Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

# Analiza molekularna układów allelicznych genów wczesności oraz opracowanie i identyfikacja markerów funkcjonalnych dla genów determinacji pędu, pękania strąków, cech plonotwórczych i jakościowych nasion soi

**Projekt finansowany przez MR i RW w ramach dotacji na pokrycie kosztów wykonania badań odstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej zadanie nr 20**

**Zadanie realizowane w 2023 r.**

**Kierownik tematu:** prof. UPP dr hab. Danuta Kurasiak-Popowska
**Email:** danuta.kurasiak-popowska@up.poznan.pl

**Wykonawcy UPP:**
prof. UPP dr hab. Jerzy Nawracała
prof. UPP dr hab. Agnieszka Tomkowiak
dr Wojciech Bielski

**Wykonawcy IGR:**
dr hab. Michał Książkiewicz

**UP we Wrocławiu:**
dr Sandra Rychel- Bielska

**Wykonawcy DANKO Hodowla Roślin Sp. z o. o.:**
dr Agnieszka Kaczmarek

**Wykonawcy Hodowla Roślin Strzelce Grupa IHAR:**
dr Przemysław Matysik
mgr Piotr Stefański

# Cel zadania

W ramach zadania w 2023 r. realizowano 3 tematy badawcze

## Cel tematu badawczego 1

Celem tematu badawczego było wysokoprzepustowe genotypowanie materiałów kolekcyjnych soi (tych samych, które będą fenotypowane) w celu uzyskania zestawu markerów do mapowania asocjacyjnego – w trakcie realizacji

## Cel tematu badawczego 2

Celem tematu było fenotypowanie w warunkach polowych kolekcji genotypów (w 3 lokalizacjach) do genomowego mapowania asocjacyjnego (GWAS) - cel został osiągnięty

## Cel tematu badawczego 3

Celem doświadczenia było rozmnożeniem pokolenia $F_{1,}$ $F_2$, $F_3$ i $F_4$ mieszańców otrzymanych w 2021 i 2022 roku - cel został osiągnięty

# Temat badawczy 1

- **Materiał roślinny:** 192 genotypy (linie) soi wybrane z kolekcji KG i HR, z zestawu 280 linii poddanych fenotypowaniu
- Izolat DNA uzyskano dla wszystkich badanych genotypów.
- średnie stężenie DNA na poziomie 1059,3 ng/µl (min. 255,4 ng/µl, maks. 2345,2 ng/µl).
- Wartości stosunku absorbancji:
  - przy długościach fali 260 nm i 280 nm (A260/A280) wyniosła średnio 2,11 (min. 2,03; maks. 2,23)
  - Przy długości fali 260 nm i 230 nm (A260/A230) 2,21 (min. 2,03; maks. 2,36 za wyjątkiem 1 próby
- Podczas przygotowania matrycy do genotypowania stężenie prób wyrównano do wartości 350 ng/µl.

- Próby DNA wysłano do firmy wykonującej usługę genotypowania przy użyciu mikromacierzy NJAU 355 K SoySNP Array (Eurofins Genomics Germany GmbH).
- **Wyniki genotypowania zostaną przedstawione w ostatecznej wersji sprawozdania** i zgodnie z przedstawionym harmonogramem będą analizowane w kolejnych latach realizacji projektu w celu identyfikacji loci SNP zasocjowanych z cechami badanymi w doświadczeniach polowych

# Temat badawczy 2

**Materiały i metody:** Materiałem do fenotypowania było 280 genotypów soi należących przede wszystkim do „000” lub ”00” grupy dojrzałości (MG). Genotypy te zostały namnożone w RGD Dłoń w roku 2021. W roku 2022 przeprowadzono pierwszy rok fenotypowania. Wysiane zostały te genotypy, które były analizowane polowo po raz pierwszy w 2022 roku.

Doświadczenia zostały założone w trzech lokalizacjach:

- 26.04.2023 w RGD Dłoń,
- 25.04.2023 w Szelejewie
- 5.05.2023 w Strzelcach.

