

УДК 634.11:632.4:581.444:577.21

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ
ДНК-МАРКЕРОВ
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ГЕНОТИПОВ ЯБЛОНИ
С КОМПЛЕКСОМ
ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ**

Лыжин Александр Сергеевич
канд. с.-х. наук
зав. лабораторией
ДНК-опосредованных
маркерных биотехнологий

Савельева Наталья Николаевна
д-р биол. наук
ведущий научный сотрудник
лаборатории генофонда

*Селекционно-генетический центр
ВНИИГиСПР ФГБНУ
«ФНЦ имени И.В. Мичурина»,
Мичуринск, Россия*

Создание новых сортов яблони – длительный и трудоёмкий процесс, включающий несколько последовательных этапов: селекционная работа, первичное изучение, государственное сортоиспытание. Появление новых методов в биологии и, в частности, в молекулярной биологии, требует переосмысления подхода к каноническим принципам селекционной работы. Одним из перспективных направлений повышения эффективности селекционного процесса по культуре яблони является использование современных методов молекулярно-генетического анализа генома на основе ДНК-маркеров. Сочетание методов классической селекции с ДНК-анализом исходных форм и гибридных популяций является перспективным направлением исследований, связанных с интенсификацией процесса создания генотипов с заданными параметрами ценных, селекционно значимых признаков. Биологическими объектами нашего

UDC 634.11:632.4:581.444:577.21

**USE OF DIAGNOSTIC
DNA MARKERS
FOR IDENTIFICATION
OF APPLE GENOTYPES
WITH A COMPLEX
OF VALUABLE
TRAITS**

Lyzhin Alexander
Cand. Agr. Sci.
Head of Laboratory
of DNA-mediated
marker biological technologies

Savel'eva Natalia
Dr. Biol. Sci.
Leading Research Associate
of Laboratory of the Gene pool

*Breeding-genetical center
ARRIG&BFP FSBSO
"I.V. Michurin FSC",
Michurinsk, Russia*

The creation of new apple varieties is a long and laborious process involving several successive stages: the breeding work, the primary study, and State variety tasting. The appearance of new methods in biology, and in particular in molecular biology, requires a rethinking of the approach to the canonical principles of breeding. One of the perspective directions of increase in efficiency of the breeding process on culture of apple-tree is the use of modern methods of the genome molecular genetic analysis based on DNA markers. A combination of classical breeding techniques with DNA analysis of the original forms and hybrid populations is a promising direction of research related to the intensification of the process of genotypes creation with the specific parameters of valuable selective important features Biological objects of our research were the seedlings

исследования являлись сеянцы яблони гибридного фонда академика Российской академии наук Н.И. Савельева.

В данной статье показаны результаты ДНК анализа гибридных сеянцев яблони по локусам моногенной устойчивости к парше (ген *Rvi6*) и колонновидного габитуса роста (ген *Co*)

для идентификации генотипов с комплексом ценных признаков.

В изучаемых комбинациях скрещивания количество сеянцев яблони, сочетающих иммунитет к парше с колонновидным габитусом кроны дерева (генотип *Rvi6+Co*), составило 33,3-40,9 %.

В процессе проведенного нами исследования идентифицированы перспективные для селекции сеянцы яблони с генотипом *Rvi6Rvi6+Coco*, вовлечение которых в гибридизацию в качестве исходных форм позволит значительно интенсифицировать селекционный процесс, обеспечивая получение до 100 % сеянцев с моногенной устойчивостью к парше и до 50 % сеянцев – с колонновидным габитусом роста.

Ключевые слова: ЯБЛОНЯ, ГИБРИДНЫЕ СЕЯНЦЫ, УСТОЙЧИВОСТЬ К ПАРШЕ, КОЛОННОВИДНОСТЬ, ГЕНЫ *RVI6*, *CO*

of apple hybrid fund of academician's of the Russian Academy of Sciences N.I. Saveliev. This article shows the results of the DNA analysis of hybrid seedlings of apple trees on the loci of monogenic resistance to scab (*Rvi6* gene) and of columnar growth habit (*Co* gene) to identify the genotypes with a complex of valuable signs.

