

NOVÁ METODA IDENTIFIKACE GENOTYPU PAVMYB10.1 ZODPOVĚDNÉHO ZA BARVU PLODU TŘEŠNÍ

A NEW METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF PAVMYB10.1 GENOTYPE RESPONSIBLE FOR A SWEET CHERRY FRUIT COLOUR

Ivona Žďárská, Jana Čmejlová, Veronika Nekvindová, Radek Čmejla

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,
508 01 Holovousy

e-mail: ivona.zdarska@vsuo.cz

ABSTRACT

The colour of the skin is one of the most significant qualitative trait of cherries. Therefore, for breeding purposes, it is good to know the genotype that underlies a specific manifestation of this trait. Based on the known genetic information it is possible to develop molecular markers, thanks to which we can determine the skin fruit colour from the first leaves of the offspring of the targeted crossing. Skin colour genotype determination has so far been carried out by cloning and sequencing because the translation factor PavMYB10.1 responsible for the cherry fruit colour belongs to the *MYB* gene family that is hard to analyse by PCR only. However, this procedure is quite time-consuming and expensive, so we decided to simplify the process by using real-time PCR allelic discrimination. This method can determine PavMYB10.1 genotypes very quickly and reliably and in homozygous genotypes it is possible to accurately determine the fruit skin colour of a certain cultivar or hybrid. This new method is therefore applicable in the process of MAS (marker assisted selection).

Keywords: *Prunus avium* L., allelic discrimination, real-time PCR, skin colour

Barva slupky patří u třešně mezi velmi významný kvalitativní znak. Pro účely šlechtění je tedy dobré znát genotyp, který stojí za konkrétním projevem tohoto znaku. Na základě známé genetické informace je možné vyvinout molekulární markery, díky kterým můžeme už z prvních listů potomstva cíleného křížení určit, jakou barvu budou mít plody. Určování genotypu se u barvy třešně doposud provádělo klonováním a sekvenací, protože translační faktor PavMYB10.1 zodpovědný za barvu plodu u třešně patří do genové rodiny *MYB*, která se obtížně analyzuje pouze pomocí PCR. Tento postup je však časově a finančně dosti náročný, proto jsme se rozhodli celý proces zjednodušit využitím metody alelické diskriminace pomocí real-time PCR. Tato metoda dokáže velmi rychle a spolehlivě determinovat genotypy PavMYB10.1 a u homozygotních genotypů je možné přesně určit barvu plodu dané odrůdy či hybridu. Námi optimalizovaná metoda je tedy využitelná v procesu MAS (selektce pomocí molekulárních markerů).

Klíčová slova: *Prunus avium* L., alelická diskriminace, real-time PCR, barva slupky

Třešně (*Prunus avium* L.) patří mezi velmi oblíbený ovocný druh pěstovaný téměř po celém světě. Plody jsou ceněny díky šťavnaté a chutné dužnině, také jako zdroj mnoha živin a zdraví prospěšných látek a kromě toho patří mezi první dozrávající ovoce v sezóně (Liu *et al.* 2011). V současnosti existují tisíce odrůd třešní s různými kvalitativními vlastnostmi, mezi které řadíme i barvu slupky. Barva slupky se u jednotlivých odrůd liší od temně červené až po světle žlutou. Preference konzumentů na barvu plodu se rovněž liší a lze říci, že v amerických a evropských zemích je největší poptávka po tmavočerveně zbarvených plodech, kdežto v asijských zemích naopak upřednostňují třešně pestré až světle žluté. Těto poptávce se přizpůsobují i šlechtitelé a pěstitelé a vzhledem k tomu, že v dnešní době není problém dovážet ovoce do velkých vzdáleností, celosvětově se zvyšuje produkce pestrých a žlutých třešní právě pro dovoz na asijský trh (Suran *et al.* 2018). Určitou nevýhodou žlutých a pestrých třešní je, že jen málo odrůd dosahuje současných kvalitativních požadavků červených třešní, problémem je kupříkladu velká otláčitelnost plodů nebo méně kvalitní chuťové vlastnosti. Jedním z cílů šlechtitelů třešní je proto tvorba hodnotných světlých odrůd. Šlechtitelský proces je však velmi náročný na čas, proto jsou hledány metody, které by mohly tento proces značně urychlit. Jednou z možností je použití molekulárně genetických analýz, kdy je pomocí molekulárních markerů možné genotypy s požadovanou vlastností (např. barva slupky plodu) vyselektovat již v prvním roce života semenáče. Neperspektivní jedinci z hlediska barvy pak nemusí být udržováni a ošetřováni v populaci hybridů až do doby zrání prvních plodů, ke kterému dochází zpravidla po 5 až 6 letech od výsevu při pěstování na vlastních kořenech.