Układ doświadczeń - bloki losowane w dwóch powtórzeniach (poletko = 10 $m^2$).

W czasie wegetacji przeprowadzono:

- obserwacje fenologiczne:
  - początku kwitnienia i długości okresu wegetacji
- morfologiczne:
  - wysokości roślin, wysokości osadzenia pierwszego strąka, determinacji pędu, wylegania, pękania strąków
  - odnotowano występowanie chorób i szkodników.

Po zbiorze:

- obliczono potencjał plonowania oraz oznaczono MTN.
- przeprowadzono analizy jakościowe nasion: zawartości białka i tłuszczu na posiadanych w hodowlach aparatach (NIRS i FOSS).

Warunki pogodowe w okresie wegetacji soi w trzech lokalizacjach doświadczeń w 2023 r.

| Miesiąc | Temperatura (°C) | | | Opady (mm) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Dłoń | Szelejewo | Strzelce | Dłoń | Szelejewo | Strzelce |
| **Kwiecień** | 7,8 | 8,2 | 10,1 | 48,3 | 34,8 | 40,9 |
| **Maj** | 13,3 | 13,5 | 13,6 | 33,0 | 22,0 | 25,5 |
| **Czerwiec** | 18,9 | 18,9 | 19,3 | 53,3 | 47,0 | 31,0 |
| **Lipiec** | 20,9 | 20,7 | 20,3 | 45,0 | 36,4 | 40,3 |
| **Sierpień** | 20,1 | 19,9 | 20,6 | 135,4 | 104,2 | 62,7 |
| **Wrzesień** | 18,9 | 18,7 | 18,4 | 14,5 | 4,6 | 17,0 |
| **Październik** | 11,6 | 11,9 | 10,6 | 126,5 | 26,2 | 43,4 |
| **Średnia/suma** | **15,9** | **15,9** | **16,1** | **456,0** | **275,2** | **260,8** |

Charakterystyka przebiegu faz fenologicznych 280 genotypów soi w 2023 roku w doświadczeniach w trzech lokalizacjach

| Lp. | Genotyp | Dłoń | | Szelejewo | | Strzelce | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Długość okresu od siewu do kwitnienia (dni) | Długość okresu wegetacji (dni) | Długość okresu od siewu do kwitnienia (dni) | Długość okresu wegetacji (dni) | Długość okresu od siewu do kwitnienia (dni) | Długość okresu wegetacji (dni) |
| **Minimum** | | 49,0 | 119,0 | 53,5 | 132,0 | 43,0 | 98,0 |
| **Średnia** | | 60,2 | 147,6 | 58,1 | 149,0 | 51,0 | 133,7 |
| **Maximum** | | 82,0 | 160,0 | 71,0 | 169,0 | 72,0 | 164,0 |

Charakterystyka cech morfologicznych i cech struktury plonu 280 genotypów soi w 2023

| Lp. | Genotyp | Wysokość rośliny (cm) | Wysokość osadzenia 1 strąka (cm) | Wyleganie | Pękanie strąków | Potencjał plonowania (dt/ha) | MTN (g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| RGD Dłoń | Minimum | 32,5 | 5,4 | 5,0 | 7,0 | 14,0 | 104,60 |
| | Średnia | 62,6 | 14,1 | 8,5 | 9,0 | 30,8 | 224,31 |
| | Maximum | 96,4 | 25,2 | 9,0 | 9,0 | 51,5 | 315,70 |
| Szelejewo | Minimum | 46,3 | 5,6 | 2,0 | 7,0 | 10,53 | 106,9 |
| | Średnia | 63,4 | 12,2 | 8,8 | 9,0 | 32,79 | 211,3 |
| | Maximum | 96,6 | 22,9 | 9,0 | 9,0 | 52,53 | 284,4 |
| Strzelce | Minimum | 53,50 | 4,50 | 5,0 | 6,0 | 8,5 | 118,95 |
| | Średnia | 75,56 | 10,46 | 8,8 | 8,9 | 33,59 | 174,17 |
| | Maximum | 105,00 | 17,50 | 9,0 | 9,0 | 64,1 | 229,75 |

**Wnioski:**

1.Różnice w przebiegu faz fenologicznych oraz wartości prawie wszystkich obserwowanych cech pomiędzy lokalizacjami doświadczeń potwierdzają konieczność prowadzenia fenotypowania badanych genotypów przynajmniej w następnych dwóch latach.