In the studied combinations of crosses the number of apple seedlings, combining the immunity to scab with the columnar habit of the tree's crown (genotype *Rvi6 + Co*),

was 33.3-40.9 per cent. In the process of our studying it is identified the promising for breeding apple seedlings with genotype of *Rvi6Rvi6 + Coco*, the involvement of which

In the hybridization as the native forms will significantly intensify the breeding process, ensuring the receipt of up to 100 % of seedlings with monogenic resistance to scab and up to 50% of seedlings with columnar growth habit.

Key words: APPLE-TREE, HYBRID SEEDLINGS, SCAB RESISTANCE, COLUMNAR, *RVI6*, *CO* GENES

Введение. Создание новых сортов яблони – длительный и трудоёмкий процесс, включающий несколько последовательных этапов: селекционная работа, первичное изучение, государственное сортоиспытание. Каждый из этих этапов занимает 13-17 лет, что в итоге составляет от 43 до 57 лет [1]. Сложность создания новых сортов яблони обусловлена такими биологическими особенностями культуры, как продолжительный период ювенильного развития, сложная генетическая структура формирования многих хозяйственно-ценных признаков, самонесовместимость. Значительные затруднения представляет также оценка гибридного потомства, так как предполагает идентификацию перспективных генотипов на основе

фенотипического проявления селективируемых признаков, подверженных влиянию факторов окружающей среды.

Вместе с тем появление новых методов в биологии и, в частности, в молекулярной биологии, требует переосмысления подхода к каноническим принципам селекционной работы. Одним из перспективных направлений повышения эффективности селекционного процесса яблони является использование современных методов молекулярно-генетического анализа генома на основе ДНК-маркеров.

ДНК-анализ базируется на идентификации в геноме сцепленных с целевыми генами участков ДНК (маркеров) и на молекулярном уровне обеспечивает выявление наследственных основ формирования признаков. Важным преимуществом ДНК маркирования является возможность в случае использования кодоминантных ДНК-маркеров анализа аллельного состояния гена, позволяя тем самым прогнозировать возможность передачи признака гибриднему потомству.

Благодаря использованию молекулярных маркеров широко внедряется в селекционную практику новое направление, получившее название маркер-опосредованной селекции (marker-assisted selection) [2]. ДНК-маркеры успешно применяют как на этапе подбора исходных источников для гибридизации, так и при последующем анализе гибридного материала.

Принцип маркер-опосредованной селекции заключается в отборе генотипов, несущих целевой ген на основании данных о присутствии ДНК-маркеров, тесно сцепленных с ним. Рекомендуется использовать маркеры, расположенные в непосредственной близости к гену (в пределах 5сМ) [3]. При этом надёжность маркерного отбора возрастает в случае использования фланкирующих (окружающих ген с двух сторон) маркеров или внутригенного маркера, напрямую идентифицирующего нужный аллель [4].

Наиболее перспективно использование ДНК-маркеров в селекции на моногенно-контролируемые признаки: к настоящему времени для яблони

идентифицированы молекулярные маркеры генов устойчивости к парше, мучнистой росе, колонновидного габитуса роста, сниженного уровня биосинтеза этилена и др. [5-10]. И хотя многие хозяйственно-ценные признаки яблони, в частности зимостойкость, засухо- и солеустойчивость, контролируются полигенно. что осложняет выявление информативных ДНК-маркеров данных признаков, сочетание методов классической селекции с ДНК-анализом исходных форм и гибридных популяций является перспективным направлением интенсификации процесса создания генотипов с заданными параметрами признаков.

В настоящем исследовании представлены результаты ДНК анализа гибридного фонда яблони для идентификации генотипов с комплексом ценных признаков (моногенная устойчивость к парше и колонновидный габитус роста).

Объекты и методы исследований. Биологическими объектами исследования являлись сеянцы яблони гибридного фонда академика РАН Н.И. Савельева. Экстракция геномной ДНК проведена по методу Diversity Arrays Technology P/L (DArT) (www.DiversityArrays.com) с модификациями.

