruangu. For UBC888 the cultivar with the least number of bands was Yan'an 12 with only four bands; however, eight bands were identified in Goushiruangu. The figures of other primers are provided as supplemental materials. These results suggest a high genetic diversity among Chinese foxtail millet cultivars. Similar results were reported in other studies of Chinese foxtail millet germplasm using SSR markers (Jia *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012a).

El contenido de información polimórfica (PIC) y el índice de marcador (MI) indican la eficiencia del iniciador para detectar el polimorfismo dentro de una población (Anderson *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1996). El número promedio de PIC y MI de ocho iniciadores ISSR en nuestro estudio fue 0.9 y 12.04, respectivamente. Este resultado indica la eficiencia de estos ocho iniciadores ISSR, que pueden usarse ampliamente en el futuro análisis de diversidad genética de la setaria cola de zorra y otros cultivos de setaria. Reddy *et al.* (2009) reportaron resultados similares en el arroz.

El poder de resolución (Rp) determina el potencial discriminatorio de los marcadores (Prevost y Wilkinson, 1999). UBC807 tuvo el valor Rp más alto, mientras que UBC890 tuvo el valor Rp más bajo. La misma tendencia se puede observar en el parámetro MI en nuestro estudio.

La amplificación ISSR mostró señales claras e identificables (Figura 2). Para el iniciador UBC807 se produjeron 23 bandas y se amplificaron 18 bandas de Yugu1 y Jigu29; sin embargo, solo se identificaron cinco bandas en Goushiruangu. Para el iniciador UBC902, el cultivar con el mayor número de ban-

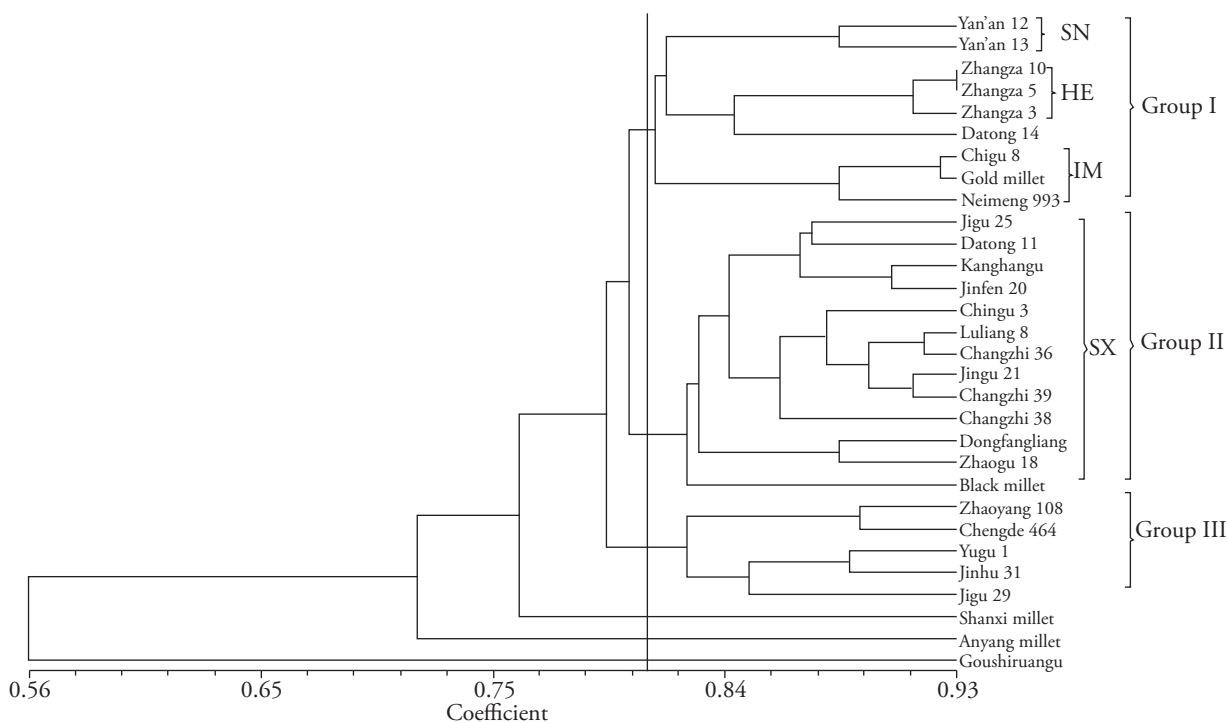


Figure 3. Dendrogram generated by UPGMA clustering, illustrating the genetic relationships of 30 Chinese foxtail millet (*Setaria italica*) populations.