Hlavními pigmenty u vyšších rostlin, které zodpovídají za modrou, fialovou a červenou barvu, jsou antokyany (He and Giusti 2010). Rozdíl mezi červeným a žlutým plodem třešně je tedy v přítomnosti nebo absenci antokyanů (Jin *et al.* 2016). U ovocných plodin je známo, že důležitými regulátory biosyntézy antokyanů jsou transkripční faktory R2R3-MYB, které regulují expresi dalších genů zapojených do této

biosyntézy (Shen *et al.* 2014). První takový gen identifikovaný v čeledi *Rosaceae* byl jablečný *MdMYB10* (Tako *et al.* 2006) a následně byla klonována řada homologních genů, mezi kterými byly také geny z třešně (Lin-Wang *et al.* 2010). Expresní analýza odlišných variant genu *MYB10* izolovaných z třešní ukázala, že u odrůd z vysokým obsahem antokyanů byla nejvíce exprimovaná varianta *PaMYB10.1* nacházející se v LG3 (Starkevič *et al.* 2015), což naznačuje, že právě oblast tohoto genu by mohla být dobrým molekulárním markerem pro určení barvy u plodů třešní. Jin *et al.* (2016) provedli studii, ve které identifikovali tři alely genu *PavMYB10.1*, které mají přímou souvislost s barvou třešní. Tyto alely pojmenovali *PavMYB10.1a*, *PavMYB10.1b* a *PavMYB10.1c*. Alela *PavMYB10.1a* podle tohoto článku determinovala červené zbarvení slupky plodu, alela *PavMYB10.1b* pestré zbarvení a alela *PavMYB10.1c* žluté zbarvení. Pro alelu *PavMYB10.1a* byla určujícím znakem sekvence divokého typu (WT) s výskytem AAAAA (5A) v inkriminované oblasti, která umožňuje expresi celého predikovaného proteinu. Pro alelu *PavMYB10.1b* byla charakteristická jednonukleotidová delece v této sekvenci (výskyt AAAAA; 4A), která vede k posunu čtecího rámce během translace a pravděpodobně k tvorbě nefunkčního proteinu. Pro alelu *PavMYB10.1c* je typická rozsáhlá blíže necharakterizovaná delece v kódující oblasti a výsledný protein tudíž vůbec nevzniká. Tato studie popsala na souboru 29 odrůd třešní (2 žluté, 9 pestrých a 18 červených), že transkripční faktor MYB10.1 hraje důležitou roli ve vývoji barevných znaků u třešní a může být spolehlivým molekulárním markerem pro selekci na základě barvy plodu (Jin *et al.* 2016).

MATERIÁL A METODY

Pro ověření funkčnosti nového systému analýzy barvy třešní byly vybrány odrůdy všech barev, u kterých byl *PavMYB10.1* genotyp nejdříve potvrzen sekvenačně. Celkem bylo použito 101 odrůd pocházejících z pokusných výsadeb a genofondu Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích, z čehož bylo 66 červených, 31 pestrých a 4 žluté odrůdy. Genomová DNA byla izolována z lýka pomocí komerčního kitu Exgene™ Plant SV (GeneAll®).

Koncentrace a čistota genomové DNA byly měřeny spektrofotometricky (NanoDrop Lite, Thermo Fisher Scientific).