Для идентификации гена *Rvi6* устойчивости к парше применяли маркеры VfC [5] и AL07-SCAR [11], гена *Co* колонновидного габитуса роста – маркер 29f1-jwl1r [10]. Нуклеотидная последовательность использованных праймеров и размер целевых фрагментов приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Характеристика использованных в работе праймеров

Маркер	Нуклеотидная последовательность праймеров	Размер целевых фрагментов, п.н.
VfC	F 5'GGTTTCCAAAGTCCAATTCC3' R 5'CGTTAGCATTTTGAGTTGAC3'	646, 484, 286
AL07-SCAR	F 5'TGGAAGAGAGATCCAGAAAGTG3' R 5'CATCCCTCCACAAATGCC3'	823, 570
29f1-jwl1r	F 5'CCTGGATCTAAAAGCCCCATA3' R 5'AACCAAACACCCACCCATTA3'	586

Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала 20 нг ДНК, 1,5 mM dNTPs, 2,5 mM MgCL₂, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 2,5 mM 10x стандартного ПЦР-буфера.

Аmplификацию проводили в термоциклере T100 производства фирмы «BIO-RAD» (США) по следующим программам:

- маркер VfC: 94 °C – 4 мин, 30 циклов: 94 °C – 1 мин, 58 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин; 72 °C – 7 мин;
- маркер AL07-SCAR: 95 °C – 10 мин, 35 циклов: 95 °C – 30 с, 59 °C – 1 мин, 72 °C – 2 мин; 72 °C – 10 мин;
- маркер 29f1-jw11r: 95 °C – 10 мин, 35 циклов: 95 °C – 30 с, 59 °C – 1 мин, 72 °C – 30 с; 72 °C – 10 мин.

Разделение продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Обсуждение результатов. В селекции яблони одной из приоритетных задач является создание сортов с моногенно детерминированным иммунитетом к парше. Возделывание таких сортов позволяет снизить пестицидную нагрузку на садовые агроценозы, улучшить экологическую обстановку и получить экологически безопасную продукцию для потребления в свежем виде и получения продуктов здорового питания, в том числе на основе органического производства.

К настоящему времени для яблони идентифицировано 17 неаллельных генов, контролирующих устойчивость к различным расам *Venturia inaequalis* (Cooke) [12], из которых в селекционной практике наиболее широкое распространение получил ген *Rvi6* (*V_f*), кодирующий устойчивость к пяти расам патогена [13]. Ген *Rvi6* локализован в группе сцепления 1 в локусе гомологичных рецептор-подобных генов *HcrV_f1*, *HcrV_f2*, *HcrV_f3*, *HcrV_f4* [14].

Маркер VfC, разработанный на основании консервативных последовательностей *HcrV_f* паралогов является внутригенным, следовательно надёж-

ность отбора составляет 100 % (рекомбинация между геном и маркером отсутствует). Фрагменты размером 646 и 484 п.н. амплифицируются как у устойчивых, так и у восприимчивых генотипов яблони. Фрагмент размером 286 п.н. характерен только для иммунных к парше по гену *Rvi6* форм [5].

SCAR-маркер AL07, расположенный на расстоянии 0,2 сМ от гена *Rvi6* [15], является кодоминантным. Аллель *Rvi6* определяется по наличию на электрофореграмме фрагмента размером 570 п.н., *rvi6* – 823 п.н. Присутствие обоих фрагментов свидетельствует о гетерозиготном состоянии гена [16].

Использованные в гибридизации родительские формы – сорта Валюта, Успенское, Белорусское сладкое, Академик Казаков несут ген *Rvi6* в гетерозиготном состоянии (*Rvi6rvi6*). В результате анализа электрофоретических спектров маркеров VfC и AL07-SCAR в гибридном потомстве идентифицировано 3 комбинации аллелей гена *Rvi6* – *Rvi6Rvi6*, *Rvi6rvi6*, *rvi6rvi6* (рис. 1, табл. 2). Статистический анализ наследования по критерию χ^2 подтвердил соответствие полученных результатов наследования моногенной устойчивости к парше по гену *Rvi6* теоретически ожидаемому расщеплению по фенотипу 3:1, а соотношение аллельных состояний гена *Rvi6* – теоретическому 1:2:1 при уровне значимости 0,05.

