

УДК 634.11:57.5

**АНАЛИЗ АЛЛЕЛЬНОГО
ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ
MD-EXP7 И MD-PG1,
ДЕТЕРМИНИРУЮЩИХ ПРИЗНАКИ
КАЧЕСТВА ПЛОДОВ, У
СОВРЕМЕННЫХ И АВТОХТОННЫХ
СОРТОВ ЯБЛОНИ КРЫМА ***

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук
зав. лабораторией генетики
и микробиологии

*Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Северо-Кавказский
зональный научно-исследовательский
институт садоводства и
виноградарства»
Краснодар, Россия*

Володин Виталий Александрович
аспирант

*Национальный институт винограда
и вина «Магарах», Ялта, АР Крым*

Токмаков Сергей Вячеславович
канд. биол. наук,
науч. сотрудник лаборатории
генетики и микробиологии

*Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Северо-Кавказский
зональный научно-исследовательский
институт садоводства и
виноградарства»
Краснодар, Россия*

Щербатко Валерий Дмитриевич
канд. с.-х. наук,
зав. сектором предгорного садоводства
лаборатории южных плодовых культур

*Крымская помологическая станция
Никитского ботанического сада,
Севастополь, АР Крым*

UDC 634.11:57.5

**THE ANALYSIS OF ALLELIC
POLYMORPHISM OF MD-EXP7
AND MD-PG1 GENES,
DETERMINING QUALITY TRAITS
OF APPLE FRUITS OF MODERN
AND INDIGENOUS
CRIMEAN APPLE VARIETIES**

Suprun Ivan
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Genetics
and Microbiology

*Federal State Budget Scientific
Organization "North Caucasian
Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture",
Krasnodar, Russia*

Volodin Vitaliy
Post Graduate

*National Institute for Vine and Wine
"Magarach", Yalta, Crimea*

Tokmakov Sergey
Cand. Biol. Sci.
Research Associate of Laboratory
of Genetics and Microbiology

*Federal State Budget Scientific
Organization "North Caucasian Regional
Research Institute of Horticulture
and Viticulture", Krasnodar, Russia*

Shcherbatko Valeriy
Cand. Agr. Sci.
Head of Sector of Foothill gardening
of Laboratory of Southern fruit crops

*Crimean Pomology Station
of Nikitsky Botanical Garden,
Sevastopol, Crimea*

* Исследования выполнены в рамках проекта РФФИ № 14-34-50931 мол_нр и госзадания ФАНО

Изучен аллельный полиморфизм двух генов яблони, влияющих на плотность и текстуру мякоти плодов – *Md-EXP7* и *Md-PG1* – у 21 современного и автохтонного (народной селекции) сорта яблони Крыма. В работе использованы микросателлитные маркеры к указанным геном, меченые флуоресцентными красителями. В результате по гену *Md-EXP7* выявлено 9 гетерозиготных образцов (аллельные комбинации 198:202; 202:206; 202:214) и 11 гомозиготных образцов (аллели 200:200 и 202:202 п. н.). По локусу гена *Md-PG1* идентифицировано 14 гомозиготных образцов с аллельной комбинацией 298:298 и 7 гетерозиготных образцов (аллели 288:298 и 291:298). Известно, что чем короче микросателлитный повтор маркера *Md-EXP7*, тем плотнее мякоть плода: наиболее ценными генотипами являлись Синап белый, Синап судакский, Амулет, Балаклавское и Татарское зимнее. По маркеру *Md-PG1* наиболее ценными оказались сорта Амулет, Балаклавское, Демир Алма, Кандиль синап, Салгирское и Синап белый с аллельным набором 288:298, а также сорта Румянка крымская и Татарское зимнее с аллельным набором 291:298. Рассмотрение результатов анализа аллельного полиморфизма и комбинаций аллелей гена *Md-EXP7* у автохтонных сортов Крыма показало, что 9 из 11 сортов народной селекции несут аллели 198, 200 или 202 п.н., определяющие высокий (198) или средний уровень плотности (200 и 202 п.н). На основании этих данных можно сделать предположение о наличии целенаправленного отбора форм яблони по признаку «качество плодов» в процессе народной селекции яблони в регионе происхождения изученных сортов.