V amplifikační reakci byly použity specifické primery pro vybranou oblast genu *PavMYB10.1*. Forwardový primer (GGTGGTCATTGATTGCTGGA) byl převzat z publikace Jin *et al.* (2016), reverzní primer (CCGTTTGAATATGGTCCAAAA) byl nově navržen, vzhledem k tomu, že reverzní primer ze zmíněné publikace nebyl dostatečně specifický pro tento gen a amplifikoval i jiné členy této genové rodiny. Amplifikační reakce probíhala prostřednictvím klasické PCR, amplifikované produkty byly rozděleny pomocí gelové elektroforézy na 3 % agarózovém gelu. Tyto fragmenty byly z gelu následně vyřezány a purifikovány komerčním kitem Expin™ Combo GP (GeneAll®). Přechištěné fragmenty sloužily jako templát v sekvenační reakci, pro kterou byl použit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit a následně BigDye XTerminator Kit (oba Thermo Fisher Scientific). Poté byly vzorky zanalyzované na genetickém analyzátoru Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific). Osekvenováno bylo všech 101 vybraných odrůd. Fragmenty byly sekvenovány z reverzního primeru, neboť oblast delece se nachází v blízkosti forwardového primeru. Sekvence byly analyzovány a komplementárně převedeny do forward orientace v programu Chromas.

Byla optimalizována nová metoda detekce barvy třešně, a sice alelická diskriminace pomocí real-time PCR. V multiplexní reakci byla použita Combi Taq DNA polymeráza 1U/μl, 10x TopBio Blue pufr complete (obojí Top-Bio), dNTP Mix 10 mM (Genaxxon) a specifický premix, který obsahoval nově navrženou sestavu primerů pro amplifikaci úseku *PavMyb10.1* (viz výše) a specifické sondy pro alely *PavMYB10.1a* (WT genotyp 5A; ATGTGAAAAATTATTGGAACACTC) značená fluoroforem HEX, *PavMYB10.1b* (genotyp 4A; ATGTGAAAATTATTGGAACACTC) značená fluoroforem FAM. Dále obsahoval primery (CGGACGGGAAGTGGTGTTC; ACGCGAGCCCCTCCTCGG) a sondu (CCGTAGGCTGAGGAGCAAAGGAGGAATC)

pro chloroplastovou DNA sloužící jako pozitivní kontrola přítomnosti amplifikovatelné DNA, tato sonda byla značená fluoroforem IRDye700. Pro real-time PCR bylo využito zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen). Byly nastaveny následující podmínky amplifikace: aktivace polymerázy a denaturace genomové DNA (94 °C/5 minut) a tříkroková amplifikace se 40 cykly (94 °C/20 s; 58 °C/20 s; 72 °C/20 s). Možnost analýzy vzorků metodou alelické diskriminace je součástí softwaru zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Pomocí sekvenace a metody alelické diskriminace v real-time PCR uspořádání byla na 101 vzorcích třešně potvrzena přítomnost všech tří alel popsanych v práci Jin *et al.* (2016): alela *PavMYB10.1a* byla charakteristická sekvencí 5A a alelu *PavMYB10.1b* charakterizovala sekvence 4A. Alela *PavMYB10.1c* se neamplifikovala v důsledku rozsáhlé delece v kódující oblasti, přítomnost amplifikovatelné DNA v reakci však byla potvrzena prostřednictvím kontrolního genu (chloroplastový 16S rRNA gen). Na základě výše popsanych alel byly u analyzovaných diploidních třešně identifikovány 4 genotypy: homozygotní genotyp 5A/5A, typický pro červeně zbarvené třešně; homozygotní genotyp 4A/4A, typický pro pestré třešně; homozygotní nulový genotyp *PavMYB10.1c*, typický pro žlutě zbarvené třešně; heterozygotní genotyp 4A/5A, který se vyskytoval jak u červených, tak u pestrých třešně. Obrázek 1 a) – d) ukazuje porovnání sekvencí jednotlivých genotypů s výstupem použité metody alelické diskriminace. Celkem bylo otestováno 35 homozygotů 5A, 43 heterozygotů 4A/5A, 19 homozygotů 4A a 4 homozygoti s nulovými alelami. U všech analyzovaných vzorků poskytla metoda alelické diskriminace v real-time PCR uspořádání 100% identické výsledky jako sekvenování. Tato nová metoda je tedy spolehlivá a vhodná pro identifikaci *PavMYB10.1* genotypu.