Figura 3. Dendrograma generado por el agrupamiento UPGMA, que ilustra las relaciones genéticas de 30 poblaciones de setaria cola de zorra china (*Setaria italica*).

Genetic diversity analysis

A phylogenetic tree was produced to understand the genetic structure of the 30 foxtail millet cultivars from six different provinces from China (Figure 3). The dendrogram produced three subgroups on the cutting distance of 0.81, where Goushiruangu, Anyang millet and Shanxi millet were isolated from the other cultivars because they were wild foxtail millets. The other cultivars were further divided into three subgroups (Group I, II and III). Group I included two cultivars from Shannxi (Yan'an 12 and Yan'an 13), three from Hebei (Zhangza 3, 10 and 5) and three from Inner Mongolia (Chigu 8, Gold millet and neimeng993). Group II comprised 11 cultivars from Shanxi, one from Liaoning and one from Inner Mongolia. Group III contained Jigu 25, Yugu1, Jingu31, Chengde and Zhaoyang 108, which were from different provinces (Figure 3 and Table 1). The graphic pattern indicated that the cultivars from Shanxi (SX) province could be placed together in Group II, but SN, HE and IM were placed in Group I (Figure 3), this may due to the limited accessions selected from these three provinces.

This tree was based on the Nei's genetic distances and three groups were classified as Group I, II and III. The cutting distance of 0.81 was indicated as a black line. SN: Shannxi, HE: Hebei, IM: Inner Mongolia, SX: Shanxi.

Chinese foxtail millet landraces were in good accordance with eco-geographical distribution in China from other studies (Wang *et al.*, 2012a). Two hundred and fifty accessions of foxtail millet were classified into four conservative groups (pop1, pop2N, pop2S and pop3) and the higher diversity was identified in the middle region (pop3), followed by downstream region of Yellow river (pop1). In our study, the 30 cultivars were from the middle region of Yellow river, but there were several cases that accessions coming from the same region, such as Datong 14 and Datong 11, Jigu 25 and Jigu 29, Jingu 21 and Jingu 31, were not clustered into the same group. Thus, the findings of our study indicate that no distinct relationship between clustering of accessions and their geographic region was evident. The same phenomenon was reported by Kumari *et al.* (2011), which may be due to frequent exchange of cultivars from one region to other on account of crop improvement. As to Jigu 25 and Yugu 1, which were

das amplificadas fue Neimeng 993 con 13 bandas; sin embargo, solo tres bandas estuvieron presentes en Goushiruangu. Para UBC888, el cultivar con el menor número de bandas fue Yan'an 12 con solo cuatro bandas, pero se identificaron ocho bandas en Goushiruangu. Las cifras de otros iniciadores se proporcionan como materiales complementarios. Estos resultados sugieren una alta diversidad genética entre los cultivares chinos de setaria cola de zorra. Resultados similares se reportaron en otros estudios de germoplasma de setaria cola de zorra china usando marcadores SSR (Jia *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012a).

Análisis de la diversidad genética

Un árbol filogenético se produjo para entender la estructura genética de los 30 cultivares de setaria cola de zorra de seis diferentes provincias chinas (Figura 3). El dendrograma produjo tres subgrupos en la distancia de corte de 0.81, donde se aislaron las setarias Goushiruangu, Anyang y Shanxi de los otros cultivares porque eran de cola de zorra silvestre. Los otros cultivares se dividieron en tres subgrupos (Grupo I, II y III). El grupo I incluyó dos cultivares de Shannxi (Yan'an 12 y Yan'an 13), tres de Hebei (Zhangza 3, 10 y 5) y tres de Mongolia Interior (Chigu 8, setaria Gold y neimeng 993). El grupo II tenía 11 cultivares de Shanxi, uno de Liaoning y otro de Mongolia Interior. El grupo III contenía Jigu 25, Yugu1, Jingu 31, Chengde y Zhaoyang 108, que eran de provincias diferentes (Figura 3 y Cuadro 1). El patrón gráfico reveló que los cultivares de la provincia de Shanxi (SX) podrían colocarse juntos en el Grupo II, pero SN, HE e IM fueron puestos en el Grupo I (Figura 3), lo cual puede deberse a los limitados ecotipos seleccionados de estas tres provincias.

Este árbol se basó en las distancias genéticas del Nei y los grupos se clasificaron como Grupo I, II y III. La distancia de corte de 0.81 se señaló con una línea negra. SN: Shannxi, HE: Hebei, IM: Mongolia Interior, SX: Shanxi.