Ключевые слова: ЯБЛОНЯ, КАЧЕСТВО ПЛОДОВ, *MD-EXP7*, *MD-PG1*, АБОРИГЕННЫЙ ГЕНОФОНД, АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ, МАРКЕРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ

Allelic polymorphism of two apple-tree *Md-EXP7* and *Md-PG1* genes affected the density and the texture of fruits pulp of 21 modern and autochthonic (national breeding) apple-tree varieties of the Crimean are studied. The microsatellite markers to the specified genes, marked by fluorescent colors are used in the work. As result on a gene of *Md-EXP7* 9 heterozygotic samples (allelic combinations 198:202; 202:206; 202:214) and 11 homozygotic samples (alleles 200:200 and 202:202) are revealed. On a locus of *Md-PG1* gene 14 homozygotic samples with an allelic combination 298:298 and 7 heterozygotic samples (alleles 288:298 and 291:298) are identified. It is known when the microsatellite repetition of *Md-EXP7* marker is shorter, the fruit pulp is more dense: were Sinap white, Sinap Sudaksky, Amulet, Balaklavskoye and Tatar winter were the most valuable genotypes. On *Md-PG1* marker the most valuable were the Amulet, Balaklavskoye, Demir Alma, Kandil Sinap, Salgirskeye and Sinap white with an allelic set 288:298, and also the Rumyanka Crimean and Tatarskoye winter with an allelic set 291:298. The consideration of results of the analysis of allelic polymorphism and combinations of alleles of *Md-EXP7* gene of autochthonic Crimea varieties showed that 9 from 11 of national breeding varieties have the alleles of 198, 200 or 202 defining the high (198) or the average level of density (200 and 202). On the basis of its data it is possible to assume the existence of purposeful selection of an apple-tree forms by sign "quality of fruits" in the course of national breeding of an apple-tree in the region of studied varieties origin.

Key words: APPLE, FRUIT QUALITY, *MD-EXP7*, *MD-PG1*, INDIGENOUS GERMPLASM, ALLELIC DIVERSITY, MARKER-ASSISTED BREEDING

Введение. В процессе созревания плоды претерпевают ряд физиологических и биохимических изменений, в конечном счете, определяющих их органолептические характеристики, обуславливающие потребительский интерес. Среди комплекса этих сложных процессов размягчение мякоти является наиболее очевидным изменением, влияющим на сенсорные характеристики плодов. Чрезмерное размягчение не только делает фрукты менее привлекательными для потребителей, но также и увеличивает стоимость самой продукции, так как транспортировка и хранение таких плодов связаны с дополнительными затратами, и такие плоды больше подвержены заболеваниям.

Процесс размягчения плодов при хранении включает комплексные перестройки в архитектонике клеточных стенок, вызываемые энзиматическим гидролизом полисахаридов. Несколько гидролаз, вовлеченных в этот процесс, действуют на ковалентные связи, удерживающие вместе полисахариды различных классов. Тем не менее, было показано, что известные энзимы клеточных стенок (эндо-1,4- β -глюканаза, пектин-метил-эстераза, пектат-лиаза, гликозидаза) не могут полностью объяснить процесс размягчения [1].

Было установлено также достоверное влияние ферментов экспансинов на деполимеризацию полисахаридов клеточной стенки, приводящую к размягчению плодов. Один из генов, контролирующих уровень активности экспансина у яблоки, – ген *Md-EXP7* локализован на 1-й хромосоме [2, 3].

Согласно двухступенчатой модели регуляции, первый этап размягчения мякоти плодов обусловлен действием экспансинов, в то время как на втором этапе данный процесс детерминирован ферментами полигалактуроназами [4].

У яблоки в процессе хранения плодов под влиянием этилена на активность ферментных систем происходит ферментативное разрушение клеточных стенок и ламеллярного слоя в плодах. Один из этих ферментов <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/03/01.pdf>. 3

– полигалактуроназа вовлечен в процесс деградации пектина, который приводит к размягчению богатых пектином слоев ткани плодов. Главный локус количественного признака (major QTL) *Md-PG1* яблони детерминирует активность этилен-зависимой эндополигалактуроназы и достоверно влияет на процесс размягчения мякоти плодов при хранении [3, 5, 6].