2.Olbrzymie zróżnicowanie wszystkich badanych cech 280 genotypów soi dowodzi, że jest to materiał odpowiedni do zaplanowanych analiz molekularnych.

# Temat badawczy 3

**Materiał roślinny**: W 2023 r. przeprowadzono rozmnożenie nasion mieszańców:

- mieszańce otrzymane w 2021 rozmnożone były w dwóch cyklach jako $F_3$ i $F_4$
- mieszańce uzyskane w 2022 roku w trzech cyklach jako $F_1$, $F_2$ i $F_3$.

Wyniki namnożeń nasion z ustalonych kombinacji w poszczególnych pokoleniach w 2023

| Kombinacja | | Pokolenie F1 | | Pokolenie F2 | | Pokolenie F3 | | Pokolenie F4 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Wysiew | Zbiór | Wysiew | Zbiór | Wysiew | Zbiór | Wysiew | Zbiór |
| **1** | Z X S | 1 | 23 | 23 | 330 | 819 | 795 | 489 | 456 |
| **2** | S X N | | | | | 362 | 317 | 317 | 287 |
| **3** | S X Z | 15 | 262 | 257 | 459 | 1334 | 1302 | 875 | 869 |
| **4** | N X S | 3 | 51 | 50 | 275 | 838 | 830 | 563 | 558 |
| **5** | Nie X P | 3 | 78 | 78 | 345 | 642 | 627 | 286 | 254 |
| **6** | P X Nie | 3 | 53 | 51 | 312 | 291 | 295 | 295 | 281 |
| **7** | S X S | 1 | 43 | 43 | 327 | 625 | 601 | 280 | 268 |
| **8** | Z X N | 3 | 86 | 86 | 347 | 917 | 896 | 564 | 512 |
| **9** | N X Z | 2 | 36 | 36 | 316 | 644 | 635 | 328 | 301 |

S – semizdeterminowany, Z – zdeterminowany, N – niezdeterminowany,
P – strąki pękające, Nie – strąki niepękające

**Wnioski:**

1.Zapewnienie optymalnych warunków wzrostu i rozwoju soi w warunkach szklarni w Szelejewie pozwoliło na otrzymanie 2 pokoleń w roku, a w przypadku kombinacji krzyżowania przeprowadzonego w 2022 r nawet 3 pokoleń w 2023 r..

2.Rozmnożenie roślin wszystkich pokoleń $F_1$ – $F_4$ w warunkach szklarniowych pozwoliło na otrzymanie wystarczającej liczby nasion do dalszego wyprowadzenia linii populacji mapującej z każdej kombinacji krzyżowania.

# Podsumowanie realizacji badań w 2023 r.

## Miernik zadania – stopień realizacji

| Lp. | miernik | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana | stopień realizacji zadania |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| temat badawczy 1 | | | | |
| 1. | Liczba linii soi poddanych genotypowaniu | 192 | W trakcie realizacji | |
| temat badawczy 2 | | | | |
| 2.1 | Liczba obserwowanych genotypów | 280 | 280 | 1,00 |
| 2.2 | Liczba obserwowanych cech: długość okresu od siewu do kwitnienia, długość okresu wegetacji, wysokość roślin, wysokość osadzenia I strąka typ kończenia wzrostu pędu, wyleganie, pękanie strąków, MTN, potencjał plonowania, zawartość białka i zawartość tłuszczu w nasionach | 11 | 11 | 1,00 |
| temat badawczy 3 | | | | |
| 3 | liczba kombinacji krzyżowania | 9 | 9 | 1,00 |
| | | | Średnia | |
| | | % realizacji zadania | | |