Las variedades locales chinas de setaria cola de zorra concuerdan con la distribución ecogeográfica en China, reportada por otros estudios (Wang *et al.*, 2012a). Doscientos cincuenta ecotipos de setaria cola de zorra se clasificaron en cuatro grupos conservadores (pop1, pop2N, pop2S y pop3) y la mayor diversidad se identificó en la región media (pop3), seguida de la región aguas abajo del río Amarillo (pop1). En

clustered in Group III, the pedigree analysis showed that Yugu 1 was the male parent of the Jigu 25.

Millet landraces have unique adaptability because of domestication and long-term naturalization to local environmental conditions. Because of selective breeding and promotion of improved millet cultivars, local millet landraces with certain special features were gradually replaced with improved cultivars showing superior quality and higher yield; therefore, relatively uniform cultivars have replaced local landrace populations. Our results show that cultivars from different geographical sources and varied genetic backgrounds were clustered together, which could likely be due to continuous adoption and domestication, as well as artificial selection. Current practices have resulted in constant occurrence of close genetic relationships among millet cultivars.

CONCLUSIONS

The results obtained in this study indicate that Chinese foxtail millet cultivars have high genetic diversity that can contribute to breeding programs and functional genomic research. In addition, the clustering result suggests that there is no distinct relationship between clustering of accessions and geographic origin of these 30 foxtail millets. A large population of foxtail millet accessions should be used to evaluate geographical distribution in the future.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Natural Science Foundation of China (NSFC) (grant number: 31501323) and the Research Project Supported by Shanxi Scholarship Council of China (grant number: 2016-070). We would also like to thank Editage (<http://www.editage.cn>) for English language editing.

LITERATURE CITED

- Anderson, J. A., G. A. Churchill, J. E. Autrique, S. D. Tanksley, and M. E. Sorrells. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181-186.
- Bornet, B., and M. Branchard. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molec. Biol. Reporter* 19: 209-215.
- Chen, D. X., L. Y. Li, X. Zhang, Y. Wang, and Z. Zhang. 2013. Genetic diversity in wild *Dipsacus chinensis* populations from China based on ISSR markers. *Genet. Molec. Res.* 12: 1205-1213.

nuestro estudio, los 30 cultivares eran de la región media del río Amarillo, pero hubo varios casos en que los ecotipos provenientes de la misma región, como Datong 14 y Datong 11, Jigu 25 y Jigu 29, Jingu 21 y Jingu 31, no estaban en el mismo grupo. Así, los hallazgos de nuestro estudio indican que no hubo evidencia de una relación entre el agrupamiento de ecotipos y su región geográfica. Kumari *et al.* (2011) reportaron el mismo fenómeno y puede deberse al intercambio frecuente de cultivares de una región a otra debido al mejoramiento de los cultivos. Respecto a Jigu 25 y Yugu 1, reunidos en el Grupo III, el análisis genealógico mostró que Yugu 1 era el padre de Jigu 25.

Las variedades de setaria tienen una adaptabilidad única por la domesticación y la naturalización de largo plazo a las condiciones ambientales locales. Debido a la reproducción selectiva y la promoción de cultivares de setaria mejorados, las variedades locales de setaria con ciertas características especiales fueron reemplazadas gradualmente por cultivares mejorados que mostraron una calidad superior y un mayor rendimiento. Por lo tanto, los cultivares relativamente uniformes han reemplazado a las poblaciones locales de las distintas variedades. Nuestros resultados revelan que los cultivares de diferentes fuentes geográficas y antecedentes genéticos se juntaron en grupos, lo que probablemente podría deberse a la adopción y domesticación continuas, así como a la selección artificial. Las prácticas actuales han resultado en la constante aparición de relaciones genéticas cercanas entre los cultivares.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio indican que los cultivares chinos de setaria cola de zorra tienen una gran diversidad genética que puede contribuir a los programas de mejoramiento y a la investigación genómica funcional. Además, resultado del agrupamiento de los ecotipos sugiere que no existe una relación reconocible entre este último y el origen geográfico de estas 30 setarias cola de zorra. Una gran población de ecotipos de setarias cola de zorra se debería utilizar para evaluar la distribución geográfica en el futuro.