В селекции на высокое качество плодов применение ДНК-маркеров для идентификации аллелей целевых генов имеет важное значение. Это обусловлено возможностью выявления селекционно-ценных форм, несущих аллельный набор, детерминирующий высокие показатели качества плодов, на ранних этапах вегетации – до вступления гибридных форм в плодоношение.

Таким образом, появляется возможность провести отбор и выбраковку сеянцев с «нежелательными» аллелями уже на первом году жизни сеянцев, что позволяет существенно сократить объем селекционного материала и повысить экономическую эффективность селекции.

Для генов *Md-EXP7* и *Md-PG1* в настоящее время идентифицированы функциональные ДНК маркеры – SSR-локусы, косегрегирующие с данными генами [2, 7]. Длина микросателлитного повтора достоверно взаимосвязана с уровнем экспрессии гена *Md-EXP7* и плотностью мякоти, соответственно.

Было показано, что при наличии аллели с размером амплифицированной последовательности 198 пар нуклеотидов (п. н.), показатель плотности будет максимальным, размер аллелей 202 п.н. характеризует средний уровень показателя. При размере аллелей 214 п.н. показатель плотности будет наиболее низким [2].

Для гена *Md-PG1* также присутствие комбинаций аллелей с разной длиной SSR повтора влияет на показатели плотности при хранении. Сочетание аллелей 288:298 и 291:298 достоверно соответствует среднему уровню активности этилен-зависимой полигалактуроназы, что препятствует <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/03/01.pdf>. 4

значительному снижению плотности мякоти [7, 8]. Очевидно, что указанные ДНК-маркеры могут быть использованы в селекционных программах для отбора сеянцев с ценными аллельными вариантами, а также в ходе предселекционной оценки генофонда для подбора оптимальных родительских пар скрещиваний.

По данному направлению выполнен ряд исследований, подтверждающих перспективность использования ДНК-маркеров для идентификации генов *Md-Exp7* и *Md-PG1* [2, 3, 9], *Md-EXP7* [10, 11].

В задачи наших исследований входило выполнение ДНК-маркерной идентификации аллельных комбинаций генов *Md-EXP7* и *Md-PG1* у сортов яблони, представляющих как современный генофонд Крыма, так и автохтонный генофонд (сорта народной селекции).

Объекты и методы исследований. Объектами исследования послужил 21 сорт яблони из коллекции генетических ресурсов Никитского Ботанического сада (г. Ялта). В выборку изучаемых генотипов входили как сорта современной селекции, так и автохтонные сорта Крыма.

Для экстракции ДНК использовали метод ЦТАБ в модификации S.O. Rogers & A.J. Bendich [12]. Анализ наличия генов *Md-EXP7* и *Md-PG1* проводили с использованием сонаследуемых с ними SSR-маркеров: *Md-Exp7ssr* [2] и *Md-PG1ssr10kd* [7], соответственно. Прямой праймер каждого из маркеров на 5' конце был мечен флуоресцентной меткой: *Md-Exp7ssr* – FAM, *Md-PG1ssr10kd* – R6G.

Постановку ПЦР проводили по следующей программе: начальная денатурация – 3 мин при 95°C, далее 35 циклов: 10 секунд при 94°C – денатурация, 45 секунд – отжиг праймеров при 58°C, 45 секунд при 72°C – элонгация; завершающий цикл элонгации – 5 минут при 72°C. При этом использовали следующие концентрации компонентов реакционной смеси: 0,05 мМ дезоксинуклео-тидтрифосфатов, 0,3 мкМ каждого праймера,

2,5 мкл ПЦР-буфера и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (ООО «СибЭнзим»), 50 нг ДНК. ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл.

Анализ полиморфизма амплифицированных фрагментов для ДНК-маркеров генов *Md-EXP7* и *Md-PG1* проводили с использованием фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе ABI prism 3130. Результаты обрабатывали в программе GeneMapper 4.1.