Kvůli výskytu nulové alely (alela *PavMYB10.1c*) nelze zcela vyloučit možnost, že některý domněle homozygotní genotyp může tuto alelu obsahovat. Analýze heterozygotních genotypů, které obsahují nulovou alelu *PavMYB10.1c*, se budeme věnovat v další práci, a to využitím

cíleného křížení za účelem vytvoření těchto genotypů, které nejsou momentálně k dispozici.

Problém molekulárního vyhodnocování barvy plodu představuje fakt, že heterozygotní genotyp 4A/5A se vyskytuje u červených i u pestrých třešní, tuto kombinaci alel však původní článek Jin *et al.* (2016) u pestrých třešní nepopisuje. Z celkového počtu 66 červeně zbarvených odrůd byl heterozygotní genotyp nalezen u 31 vzorků, což představuje 47 %, a z celkového počtu 31 pestrých odrůd byl heterozygotní genotyp nalezen u 12 vzorků, což představuje 38,7 %. Naše výsledky tedy nepotvrzují závěry z práce Jin *et al.* (2016), že alela *PavMYB10.1a* dominuje alele *PavMYB10.1b*. Podle našich výsledků musí mít u heterozygotního genotypu na determinaci barvy vliv ještě další faktor, který se doposud nepodařilo objasnit. Tuto neprůkaznost MYB10.1 markeru u heterozygotního genotypu jsme se pokusili řešit použitím publikovaného SSR markeru *Pav_Rf_SSR*, pomocí kterého se povedlo úspěšně odlišit naprostou většinu červených a pestrých třešní v populaci vybraných severoamerických odrůd (Sandfur *et al.* 2016). Avšak v kolekci našich a dalších světových odrůd se nepovedlo tento marker úspěšně aplikovat vzhledem k tomu, že neinformativní alely tvořily 36,3 % analyzovaných alel a u 48,4 % odrůd nešlo na základě tohoto molekulárního markeru o barvě rozhodnout (nepublikovaná data). Z těchto důvodů není ani tento marker v našich podmínkách zcela použitelný pro selekci pomocí molekulárních markerů a použití alelické diskriminace stanovení genotypu *PavMYB10.1* se jeví při určování barvy v našich podmínkách

jako spolehlivější (stanovený genotyp tohoto genu v 58,4 % odrůd determinoval barvu plodů). V každém případě bude třeba další výzkum faktorů ovlivňujících barvu plodů třešně, aby mohlo být zbarvení plodů spolehlivě identifikováno u všech genotypů.