—Fin de la versión en Español—



- Cui, C., Y. Li, Y. Liu, X. Li, S. Luo, Z. Zhang, R. Wu, G. Liang, J. Sun, J. Peng, and P. Tian. 2017. Determination of genetic diversity among *Saccharina* germplasm using ISSR and RAPD markers. *Comptes Rendus Biologies* 340: 76-86.
- Diao, X., J. Schnable, J. L. Bennetzen, and J. Li. 2014. Initiation of *Setaria* as a model plant. *Frontiers Agric. Sci. Eng.* 1: 16-20.
- Grover, A., and P. C. Sharma. 2016. Development and use of molecular markers: past and present. *Critical Rev. Biotechnol.* 36: 290-302.
- Gui, F. R., J. Y. Guo, and F. H. Wan. 2007. Application of ISSR molecular marker in invasive plant species study. *Chinese J. Appl. Ecol.* 18: 919-927.
- Ismail, N. A., M. Y. Rafii, T. M. M. Mahmud, M. M. Hanafi, and G. Miah. 2016. Molecular markers: a potential resource for ginger genetic diversity studies. *Molec. Biol. Rep.* 43: 1347-1358.
- Jia X., Z. Zhang, Y. Liu, C. Zhang, Y. Shi, Y. Song, T. Wang, and Y. Li. 2009. Development and genetic mapping of SSR markers in foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]. *Theor. Appl. Genet.* 118: 821-829.
- Jiang, Y., E. Tian, R. Li, L. Chen, and J. Meng. 2007. Genetic diversity of *Brassica carinata* with emphasis on the interspecific crossability with *B. rapa*. *Plant Breed.* 126: 487-491.
- Korbie, D. J., and J. S. Mattick. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols* 3: 1452-1456.
- Kumari, R., N. Dikshit, D. Sharma, and K. V. Bhat. 2011. Analysis of molecular genetic diversity in a representative collection of foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.] from different agro-ecological regions of India. *Physiol. Molec. Biol. Plants* 17:363-374.
- Li, W., H. Zhi, Y. Wang, H. Li, and X. Diao. 2007. Screening of ISSR primers that suitable for *Setaria* species and their PCR reaction system optimization. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* 22: 141-145.
- Naik, A., P. Prajapat, R. Krishnamurthy, and J. M. Pathak. 2017. Assessment of genetic diversity in *Costus pictus* accessions based on RAPD and ISSR markers. *3 Biotech* 7: 70.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molec. Breed.* 2: 225-238.
- Prevost, A., and M. J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoret. Appl. Genet.* 98: 107-112.
- Rakoczy-Trojanowska, M., and H. Bolibok. 2004. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cell Mol. Biol. Lett.* 9: 221-238.
- Reddy, C. S., A. P. Babu, B. P. M. Swamy, K. Kaladhar, and N. Sarla. 2009. ISSR markers based on GA and AG repeats reveal genetic relationship among rice varieties tolerant to drought, flood, or salinity. *J. Zhejiang University Sci. B* 10: 133-141.
- Souframanien, J., and T. Gopalakrishna. 2004. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theoret. Appl. Genet.* 109: 1687-1693.
- Sznejko M., P. Śmietana, and E. Stępień. 2016. Genetic diversity of *Poa pratensis* L. depending on geographical origin and compared with genetic markers. *PeerJ* 4: e2489.
- Tian B. H. 2010. Genetic diversity of landrace and improved cultivars in foxtail millet. *J. Plant Genet. Resour.* 11: 224-228.
- Vaillancourt, A., K. K. Nkongolo, P. Michael, and M. Mehes. 2008. Identification, characterisation, and chromosome locations of rye and wheat specific ISSR and SCAR markers useful for breeding purposes. *Euphytica* 159: 297-306.
- Wang, C., G. Jia, H. Zhi, Z. Niu, Y. Chai, W. Li, Y. Wang, H. Li, P. Lu, B. Zhao, and X. Diao. 2012a. Genetic diversity and population structure of Chinese foxtail millet [*Setaria italica* (L.) Beauv.] landraces. *G3 Genes Genomes Genetics* 2: 769-777.
- Wang, H. F., X. X. Zong, J. P. Guan, T. Yang, X. L. Sun, Y. Ma, and R. Redden. 2012b. Genetic diversity and relationship of global faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm revealed by ISSR markers. *Theoret. Appl. Genet.* 124: 789-797.
- Yadav, S., S. Jain, V. Jain, and R. K. Jain. 2007. Genetic analysis of CMS, restorer, hybrid and open-pollinated genotypes of Indian pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] using ISSR markers. *Indian J. Biotechnol.* 6: 340-348.
- Zhang, F., Y. Ge, W. Wang, X. Yu, X. Shen, J. Liu, X. Liu, D. Tian, F. Shen, and Y. Yu. 2012. Molecular characterization of cultivated bromeliad accessions with Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 6040-6052.
- Zhu, X. H., Y. H. Zhang, Y. C. Song, Z. H. Zhao, Z. Z. Liu, Y. S. Shi, Y. Li, and T. Y. Wang. 2010. Genetic diversity analysis of foxtail millet accessions revealed by SSR markers. *J. Plant Genet. Resour.* 11: 698-702.