Обсуждение результатов. В ходе исследования аллельного полиморфизма генов *Md-EXP7* и *Md-PG1* были идентифицированы как гомозиготные генотипы по локусам данных генов, так и гетерозиготные.

По гену *Md-EXP7* было выявлено 9 гетерозиготных образцов (аллельные комбинации 198:202; 202:206; 202:214) и 11 гомозиготных образцов (аллели 200:200 202:202 п. н.).

По локусу гена *Md-PG1* было идентифицировано 14 гомозиготных образцов с аллельной комбинацией 298:298 и 7 гетерозиготных образцов (аллели 288:298, 291:298). Гомозиготные образцы характеризуются 1 пиком на электрофореграмме, гетерозиготные – двумя пиками (рис.).

Как видно из рисунка, использование двух маркеров генов *Md-EXP7* и *Md-PG1* в одном мультиплексном наборе позволяет достоверно идентифицировать целевые пики на электрофореграмме. Видно, что все образцы имеют четкие, легко идентифицируемые спектры.

Представленные на рисунке сорта яблони Чемпион, Салгирское и Белоснежка несут по гену *Md-EXP7* идентичный аллельный вариант – 202:202, о чем свидетельствует наличие одного пика на одинаковой позиции у всех трех сортов.

По гену *Md-PG1* сорта Чемпион (1) и Белоснежка (3) несут аллельные наборы 298:298, что выражено присутствием одного пика на одинаковой позиции у данных сортов. В то же время сорт Салгирское (2), наряду с аллелем 298, несет второй аллель с размером фрагмента в 288 п.н., что

идентифицируется по наличию пика на позиции перед пиком, специфичным для аллели с размером фрагмента 298 п.н.