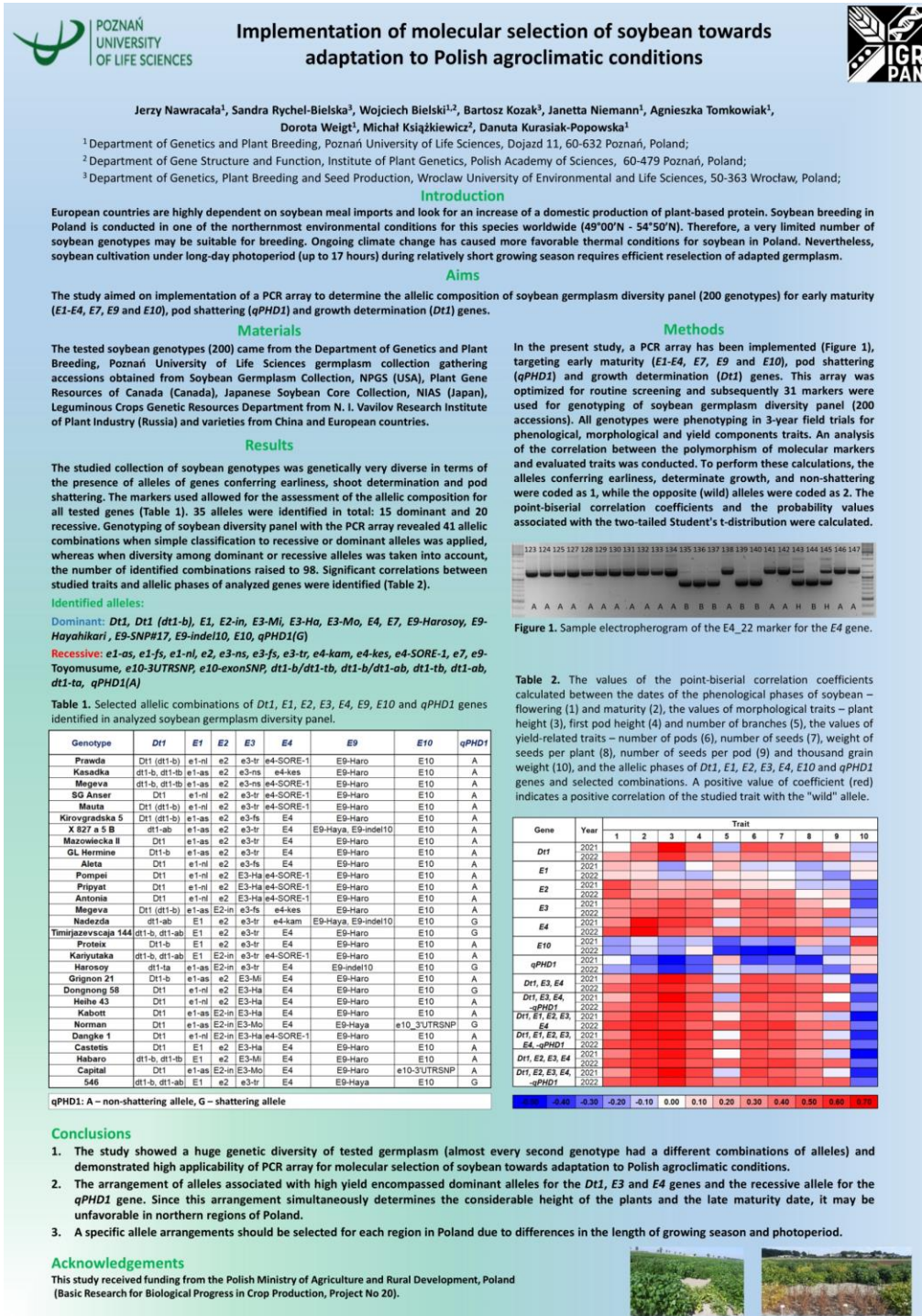
## Prezentacja wyników badań w 2023:

-poster na konferencji World Soybean Research Conference 11

WSRC 11
World Soybean Research Conference
18 – 23 June 2023
Vienna | Austria

Na konferencji prezentowano wyniki analiz molekularnych otrzymane ramach realizacji zadania nr 20:

rok 2021 – sprawozdanie str. 3- 17 oraz 2022- sprawozdanie str. 3-20



POZNAŃ UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES

# Implementation of molecular selection of soybean towards adaptation to Polish agroclimatic conditions


Jerzy Nawracała[1], Sandra Rychel-Bielska[3], Wojciech Bielski[1,2], Bartosz Kozak[3], Janetta Niemann[1], Agnieszka Tomkowiak[1], Dorota Weigt[1], Michał Książkiewicz[2], Danuta Kurasiak-Popowska[1]

[1] Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-632 Poznań, Poland;
[2] Department of Gene Structure and Function, Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, 60-479 Poznań, Poland;
[3] Department of Genetics, Plant Breeding and Seed Production, Wroclaw University of Environmental and Life Sciences, 50-363 Wrocław, Poland;


## Introduction

**European countries are highly dependent on soybean meal imports and look for an increase of a domestic production of plant-based protein. Soybean breeding in Poland is conducted in one of the northernmost environmental conditions for this species worldwide (49°00'N - 54°50'N). Therefore, a very limited number of soybean genotypes may be suitable for breeding. Ongoing climate change has caused more favorable thermal conditions for soybean in Poland. Nevertheless, soybean cultivation under long-day photoperiod (up to 17 hours) during relatively short growing season requires efficient reselection of adapted germplasm.**

## Aims

**The study aimed on implementation of a PCR array to determine the allelic composition of soybean germplasm diversity panel (200 genotypes) for early maturity (*E1-E4*, *E7*, *E9* and *E10*), pod shattering (*qPHD1*) and growth determination (*Dt1*) genes.**

## Materials

**The tested soybean genotypes (200) came from the Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences germplasm collection gathering accessions obtained from Soybean Germplasm Collection, NPGS (USA), Plant Gene Resources of Canada (Canada), Japanese Soybean Core Collection, NIAS (Japan), Leguminous Crops Genetic Resources Department from N. I. Vavilov Research Institute of Plant Industry (Russia) and varieties from China and European countries.**

## Methods

**In the present study, a PCR array has been implemented (Figure 1), targeting early maturity (*E1-E4*, *E7*, *E9* and *E10*), pod shattering (*qPHD1*) and growth determination (*Dt1*) genes. This array was optimized for routine screening and subsequently 31 markers were used for genotyping of soybean germplasm diversity panel (200 accessions). All genotypes were phenotyping in 3-year field trials for phenological, morphological and yield components traits. An analysis of the correlation between the polymorphism of molecular markers and evaluated traits was conducted. To perform these calculations, the alleles conferring earliness, determinate growth, and non-shattering were coded as 1, while the opposite (wild) alleles were coded as 2. The point-biserial correlation coefficients and the probability values associated with the two-tailed Student's t-distribution were calculated.**

## Results

**The studied collection of soybean genotypes was genetically very diverse in terms of the presence of alleles of genes conferring earliness, shoot determination and pod shattering. The markers used allowed for the assessment of the allelic composition for all tested genes (Table 1). 35 alleles were identified in total: 15 dominant and 20 recessive. Genotyping of soybean diversity panel with the PCR array revealed 41 allelic combinations when simple classification to recessive or dominant alleles was applied, whereas when diversity among dominant or recessive alleles was taken into account, the number of identified combinations raised to 98. Significant correlations between studied traits and allelic phases of analyzed genes were identified (Table 2).**

