

Proyectos en los Estados Unidos: Resolviendo Problemas de Similitud Morfológica entre Variedades de Soja

United States projects: Addressing morphologically indistinguishable Soybean varieties

US PVPO MM WG -
Fred Achard, Paul Nelson, Marymar Butruille

Group de Trabajo De Marcadores Moleculares



Determinar la porcentaje máxima de similitud genética entre dos variedades de soja para darse un nuevo certificado in situaciones que se falta diferencias morphologicas. (O podemos tratarlo como porcentaje minima de diferencias entre dos variedades)

| | | |
|-------------|--------------------------------------|----------------------------|
| 27 Personas | 18 Instituciones Públicas y Privadas | ASTA |
| | | Ag-Biotech |
| | | AgReliant Genetics |
| | | Becks Hybrids |
| | | Biogenetic Services, Inc. |
| | | Dow |
| | | Eurofins US |
| | | HM Clause |
| | | Idaho Potato Commission |
| | | Louisiana State University |
| | | Monsanto |
| | | Montana State University |
| | | Pioneer |
| | | Syngenta |
| | | US PVP Office |
| | | USDA ARS |
| | | CPVO (Observer) |
| | | SAA (Observer) |

Plan de Acción

1. Pre-experimento: Calcular la cantidad de plantas individuales que se necesita para representar una variedad de soja: genotipado de plantas individuales e lotes de plantas
2. Experimento Principal: determinar la tasa de error y la reproducibilidad de las llamadas genotípicas (en diferentes frecuencias de alelos menores - MAF)

Plan of Action

1. Pre-experiment: to understand the number of plants needed to represent a soybean variety: genotyping single plants and bulks
1. Main Experiment: to determine error rate and reproducibility of genotype calls (at different Minor Allele Frequencies - MAF)

Diseño del pre-experimento: Variando el nivel de agrupación de muestras

Marcadores Moleculares

Illumina 6K SNP Chip, los análisis se realizaron en 4.541 marcadores de SNP sin datos perdidos

Muestras de Soja

1) Genotipado de 17 plantas individuales de 2 variedades de Asgrow con protección caducada: A2396, A2835

2) Genotipado 7 agrupamientos de plantas de estas 2 variedades :

- ▶ Lote 1,2,3,4,5
- ▶ lote 1,2,3,4,5,6,7
- ▶ lote 1,2,3,4,5,6,7,8,9
- ▶ lote 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11
- ▶ lote 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13
- ▶ lote 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
- ▶ lote 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17

Pre-Experiment Design for Soybean bulking level

SNP Markers

Illumina 6K SNP Chip, the analysis were made using 4,541 SNP markers with no missing calls

Soybean Samples

1) Genotype 17 individual plants from 2 Asgrow off-PVP Soybean varieties: A2396, A2835

2) Genotype 7 bulks of the 2 varieties:

- bulk 1,2,3,4,5
- bulk 1,2,3,4,5,6,7
- bulk 1,2,3,4,5,6,7,8,9
- bulk 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11
- bulk 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13
- bulk 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
- bulk 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17

Resultados: porcentaje **Diferencias** entre muestras de la misma Variedad: Plantas individuales e Muestras agrupadas

| Diferencias entre plantas | Variedad | Media de Diferencias |
|---|----------|----------------------|
| Diferencia media de muestras individuales | A2396 | 1.90% |
| | A2835 | |
| Diferencias media de muestras agrupadas | A2396 | 0.10% |
| | A2835 | |
| Magnitud de disminución de la diferencia debido a la agrupacion | | 20X |

Results: Percentage of differences amongst samples of the same Variety: **Single Plants vs bulked Samples**

| Difference within Variety | Variety | Aver Diff |
|---|---------|-----------|
| Single Sample Average Diff | A2396 | 1.90% |
| | A2835 | |
| Bulked Samples Average diff | A2396 | 0.10% |
| | A2835 | |
| Magnitude of decrease of differences due to bulking | | 20 |

Results Summary:

- Single plant showed almost 2% differences from plant to plant genotyping
- Bulked genotypes showed 0.1% differences across all bulks.
- **Conclusion:** Bulking provides an 20X decrease in differences