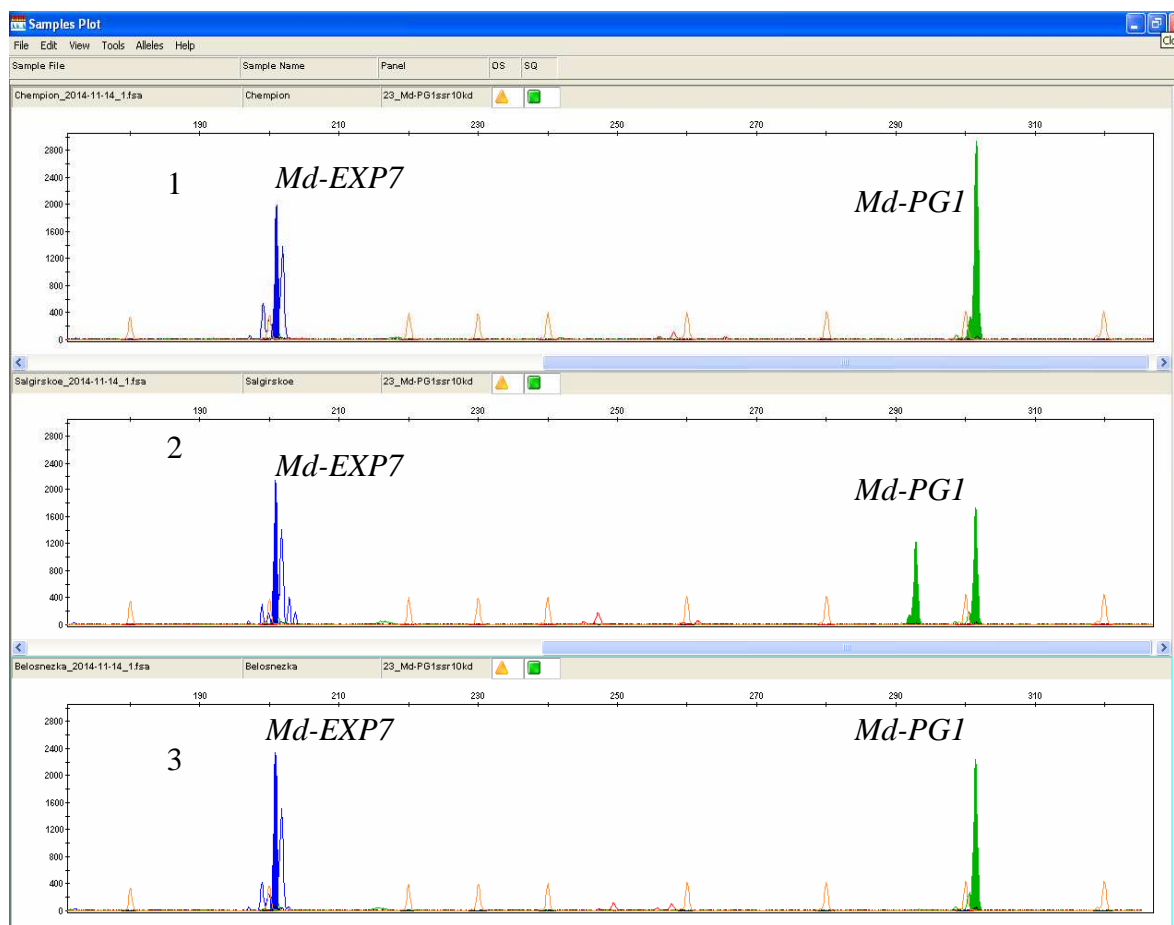


Рис. Аллельный полиморфизм локусов *Md-EXP7* и *Md-PG1* сортов яблони:
1 – Чемпион, 2 – Салгирское, 3 – Белоснежка
(результаты электрофореза представлены в рабочем окне программы
GeneMapper 4.1.)

В результате выполнения исследований были идентифицированы аллельные варианты генов *Md-EXP7* и *Md-PG1* у 21 сорта яблони (табл.).

Наиболее приоритетными аллелями для гена *Md-EXP7* являются аллели с размером продукта амплификации по маркеру 198 п.н. – высокий уровень плотности мякоти плодов; 200 и 202 п.н. – средний уровень плотности мякоти. Аллели 198 и 200 выявлены у сортов Синап белый, Синап судакский, Амулет, Балаклавское и Татарское зимнее. Перечисленные сор-

та являются донорами наиболее ценных аллельных комбинаций гена *Md-EXP7*. При этом наиболее селекционно-ценным набором аллелей обладает сорт Синап белый (198:198).

Аллели генов *Md-EXP7* и *Md-PG1* у изученных сортов яблони

| Сорт | <i>Md-EXP7</i> | <i>Md-PG1</i> |
|---------------------|----------------|---------------|
| Амулет | 198:202 | 288:298 |
| Балаклавское | 198:202 | 288:298 |
| Белоснежка | 202:202 | 298:298 |
| Гульпембе | 202:202 | 298:298 |
| Демир Алма | 202:206 | 288:298 |
| Джестер | 202:202 | 298:298 |
| Долхран | 202:202 | 298:298 |
| Кандиль синап | 202:206 | 288:298 |
| Киммерия | 202:206 | 298:298 |
| Крымское зимнее | 198:202 | 298:298 |
| Ласпи | 202:202 | 298:298 |
| Мавка | 202:202 | 298:298 |
| Румянка крымская | 202:202 | 291:298 |
| Салгирское | 202:202 | 288:298 |
| Синап Алма-Атинский | 202:202 | 298:298 |
| Синап белый | 198:198 | 288:298 |
| Синап Сары | н.а.* | 298:298 |
| Синап судакский | 200:200 | 298:298 |
| Татарское зимнее | 198:202 | 291:298 |
| Фаворит | 202:214 | 298:298 |
| Чемпион | 202:202 | 298:298 |

* – нет амплификации

Примечательно, что значительная часть сортов из изученной выборки по гену *Md-EXP7* несет аллель 202, в том числе и в гомозиготном состоянии, – 10 сортов, из которых шесть аборигенных. Учитывая сорта Синап белый, Синап судакский и Татарское зимнее, которые также несут селекционно-ценные аллельные варианты, очевидно, что все аборигенные сорта, за исключением сортов Демир Алма и Кандиль Синап, обладают ал-

лельным набором, детерминирующим высокий и средний уровень экспрессии гена *Md-EXP7*, и соответствующий ему уровень плотности мякоти плода. Данный факт может свидетельствовать о том, что в процессе народной селекции были отобраны формы, обладающие высоким и средним уровнем плотности мякоти яблок. Таким образом был выполнен целенаправленный отбор по признаку качества плодов.