ZÁVĚR

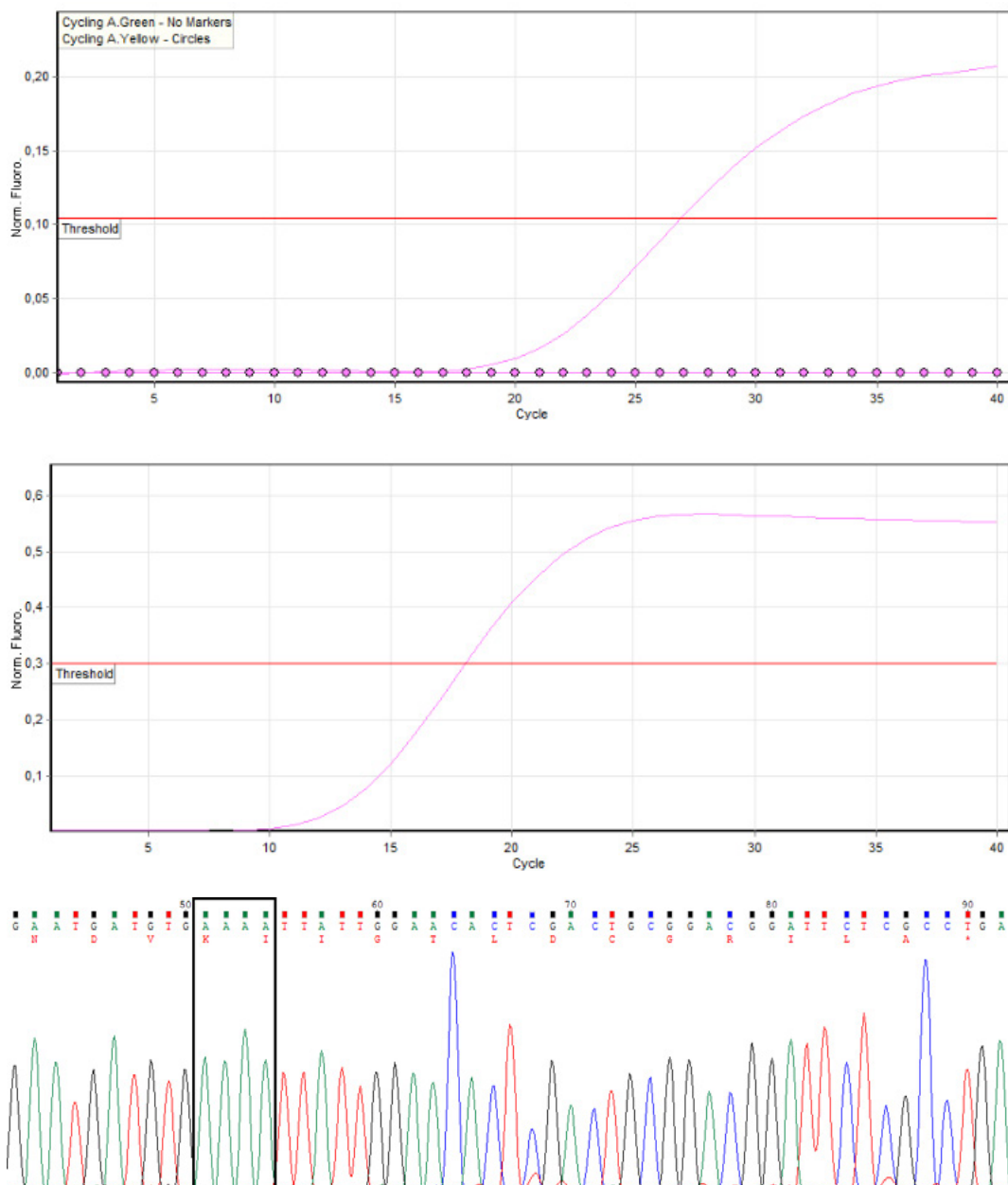
Určování genotypu u velkého počtu vzorků pomocí sekvenace je nejen časově, ale i finančně náročné. Z toho důvodu byl za účelem určení tak důležitého kvalitativního znaku, jako je barva třešní, zoptimalizován postup metody alelické diskriminace pomocí real-time PCR, který celý proces výrazně zjednoduší, zrychlí a zlevní. Prostřednictvím této metody je možné otestovat 70 *PavMYB10.1* genotypů v jednom běhu, výsledky jsou známy za cca 80 minut. Celkem bylo otestováno 35 homozygotů 5A, 43 heterozygotů 5A/4A, 19 homozygotů 4A a 4 homozygoti s nulovými alelami. Ve všech případech potvrdila nová metoda s využitím alelické diskriminace sekvenační nálezy, a je tedy 100% spolehlivá pro identifikaci *PavMYB10.1* genotypu. U odrůd s homozygotním genotypem je možné jednoznačně určit barvu plodu, a to červenou, žlutou anebo pestrou. Při výskytu heterozygotního genotypu 5A/4A však nelze odlišit červenou a pestrou barvu plodu. Nicméně, i přes tuto skutečnost lze konstatovat, že tento marker je využitelný v MAS (molecular assisted selection) a může přispět k racionalizaci šlechtitelského procesu třešní.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla realizována za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I – LO1608 „Výzkumné ovocnářské centrum“.