Создание генотипов яблони с доминантным гомозиготным состоянием гена *Rvi6* (*Rvi6Rvi6*) имеет важное практическое значение как для направленной селекции яблони на иммунитет к парше, так и для сохранения долговременной стабильной устойчивости насаждений [17].

Таблица 2 – Распределение аллельных состояний гена *Rvi6* в гибридном потомстве яблони

Комбинация скрещивания (<i>Rvi6rvi6</i> x <i>Rvi6rvi6</i>)	Количество семян, %			χ^2 1:2:1
	генотип <i>Rvi6Rvi6</i>	генотип <i>Rvi6rvi6</i>	генотип <i>rvi6rvi6</i>	
Валюта x Успенское	22,2	55,6	22,2	0,666
Валюта x Белорусское сладкое	14,0	54,0	32,0	3,560
Валюта x Академик Казаков	22,7	68,2	9,1	3,726

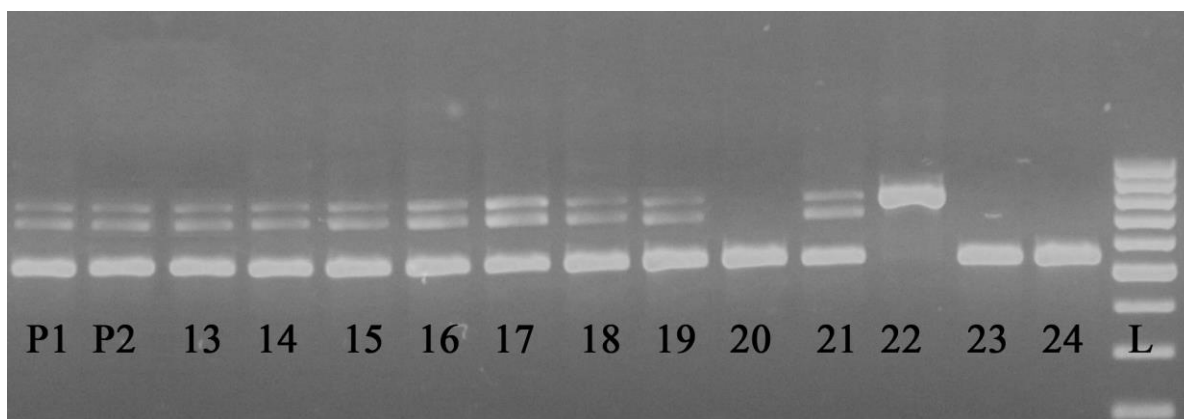


Рис. 1 – Электрофоретический профиль маркера AL07-SCAR гибридной комбинации Валюта x Академик Казаков
P1 – Валюта, P2 – Академик Казаков, 13-24 – гибридные сеянцы,
L – ладдер (маркер молекулярного веса)

Важным селектируемым признаком яблони также является колонновидный габитус роста. Компактная форма кроны, вследствие отсутствия бокового ветвления, позволяет размещать 10-20 тыс. саженцев на гектаре сада при продуктивности 80-100 т/га [18].

Колонновидный габитус роста у яблони контролируется доминантным геном *Co*, картированным в группе сцепления 10 [19, 20]. Согласно исследованиям Wolters et al [10], признак «колонновидность» яблони обусловлен спонтанной мутацией в окологенной области *Co* локуса (инсерция, размером 1956 п.н.).

Использование молекулярных маркеров является перспективным направлением в селекции яблони на колонновидный габитус, позволяя идентифицировать колонновидные сеянцы непосредственно в первый год от посева семян, тогда как надёжная полевая оценка, базирующаяся на анализе фенотипических показателей проявления признака, возможна не ранее чем через 2-3 года [19, 21].

Маркер 29f1-jwi1r позволяет выявить наличие в генотипе яблони инсерции, обуславливающей колонновидный габитус роста. Целевым продуктом маркера 29f1-jwi1r является фрагмент 5'CR, размером 586 п.н., ам-

плифицирующийся у колонновидных генотипов. У форм с обычным (неколонновидным) типом кроны данный фрагмент отсутствует [10].