Сорта Кандиль Синап, Киммерия и Фаворит, которые по локусу гена *Md-EXP7* несут аллельные комбинации 202:206, 202:206 и 202:214, несмотря на то, что они имеют «нежелательные» с точки зрения селекции аллели 206 и 214 в гетерозиготном состоянии, и уровень экспрессии данного гена может находиться на среднем уровне, данные сорта в гибридном потомстве, при гибридизации с сортом несущим аналогичные «нежелательные» аллели, могут дать значительную часть гибридного потомства с низким уровнем плотности мякоти плодов. Это необходимо учитывать в селекционном процессе.

По гену *Md-PG1* группа сортов Амулет, Балаклавское, Демир Алма, Кандиль синап, Салгирское и Синап белый с аллельным набором 288:298, а также сорта Румянка крымская и Татарское зимнее с аллельным набором 291:298 достоверно обладают средним уровнем комплекса показателей плотности, скальваемости и размягчения мякоти при хранении плодов, в то время как аллельный вариант 298:298, в соответствии с имеющимися в научной литературе данными не является информативным, и соответственно информация, полученная по сортам с двойной дозой аллеля 298, не может достоверно отразить характеристики плотности, скальваемости и размягчения мякоти при хранении.

Выводы. На основании результатов выполненной работы были идентифицированы сорта, несущие селекционно-ценные аллели генов *MdEXP7* и *Md-PG1*. Они могут быть использованы в селекционном процессе в качестве

<http://journal.kubansad.ru/pdf/15/03/01.pdf>. 9

стве родительских форм. При этом необходимо учитывать гомо- и гетерозиготность, а также комбинации аллелей у гетерозигот. Наряду с этим, в соответствии с данными, полученными по результатам анализа аллельного полиморфизма гена *MdEXP7* у автохтонных сортов Крыма, можно сделать предположение о наличии целенаправленного отбора форм яблони по признаку «качество плодов» в процессе народной селекции.

Литература

1. Brummell, D.A. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plant / D.A. Brummell, M.H. Harpster // *Plant Mol Biol.* – 2001. – № 47. – P. 311–340.
2. Costa, F. Map position and functional allelic diversity of Md-Exp7, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*) / F. Costa, W.E. Van de Weg, S. Stella [et al.] // *Tree Genetics & Genomes.* – 2008. – №4. – 575-586.
3. Costa, F. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus × domestica* Borkh.) / F. Costa, C.P. Peace, S. Stella [et al.] // *J Expt Bot.* –2010. – №61. – P. 3029–3039.
4. Powell, A.L. T. Simultaneous transgenic suppression of LePG and LeExp1 influences fruit texture and juice viscosity in a fresh market tomato variety / A.L.T. Powell, M.S. Kalamaki, P.A. Kurien, S. Guerrieri, A.B. Bennett // *J Agric Food Chem.* – 2003. – №51. – P. 7450–7455.
5. Wakasa, Y. Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential / Y. Wakasa, H. Kudo, R. Ishikawa [et al.] // *Postharvest Biol Technol.* – 2006. – №39. – P. 193–198.
6. Mann, H.S. Differential expression of cell-wall-modifying genes and novel cDNAs in apple fruit during storage / H. S. Mann, J. J. Alton, S. Kim [et al.] // *J Amer Soc Hort Sci.* – 2008. – №133. – P. 152–157.
7. Longhi, S.A. candidate gene based approach validates Md-PG1 as the main responsible for a QTL impacting fruit texture in apple (*Malus domestica* Borkh.) / S. Longhi, M.T. Hamblin, L. Trainotti [et al.] // *BMC Plant Biol.* – 2013. – №13. – P. 37.
8. Longhi, S. Validation of a functional molecular marker suitable for marker-assisted breeding for fruit texture in apple (*Malus domestica* Borkh.) / S. Longhi, L. Cappellin, W. Guerra [et al.] // *Mol Breeding.* – 2013. – №32. – P. 841–852.
9. Nybom, H. DNA marker-assisted evaluation of fruit firmness at harvest and post-harvest fruit softening in a diverse apple germplasm / H. Nybom, M. Ahmadi-Afzadi, J. Sehic [et al.] // *Tree Genetics & Genomes.* – 2012. – DOI 10.1007/s11295-012-0554-z
10. Савельев, Н.И. Скрининг диких видов и разновидностей рода *Malus Mill.* по устойчивости к абиотическим, биотическим стрессорам и длительной лежкости плодов / Н.И. Савельев, Н.Н. Савельева, Е.Н. Савельева // *Плодоводство и ягодоводство России.* – 2014. – №1. – С. 273-278.