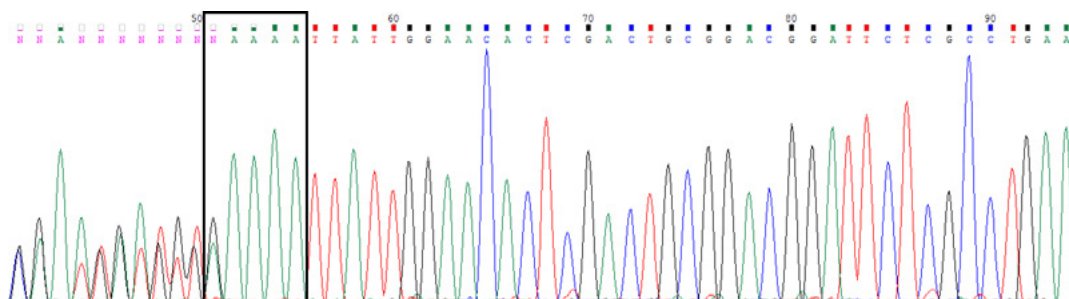
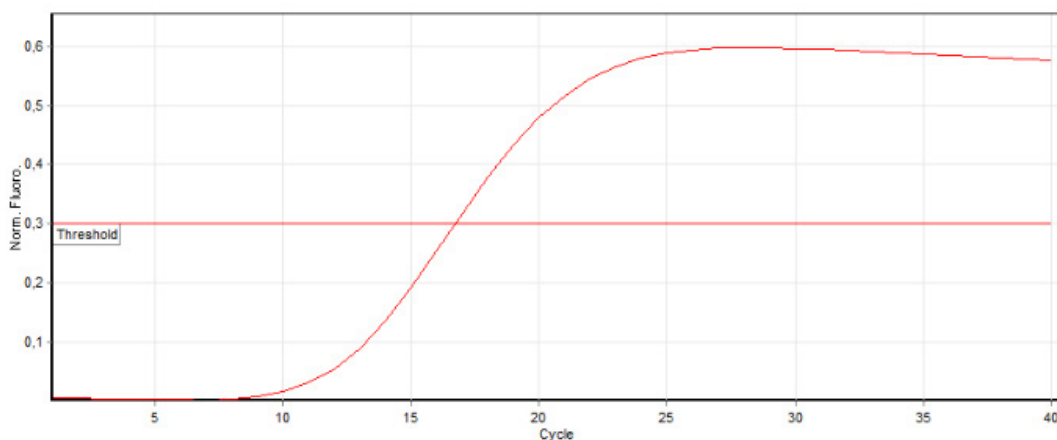
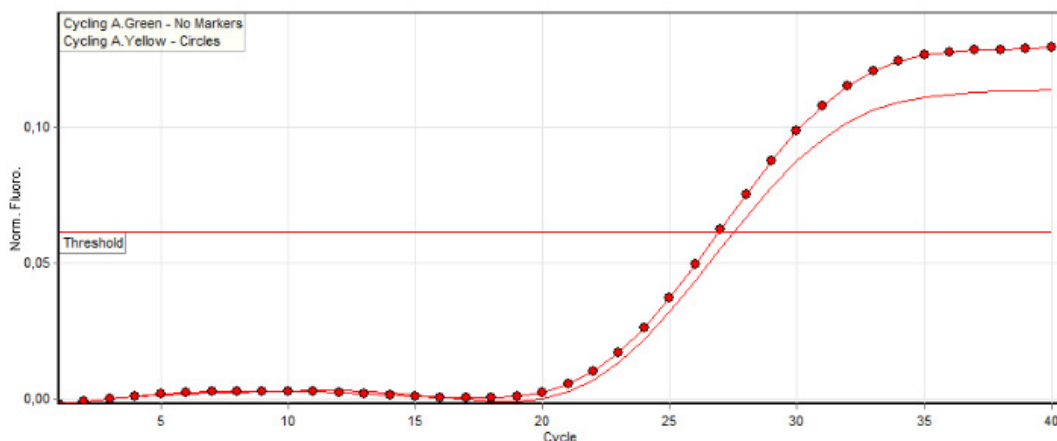
LITERATURA