В анализируемых комбинациях скрещивания донором доминантного аллеля гена *Co*, является используемый в качестве материнской формы сорт Валюта (генотип *Coco*). Отцовские формы – Успенское, Белорусское сладкое, Академик Казаков – характеризуются обычным типом кроны и имеют рецессивный гомозиготный генотип (*coco*). На основании анализа полученных электрофоретических спектров маркера 29f1-jw11r гибридное потомство указанных сортов дифференцировано по габитусу роста (рис. 2, табл. 3).

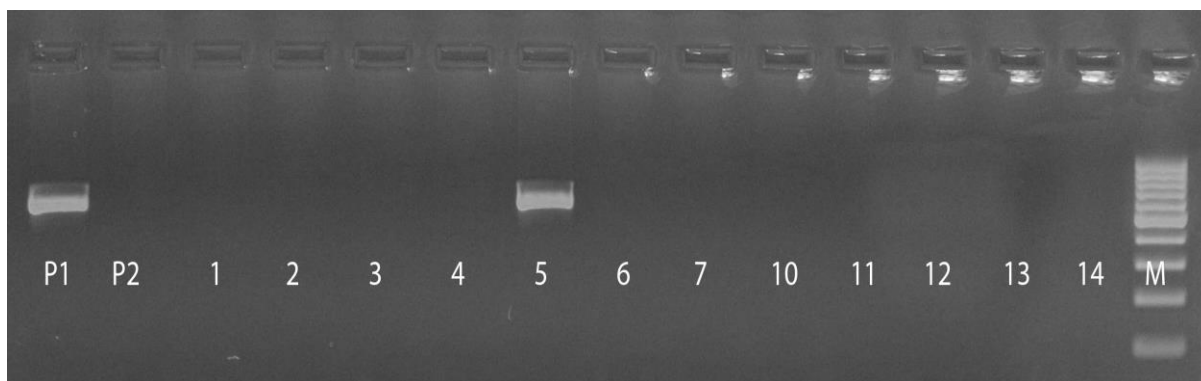


Рис. 2 – Электрофоретический профиль маркера 29f1-jw11r гибридной комбинации Валюта х Академик Казаков
P1 – Валюта, P2 – Академик Казаков, 1-14 – гибридные сеянцы,
M – ладдер (маркер молекулярного веса)

Таблица 3 – Наследование колонновидного габитуса роста (ген *Co*) в гибридном потомстве яблони

Комбинация скрещивания (<i>Coco</i> х <i>coco</i>)	Количество сеянцев, %		χ^2 1:1
	генотип <i>Coco</i>	генотип <i>coco</i>	
Валюта х Успенское	48,1	51,9	0,076
Валюта х Белорусское сладкое	46,8	53,2	0,191
Валюта х Академик Казаков	45,4	54,6	0,727

Как следует из данных табл. 2, фактическое расщепление между колонновидными и неколонновидными генотипами в анализируемых комби-

нациях скрещивания соответствует теоретически ожидаемому 1:1. Полученные значения χ^2 (0,076, 0,191 и 0,727) значительно меньше критического (3,84) при уровне значимости 0,05.

Так как гены *Rviб* и *Со* локализованы в различных группах сцепления (1 и 10 соответственно), то их наследование в гибридном потомстве осуществляется независимо, позволяя получить генотипы с комплексом ценных признаков.

В комбинации скрещивания Валюта х Успенское 83,3 % сеянцев унаследовало хотя бы один локус из двух, рецессивный гомозиготный генотип по анализируемым генам (*rviбрviб+coco*) имеет 16,7 % сеянцев. Иммунитет к парше и колонновидный габитус роста сочетает 40,7 % гибридных форм, из которых 77,3 % имеет генотип *Rviбрviб+Coco*, а 22,7 % (сеянцы №3-10-9, 3-10-12, 3-10-19, 3-10-26, 3-10-36) – генотип *RviбRviб+Coco*.