Resultados: Nivel de Heterocigosidad entre muestras de la misma variedad:

| Heterozygosity Levels | Variedad | Media de Het |
|---|--------------|--------------|
| Heterocigosidad media de muestras individuales | A2396 | 0.16% |
| | A2835 | |
| Heterocigosidad media de muestras agrupadas | A2396 | 3.79% |
| | A2835 | |
| Magnitud del aumento de detección de Heterocigosidad debido a la agrupación | | 25 |

Results: Heterozygosity Level amongst samples of the same Variety:

| Heterozygosity Levels | Variety | Aver Het |
|---|---------|----------|
| Average Heterozygosity Single Plant | A2396 | 0.16% |
| | A2835 | |
| Average Heterozygosity Bults | A2396 | 3.79% |
| | A2835 | |
| Magnitude of Heterozygosity increase due to bulking | | 25 |

Heterozygosity Results Summary:

- Single plant showed 0.16% heterozygosity level for genotyping
- Bulking showed near 4% heterozygosity for genotyping analysis
- **Conclusion:** Bulking permitted a 25X increase in heterozygosity detection.

Agrupación permite detectar la **Heterogeneidad** en la muestra

- Confirmamos que este nivel de agrupación permite la detección de marcadores con diferentes alelos dentro de la variedad.
- Resultados utilizando plantas individuales sugieren que la pequeña falta de similitud detectada se debe a la diferencia de alelos entre plantas de la misma variedad. Esto demuestra la **heterogeneidad** en la muestra.

- ▶ Bulking leading to detection of heterogeneity on sample
- ▶ We confirmed that this level of bulking allows detecting markers with different alleles within the variety.
- ▶ Results utilizing single plants suggest that the small lack of similarity detected is mostly due to presence of different alleles between plants of the same variety. This demonstrates Heterogeneity in the sample.

Selección del número de muestras para lotes

| Número de muestras | Número de planta para el lote | Variedad | Media de Dif | Media de Hets |
|--------------------|--|----------|--------------|---------------|
| 5 | lote 1,2,3,4,5 | A2396 | 0.12% | 3.7% |
| | | A2835 | | |
| 11 | lote 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 | A2396 | 0.08% | 3.8% |
| | | A2835 | | |
| 17 | lote 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17 | A2396 | 0.10% | 3.8% |
| | | A2835 | | |

Conclusiones:

- Los niveles de similitud o heterocigosidad no varían demasiado entre estos lotes
- Entonces se recomendó: Utilizar 10 plantas / muestra para la segunda parte de este proyecto

Selecting the number of samples for Bulking
Combining these facts:

- Similarity or Heterozygosity levels do not vary too much across these lotes (we verified that Heterozygosity level is a reflex of Heterogeneity in the variety)
- It was recommended to use 10 plants/sample for the second part of this project

2) Experimento para detectar la Tasa de Error y la Reproducibilidad de las llamadas genotípicas en diferentes frecuencias de alelos menores - MAF

- Marcadores Moleculares: Soybean Illumina 6K SNP chip
- Entidades que van ejecutar el experimento: (misma placa de ADN y mismo chip SNP)
- Eurofins, Neogen GeneSeek, Dow, Pioneer, Monsanto, Syngenta-sólo análisis de datos
- Muestras de soja: 96 muestras totales (placa completa de ADN) La mayoría de las muestra está fuera de protección (off-PVP), 5 son publicas y 4 son controles

- ▶ 2) Experiment to detect Error Rate and Reproducibility of genotype calls at different Minor Allele Frequencies - MAF
- ▶ Marker set: Illumina 6K SNP Chip
- ▶ Entities running the experiment: (same DNA Plate & same SNP Chip)
 - ▶ Eurofins, Dow, Pioneer, Monsanto and Syngenta (only data analysis)
- ▶ Soybean samples:
 - ▶ 96 samples total (full plate)
 - ▶ Sample are mostly off PVP, 5 are public controls, 4 will be internal controls for each location.

Thank you for your attention!



APPENDIX



Promoting Seed Business in the Americas | September 5-7 2017 - Colombia | Cartagena de Indias