- HE, J. and M.M. GIUSTI. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology*. 2010, 1:163–187. DOI: 10.1146/annurev.food.080708.100754.
- JIN, W., H. WANG, M. LI, J. WANG, Y. YANG, X. ZHANG, G. YAN, H. ZHANG, J. LIU and K. ZHANG. The R2R3 MYB transcription factor PavMYB10.1 involves in anthocyanin biosynthesis and determines fruit skin colour in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Biotechnology Journal*. 2016, (14): 2120–2133. DOI: 10.1111/pbi.12568.
- LIN-WANG, K., K. BOLITHO, K. GRAFTON, A. KORTSTEE, S. KARUNAIRETNAM, T.K. McGHIE, R.V. ESPLEY, R.P. HELLENS and A.C. ALLAN. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Rosaceae*. *BMC plant biology*. 2010, (10): 50. DOI: 10.1186/1471-2229-10-50.
- LIU, Y., X. LIU, F. ZHONG, R. TIAN, K. ZHANG, X. ZHANG and T. LI. Comparative study of phenolic compounds and antioxidant activity in different species of cherries. *Journal of food science*. 2011, 76(4): 633–638. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02150.x.
- SANDEFUR, P., N. ORAGUZIE and C. PEACE. A DNA test for routine prediction in breeding of sweet cherry fruit color, Pav-Rf-SSR. *Molecular breeding*. 2016, (36): 33. DOI: 10.1007/s11032-016-0458-y.
- SHEN, X., K. ZHAO, L. LIU, K. ZHANG, H. YUAN, X. LIAO, Q. WANG, X. GUO, F. LI and T. LI. A role for PacMYBA in ABA-regulated anthocyanin biosynthesis in red-colored sweet cherry cv. Hong Deng (*Prunus avium* L.). *Plant & cell physiology*. 2014, 55(5): 862–880. DOI: 10.1093/pcp/pcu013.
- STARKEVIČ, P., J. PAUKŠTYTĖ, V. KAZANAČIŪTĖ, E. DENKOVSKIENĖ, V. STANYS and V. BENDOKAS. Expression and anthocyanin biosynthesis-modulating potential of sweet cherry (*Prunus avium* L.) *MYB10* and *bHLH* genes. *PLoS ONE*. 2015, 10(5): e0126991. DOI: 10.1371/journal.pone.0126991.
- SURAN, P., L. ZELENÝ a V. DANKOVÁ. Nové odrůdy peckovin pro pěstování v ČR. *Zahradnictví*. 2018, 17(10): 14–17. ISSN 1213-7596.
- TAKOS, A.M., F.W. JAFFE, S.R. JACOB, J. BOGS, S.P. ROBINSON and A.R. WALKER. Light-induced expression of a *MYB* gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Plant physiology*. 2006, 142(3): 1216–1232. DOI: 10.1104/pp.106.088104.