В гибридной комбинации Валюта х Белорусское сладкое доминантный аллель гена *Со* идентифицирован у 50,1 % сеянцев с геном *Rviб*, что составляет 33,3 % от общего количества проанализированных генотипов. Сеянцы №7-12-32, 7-12-33 (3,9 %) совмещают ген *Rviб* в доминантном гомозиготном состоянии с доминантным аллелем гена *Со* (генотип *RviбRviб+Coco*). Рецессивный гомозиготный генотип по обоим генам имеет 17,6 % сеянцев.

В комбинации скрещивания сортов яблони Валюта х Академик Казаков 40,9 % гибридных сеянцев совмещают иммунитет к парше по гену *Rviб* с колонновидным габитусом роста, из которых 77,8 % сеянцев имеет генотип *Rviбрviб+Coco*, а 22,2 % (сеянцы №6-12-23, 6-12-24) – генотип *RviбRviб+Coco*.

Заключение. С использованием ДНК-маркеров проанализировано наследование признаков колонновидности (ген *Со*) и моногенной устойчивости к парше (ген *Rviб*) в гибридном потомстве яблони. Определено соот-

ношение частот наследования аллельных состояний указанных генов. Идентифицированы перспективные для селекции сеянцы с генотипом *Rvi6Rvi6+Coco*, вовлечение которых в гибридизацию в качестве исходных форм позволит значительно интенсифицировать селекционный процесс, обеспечивая получение до 100% сеянцев с моногенной устойчивостью к парше и до 50% – с колонновидным габитусом роста.

Литература

1. Седов, Е.Н. Селекция и новые сорта яблони / Е.Н. Седов. – Орел: ВНИИСПК, 2011. – 624 с.
2. Beckmann, J.S. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species / J.S. Beckmann, M. Soller // *Euphytica*, 1986. – V. 35. – P. 111–124.
3. Collard, B.C.Y. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century / B.C.Y. Collard, D.J. Mackill // *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2008. – V. 363. – P. 557–572.
4. Пикунова, А.В. Оценка генетического разнообразия исходного и селекционного материала ягодных культур с помощью молекулярных маркёров : дисс. ... канд. биол. наук : 06.01.05, 03.02.07 / Пикунова Анна Викторовна. – Орел, 2011. – 150 с.
5. Afunian, M.R. Linkage *Vfa4* in *Malus domestica* and *Malus floribunda* with *Vf* resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* / M.R. Afunian, P.H. Goodwin, D.M. Hunter // *Plant Pathology*, 2004. – V 53. – P. 461–467.
6. Patocchi, A. Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene *Vm* / A. Patocchi, M. Walser, S. Tartarini, G.A.L. Broggin, F. Gennari, S. Sansavini, C. Gessler // *Genome*, 2005. – V. 48. – P. 630–636.
7. Boudichevskaia, A. Development of a multiallelic SCAR marker for the scab resistance gene *Vr1/ Vh4/ Vx* from R12740-7A apple and its utility for molecular breeding / A. Boudichevskaia, H. Flachowsky, A. Peil, C. Fischer, F. Dunemann // *Tree Genetics & Genomes*, 2006. – V. 2(4). – P. 186–195.
8. Dunemann, F. Mapping of the apple powdery mildew resistance gene *PII* and its genetic association with an NBS-LRR candidate resistance gene / F. Dunemann, A. Peil, A. Urbanietz, T. Garcia-Libreros // *Plant Breeding*, 2007. – V. 126. – P. 476–481.
9. Costa, F. Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACSI* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh) / F. Costa, S. Stella, W.E. Van de Weg, W. Guerra, M. Cecchin, J. Dallavia, B. Koller, S. Sansavini // *Euphytica*, 2005. – V. 141. – P. 181–190.
10. Wolters, P.J. Evidence for regulation of columnar habit in apple by a putative 2OG-Fe(II) oxygenase / P.J. Wolters, H.J. Schouten, R. Velasco, A. Si-Ammour, P. Baldi // *New Phytologist*. – 2013. – V. 200. – P. 993–999.
11. Tartarini, S. Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple / S. Tartarini, L. Gianfranceschi, S. Sansavini, C. Gessler // *Plant Breeding*, 1999. – V. 118. – P. 183–186.