**Identified alleles:**

**Dominant: *Dt1, Dt1 (dt1-b), E1, E2-in, E3-Mi, E3-Ha, E3-Mo, E4, E7, E9-Harosoy, E9-Hayahikari , E9-SNP#17, E9-indel10, E10, qPHD1(G)***

**Recessive: *e1-as, e1-fs, e1-nl, e2, e3-ns, e3-fs, e3-tr, e4-kam, e4-kes, e4-SORE-1, e7, e9-Toyomusume, e10-3UTRSNP, e10-exonSNP, dt1-b/dt1-tb, dt1-b/dt1-ab, dt1-tb, dt1-ab, dt1-ta, qPHD1(A)***




**Figure 1.** Sample electropherogram of the E4_22 marker for the *E4* gene.

**Table 1.** Selected allelic combinations of *Dt1*, *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E9*, *E10* and *qPHD1* genes identified in analyzed soybean germplasm diversity panel.

| Genotype | Dt1 | E1 | E2 | E3 | E4 | E9 | E10 | qPHD1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Prawda | Dt1 (dt1-b) | e1-nl | e2 | e3-tr | e4-SORE-1 | E9-Haro | E10 | A |
| Kasadka | dt1-b, dt1-tb | e1-as | e2 | e3-ns | e4-kes | E9-Haro | E10 | A |
| Megeva | dt1-b, dt1-tb | e1-as | e2 | e3-ns | e4-SORE-1 | E9-Haro | E10 | A |
| SG Anser | Dt1 | e1-nl | e2 | e3-tr | e4-SORE-1 | E9-Haro | E10 | A |
| Mauta | Dt1 (dt1-b) | e1-nl | e2 | e3-tr | e4-SORE-1 | E9-Haro | E10 | A |
| Kirovgradska 5 | Dt1 (dt1-b) | e1-as | e2 | e3-fs | E4 | E9-Haro | E10 | A |
| X 827 a 5 B | dt1-ab | e1-as | e2 | e3-tr | E4 | E9-Haya, E9-indel10 | E10 | A |
| Mazowiecka II | Dt1 | e1-as | e2 | e3-tr | E4 | E9-Haro | E10 | A |
| GL Hermine | Dt1-b | e1-as | e2 | e3-tr | E4 | E9-Haro | E10 | A |
| Aleta | Dt1 | e1-nl | e2 | e3-fs | E4 | E9-Haro | E10 | A |
| Pompei | Dt1 | e1-nl | e2 | E3-Ha | e4-SORE-1 | E9-Haro | E10 | A |
| Pripyat | Dt1 | e1-nl | e2 | E3-Ha | e4-SORE-1 | E9-Haro | E10 | A |
| Antonia | Dt1 | e1-nl | e2 | E3-Ha | e4-SORE-1 | E9-Haro | E10 | A |
| Megeva | Dt1 (dt1-b) | e1-as | E2-in | e3-fs | e4-kes | E9-Haro | E10 | A |
| Nadezda | dt1-ab | E1 | e2 | e3-tr | e4-kam | E9-Haya, E9-indel10 | E10 | G |
| Timirjazevscaja 144 | dt1-b, dt1-ab | E1 | e2 | e3-tr | E4 | E9-Haro | E10 | G |
| Proteix | Dt1-b | E1 | e2 | e3-tr | E4 | E9-Haro | E10 | A |
| Kariyutaka | dt1-b, dt1-ab | E1 | E2-in | e3-tr | e4-SORE-1 | E9-Haro | E10 | A |
| Harosoy | dt1-ta | e1-as | E2-in | e3-tr | E4 | E9-indel10 | E10 | G |
| Grignon 21 | Dt1-b | e1-as | e2 | E3-Mi | E4 | E9-Haro | E10 | A |
| Dongnong 58 | Dt1 | e1-nl | e2 | E3-Ha | E4 | E9-Haro | E10 | G |
| Heihe 43 | Dt1 | e1-nl | e2 | E3-Ha | E4 | E9-Haro | E10 | A |
| Kabott | Dt1 | e1-as | E2-in | E3-Ha | E4 | E9-Haro | E10 | A |
| Norman | Dt1 | e1-as | E2-in | E3-Mo | E4 | E9-Haya | e10_3'UTRSNP | G |
| Dangke 1 | Dt1 | e1-nl | E2-in | E3-Ha | e4-SORE-1 | E9-Haro | E10 | A |
| Castetis | Dt1 | E1 | e2 | E3-Ha | E4 | E9-Haro | E10 | A |
| Habaro | dt1-b, dt1-tb | E1 | e2 | E3-Mi | E4 | E9-Haro | E10 | A |
| Capital | Dt1 | e1-as | E2-in | E3-Mo | E4 | E9-Haro | e10-3'UTRSNP | A |
| 546 | dt1-b, dt1-ab | E1 | e2 | e3-tr | E4 | E9-Haya | E10 | G |