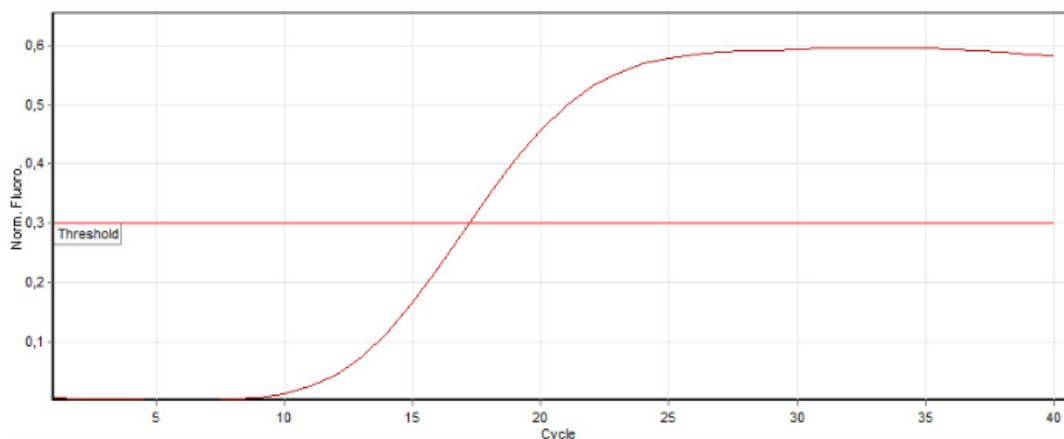
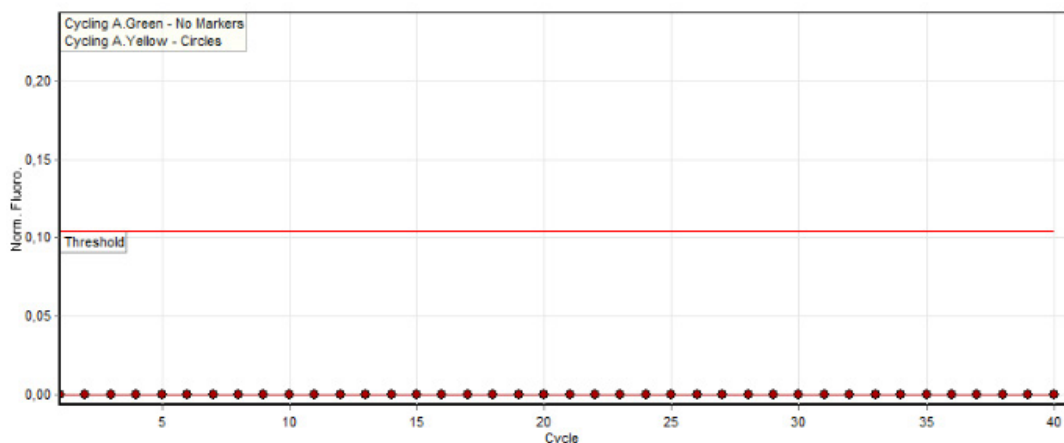
b) Genotyp 4A/4A (alela *PavMYB10.1b*; mutovaná): Na obrázku vlevo je výsledek alelické diskriminace, vedle je obrázek amplifikovaného kontrolního genu a na spodním obrázku je sekvence příslušné oblasti obsahující 4A. Na spodním obrázku je zobrazena rovněž odpovídající proteinová sekvence mutovaného proteinu, kdy dochází k posunu čtecího rámce a tvorbě předčasného stop kodonu (označen *).

b) Genotype 4A/4A (allele *PavMYB10.1b*; mutated): The picture on the left shows the result of allelic discrimination assay, the next picture shows the amplified control gene, and the bottom picture shows the sequence of the region containing 4A as well as related translation of mutated protein. The deletion leads to reading frameshift and premature stop codon formation (indicated by *).



c) Genotyp 5A/4A (alely *PavMYB10.1a/PavMYB10.1b*; WT/mutovaná): Na obrázku vlevo je výsledek alelické diskriminace, vedle je obrázek amplifikovaného kontrolního genu a na spodním obrázku je sekvence příslušné oblasti obsahující směšnou sekvenci 5A/4A.

c) Genotyp 5A/4A (alleles *PavMYB10.1a/PavMYB10.1b*; WT/mutated): The picture on the left shows the result of allelic discrimination assay, the next picture shows the amplified control gene, and the bottom picture shows the sequence of the region containing a mixed sequence of 5A/4A.



d) Nulový genotyp (alela *PavMYB10.1c*; deletovaná): Na obrázku vlevo je výsledek alelické diskriminace, kdy nevzniká žádný amplicon, ale kontrolní gen je jasně amplifikován (obrázek vedle). Alela *PavMYB10.1c* je charakterizována rozsáhlou delecí, nelze ji tedy amplifikovat pomocí PCR ani sekvenovat, a protein tudíž vůbec nevzniká.

*d) Null genotype (allele *PavMYB10.1c*; deleted): The picture on the left shows the result of allelic discrimination assay with no amplicons, but the control gene is clearly amplified (picture on the right). Since the *PavMYB10.1c* allele is characterized by a large deletion, it cannot be PCR amplified nor sequenced, and the protein is not produced at all.*