12. Bus, V.G.M. Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus* / V.G.M. Bus, E.H.A. Rikkerink, V. Caffier, C.-E. Durel, K.M. Plummer // Ann Rev. Phytopathol. 2011. – V. 49. – P. 191-193.
13. Dayton, D.F. Independent genes in *Malus* for resistance to *Venturia inaequalis* / D.F. Dayton, E.B. Williams // Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1968. – V. 92. – P. 89-94.
14. Vinatzer, B.A. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *V_f* apple scab resistance / B.A. Vinatzer, A. Patocchi, L. Gianfranceschi, S. Tartarini, H.-B. Zhang, C. Gessler, S. Sansavini // Mol. Plant Microbe Interactions, 2001. – V. 14. – P. 505-515.
15. Xu, M.L. Saturation mapping of the apple scab resistance gene *V_f* using AFLP markers / M.L. Xu, S.S. Korban // Theor. Appl. Genet, 2000. – V. 101. – P. 844-851.
16. Patrascu, B. Marker assisted selection for response attack of *Venturia inaequalis* in different apple genotypes / B. Patrascu, D. Pamfil, R. Sestras, C. Botez, I. Gaboreanu, A. Barbos, C. Qin, R. Raluca, I. Bondrea, E. Dirle // Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj, 2006. – V. XXXIV – P. 121-132.
17. Tartarini S. Efficiency of marker assisted selection (MAS) for the *V_f* scab resistance gene / S. Tartarini, S. Sansavini, B. Vinatzer et al. // Acta Hort., 2000. – V. 538. – P. 549-552.
18. Кичина, В.В. Колонновидные яблони / В.В. Кичина. – М., 2002. – 160 с.
19. Moriya, S. Development of a marker-assisted selection system for columnar growth habit in apple breeding / S Moriya, H. Iwanami¹, N. Kotoda, S. Takahashi, T. Yamamoto, K. Abe // J. Japan. Soc. Hort. Sci., 2009. –V. 78 (3). – P. 279–287.
20. Tian, Y.-K. Mapping *Co* gene controlling the columnar phenotype of apple, with molecular markers / Y.-K. Tian, C.-H. Wang, J.-S. Zhang, C. James, H.-Y. Dai // Euphytica, 2005. – V. 145. – P. 181-188.
21. Baldi, P. Genetic and physical characterisation of the locus controlling columnar habit in apple (*Malus × domestica* Borkh.) / P. Baldi, P. J. Wolters, M. Komjanc, R. Viola, R. Velasco, S. Salvi // Mol. Breeding, 2013. – V. 31.- P. 429-440.

References

1. Sedov, E.N. Selekcija i novye sorta jabloni / E.N. Sedov. – Orel: VNIISPK, 2011. – 624 s.
2. Beckmann, J.S. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species / J.S. Beckmann, M. Soller // Euphytica, 1986. – V. 35. – P. 111–124.
3. Collard, B.C.Y. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century / B.C.Y. Collard, D.J. Mackill // Phil. Trans. R. Soc. B, 2008. – V. 363. – P. 557-572.
4. Pikunova, A.V. Ocenka geneticheskogo raznoobrazija ishodnogo i selekcionnogo materiala jagodnyh kul'tur s pomoshh'ju molekuljarnyh markjorov : diss. ... kand. biol. nauk : 06.01.05, 03.02.07 / Pikunova Anna Viktorovna. – Orel, 2011. – 150 s.
5. Afunian, M.R. Linkage *Vfa4* in *Malus domestica* and *Malus floribunda* with *V_f* resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* / M.R. Afunian, P.H. Goodwin, D.M. Hunter // Plant Pathology, 2004. – V 53. – P. 461-467.
6. Patocchi, A. Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene *V_m* / A. Patocchi, M. Walser, S. Tartarini, G.A.L. Broggin, F. Gennari, S. Sansavini, C. Gessler // Genome, 2005. – V. 48. – P. 630-636.