qPHD1: A – non-shattering allele, G – shattering allele

**Table 2.** The values of the point-biserial correlation coefficients calculated between the dates of the phenological phases of soybean – flowering (1) and maturity (2), the values of morphological traits – plant height (3), first pod height (4) and number of branches (5), the values of yield-related traits – number of pods (6), number of seeds (7), weight of seeds per plant (8), number of seeds per pod (9) and thousand grain weight (10), and the allelic phases of *Dt1*, *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E10* and *qPHD1* genes and selected combinations. A positive value of coefficient (red) indicates a positive correlation of the studied trait with the "wild" allele.

| Gene | Year | Trait 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Dt1 | 2021 | | | | | | | | | | |
| | 2022 | | | | | | | | | | |
| E1 | 2021 | | | | | | | | | | |
| | 2022 | | | | | | | | | | |
| E2 | 2021 | | | | | | | | | | |
| | 2022 | | | | | | | | | | |
| E3 | 2021 | | | | | | | | | | |
| | 2022 | | | | | | | | | | |
| E4 | 2021 | | | | | | | | | | |
| | 2022 | | | | | | | | | | |
| E10 | 2021 | | | | | | | | | | |
| | 2022 | | | | | | | | | | |
| qPHD1 | 2021 | | | | | | | | | | |
| | 2022 | | | | | | | | | | |
| Dt1, E3, E4 | 2021 | | | | | | | | | | |
| | 2022 | | | | | | | | | | |
| Dt1, E3, E4, -qPHD1 | 2021 | | | | | | | | | | |
| | 2022 | | | | | | | | | | |
| Dt1, E1, E2, E3, E4 | 2021 | | | | | | | | | | |
| | 2022 | | | | | | | | | | |
| Dt1, E1, E2, E3, E4, -qPHD1 | 2021 | | | | | | | | | | |
| | 2022 | | | | | | | | | | |
| Dt1, E2, E3, E4 | 2021 | | | | | | | | | | |
| | 2022 | | | | | | | | | | |
| Dt1, E2, E3, E4, -qPHD1 | 2021 | | | | | | | | | | |
| | 2022 | | | | | | | | | | |

-0.50 -0.40 -0.30 -0.20 -0.10 0.00 0.10 0.20 0.30 0.40 0.50 0.60 0.70

## Conclusions

1. **The study showed a huge genetic diversity of tested germplasm (almost every second genotype had a different combinations of alleles) and demonstrated high applicability of PCR array for molecular selection of soybean towards adaptation to Polish agroclimatic conditions.**
2. **The arrangement of alleles associated with high yield encompassed dominant alleles for the *Dt1*, *E3* and *E4* genes and the recessive allele for the *qPHD1* gene. Since this arrangement simultaneously determines the considerable height of the plants and the late maturity date, it may be unfavorable in northern regions of Poland.**
3. **A specific allele arrangements should be selected for each region in Poland due to differences in the length of growing season and photoperiod.**


## Acknowledgements

**This study received funding from the Polish Ministry of Agriculture and Rural Development, Poland (Basic Research for Biological Progress in Crop Production, Project No 20).**