11. Шамшин, И.Н. Аллельное разнообразие гена Md-Exp7 у сортов яблони и груши / И.Н. Шамшин, Н.И. Савельев, А.М. Кудрявцев // Вестник мичуринского государственного аграрного университета. – 2012. – №4. – С. 23-25.

12. Rogers, S.O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S.O. Rogers, A.J. Bendich // Plant Molecular Biology. – 1985. – №5. – С. 69-76.

References

1. Brummell, D.A. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plant / D.A. Brummell, M.H. Harpster // Plant Mol Biol. – 2001. – № 47. – P. 311–340.

2. Costa, F. Map position and functional allelic diversity of Md-Exp7, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*) / F. Costa, W.E. Van de Weg, S. Stella [et al.] // Tree Genetics & Genomes. – 2008. – №4. – 575-586.

3. Costa, F. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus × domestica* Borkh.) / F. Costa, C.P. Peace, S. Stella [et al.] // J Expt Bot. – 2010. – №61. – R. 3029–3039.

4. Powell, A. L. T. Simultaneous transgenic suppression of LePG and LeExp1 influences fruit texture and juice viscosity in a fresh market tomato variety / A.L.T. Powell, M.S. Kalamaki, P.A. Kurien, S. Guerrieri, A.B. Bennett // J Agric Food Chem. – 2003. – №51. – P. 7450–7455.

5. Wakasa, Y. Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential / Y. Wakasa, H. Kudo, R. Ishikawa [et al.] // Postharvest Biol Technol. – 2006. – №39. – P. 193–198.

6. Mann, H.S. Differential expression of cell-wall-modifying genes and novel cDNAs in apple fruit during storage / H. S. Mann, J. J. Alton, S. Kim [et al.] // J Amer Soc Hort Sci. – 2008. – №133. – P. 152–157.

7. Longhi, S.A. candidate gene based approach validates Md-PG1 as the main responsible for a QTL impacting fruit texture in apple (*Malus domestica* Borkh.) / S. Longhi, M.T. Hamblin, L. Trainotti [et al.] // BMC Plant Biol. – 2013. – №13. – R. 37.

8. Longhi, S. Validation of a functional molecular marker suitable for marker-assisted breeding for fruit texture in apple (*Malus domestica* Borkh.) / S. Longhi, L. Cappellin, W. Guerra [et al.] // Mol Breeding. – 2013. – №32. – R. 841–852.

9. Nybom, H. DNA marker-assisted evaluation of fruit firmness at harvest and post-harvest fruit softening in a diverse apple germplasm / H. Nybom, M. Ahmadi-Afzadi, J. Sehic [et al.] // Tree Genetics & Genomes. – 2012. – DOI 10.1007/s11295-012-0554-z

10. Savel'ev, N.I. Skrining dikih vidov i raznovidnostej roda *Malus* Mill. po ustojchivosti k abioticheskim, bioticheskim stressoram i dlitel'noj lezhkosti plodov / N.I. Savel'ev, N.N. Savel'eva, E.N. Savel'eva // Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii. – 2014. – №1. – S. 273-278.

11. Shamshin, I.N. Allel'noe raznoobrazie gena Md-Exp7 u sortov yablони i grushi / I.N. SHamshin, N.I. Savel'ev, A.M. Kudryavcev // Vestnik michurinskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2012. – №4. – S. 23-25.

12. Rogers, S.O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S.O. Rogers, A.J. Bendich // Plant Molecular Biology. – 1985. – №5. – S. 69-76.