7. Boudichevskaia, A. Development of a multiallelic SCAR marker for the scab resistance gene *Vr1/ Vh4/ Vx* from R12740-7A apple and its utility for molecular breeding / A. Boudichevskaia, H. Flachowsky, A. Peil, C. Fischer, F. Dunemann // *Tree Genetics & Genomes*, 2006. – V. 2(4). – P. 186-195.
8. Dunemann, F. Mapping of the apple powdery mildew resistance gene *Pl1* its genetic association with an NBS-LRR candidate resistance gene / F. Dunemann, A. Peil, A. Urbanietz, T. Garcia-Libreros // *Plant Breeding*, 2007. – V. 126. – P. 476-481.
9. Costa, F. Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh) / F. Costa, S. Stella, W.E. Van de Weg, W. Guerra, M. Cecchinell, J. Dallavia, B. Koller, S. Sansavini // *Euphytica*, 2005. – V. 141. – P. 181–190.
10. Wolters, P.J. Evidence for regulation of columnar habit in apple by a putative 2OG-Fe(II) oxygenase / P.J. Wolters, H.J. Schouten, R. Velasco, A. Si-Ammour, P. Baldi // *New Phytologist*. – 2013. – V. 200. – P. 993–999.
11. Tartarini, S. Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple / S. Tartarini, L. Gianfranceschi, S. Sansavini, C. Gessler // *Plant Breeding*, 1999. – V. 118. – P. 183-186.
12. Bus, V.G.M. Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus* / V.G.M. Bus, E.H.A. Rikkerink, V. Caffier, C.-E. Durel, K.M. Plummer // *Ann Rev. Phytopathol.* 2011. – V. 49. – P. 191-193.
13. Dayton, D.F. Independent genes in *Malus* for resistance to *Venturia inaequalis* / D.F. Dayton, E.B. Williams // *Proc. Amer. Soc. Hortic Sci.* – 1968. – V. 92. – P. 89-94.
14. Vinatzer, B.A. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *Vf* apple scab resistance / B.A. Vinatzer, A. Patocchi, L. Gianfranceschi, S. Tartarini, H.-B. Zhang, C. Gessler, S. Sansavini // *Mol. Plant Microbe Interactions*, 2001. – V. 14. – P. 505-515.
15. Xu, M.L. Saturation mapping of the apple scab resistance gene *Vf* using AFLP markers / M.L. Xu, S.S. Korban // *Theor. Appl. Genet.*, 2000. – V. 101. – P. 844-851.
16. Patrascu, B. Marker assisted selection for response attack of *Venturia inaequalis* in different apple genotypes / B. Patrascu, D. Pamfil, R. Sestras, C. Botez, I. Gaboreanu, A. Barros, C. Qin, R. Raluca, I. Bondrea, E. Dirle // *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 2006. – V. XXXIV – P. 121-132.
17. Tartarini S. Efficiency of marker assisted selection (MAS) for the *Vf* scab resistance gene / S. Tartarini, S. Sansavini, B. Vinatzer et al. // *Acta Hort.*, 2000. – V. 538. – P. 549-552.
18. Kichina, V.V. Kolonovidnye jabloni / V.V. Kichina. – M., 2002. – 160 s.
19. Moriya, S. Development of a marker-assisted selection system for columnar growth habit in apple breeding / S Moriya, H. Iwanami, N. Kotoda, S. Takahashi, T. Yamamoto, K. Abe // *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 2009. –V. 78 (3). – P. 279–287.
20. Tian, Y.-K. Mapping *Co* gene controlling the columnar phenotype of apple, with molecular markers / Y.-K. Tian, C.-H. Wang, J.-S. Zhang, C. James, H.-Y. Dai // *Euphytica*, 2005. – V. 145. – P. 181-188.
21. Baldi, P. Genetic and physical characterisation of the locus controlling columnar habit in apple (*Malus × domestica* Borkh.) / P. Baldi, P. J. Wolters, M. Komjanc, R. Viola, R. Velasco, S. Salvi // *Mol. Breeding*, 2013. – V. 31. - P. 429-440.