

УДК 634.11:577.21

Разработка мультиплексных наборов SSR-маркеров для использования в изучении генетического разнообразия в пределах родов *Malus*, *Prunus* и *Pyrus**

**Супрун И. И. к.б.н., Токмаков С. В. к.б.н., Степанов И. В. аспирант,
Балапанов И.М. аспирант**

*Государственное научное учреждение Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхозакадемии
(Краснодар)*

Реферат. Выполнены исследования по оценке уровня информативности SSR-локусов с использованием мультиплексного фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе ABI-Prism 3130. Определены наиболее перспективные, из перечня использованных, SSR-маркеры для дальнейшего изучения генетического разнообразия пределах родов *Malus*, *Prunus* и *Pyrus*. Маркеры сгруппированы в мультиплексные наборы с целью повышения эффективности выполнения генотипирования за счет одновременного анализа по нескольким локусам при постановке ПЦР и проведении фрагментного анализа. По результатам работы получены данные для составления ДНК – отпечатков изученных образцов.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, коллекции генетических ресурсов, *Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, микросателлитные ДНК – маркеры, мультиплексный анализ.

Summary: The study to assess the level of informativeness of SSR-loci using multiplex fragment analysis on an automated sequencer ABI-Prism 3130 have been carried out. The most promising SSR-markers were determined from the list of used, for further study of the genetic diversity within the genera *Malus*, *Prunus* and *Pyrus*. Markers are grouped into multiplex sets in order to improve the efficiency of the genotyping by simultaneous analysis for several loci in the formulation and implementation of PCR fragment analysis. According to the results obtained data for the compilation of DNA - fingerprints of the studied genotypes.

Keywords: genetic diversity, collection of genetic resources, *Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, microsatellite DNA-markers, multiplex analysis.

Изучение и сохранение генетического разнообразия представляет собой одну из наиболее важных фундаментальных научных проблем в генетике культурных растений. Это обусловлено как необходимостью повышения эффективности использования генетических ресурсов и обеспечения устойчивого производства сельскохозяйственной продукции за счет создания новых, высокопродуктивных сортов, обладающих комплексной устойчивостью к стрессовым факторам среды, так и актуальностью исследований, направленных на изучение филогенетических аспектов и выяснение микроэволюционных путей формирования разнообразия на уровне род/вид/подвид. В настоящее время наиболее эффективными методами для изучения генетического разнообразия, выяснения филогенетических взаимосвязей на различных таксономических уровнях являются методы, основанные на анализе полиморфизма первичной структуры ДНК. Использование методов, основанных на ДНК - маркерном анализе, дает возможность наиболее объективно оценивать генетические дистанции между изучаемыми образцами на разных таксономических уровнях.

Основные направления использования молекулярных маркеров при работе с генетическими ресурсами растений можно представить следующим образом:

* Работа выполняется при поддержке РФФИ (проект № 13-04-02089_A)

- Интродукция генетических ресурсов: поиск нового разнообразия для привлечения в коллекцию; контроль процесса включения нового образца в коллекцию (для предотвращения дублирования).

- Структура коллекции: выяснение с использованием молекулярных маркеров внутривидовых связей; анализ родства видов и генотипов.

- Создание коллекций на основе использования молекулярных маркеров: идентификация и регистрация образцов коллекции; формирование стержневых коллекций; контроль генетической стабильности при создании коллекций *in vitro*.

- Охрана авторских прав: идентификация и паспортизация сортов, регистрация источников и доноров ценных признаков, решение спорных вопросов авторства сортов, идентификация образцов-«двойников».

Среди методов молекулярного ДНК-маркирования широкое распространение нашли ДНК-маркеры, основанные на полиморфизме микросателлитных последовательностей генома (SSR).

Источник полиморфизма микросателлитных последовательностей (SSR) – сайт-специфическое варьирование длины повтора, что в свою очередь обусловлено различием в числе единиц повтора. Наиболее привлекательные свойства SSRs – это кодоминантность, распределение по всему геному, простота манипуляций и значительная аллельная изменчивость, что обеспечивает доступность и высокую информативность этих маркеров. В настоящее время SSR-маркеры чаще всего используют для дифференцировки растений внутри вида, идентификации сортов, составлении генетических карт и в маркерной селекции, а также в работах по изучению генетического разнообразия и паспортизации сортов культурных растений.

Исследования по изучению уровня генетического разнообразия с применением методов молекулярного - генетического анализа проводятся во многих научно-исследовательских центрах. Данные исследования позволяют оценить уровень генетической близости изучаемых генотипов, выяснить пути формирования генофонда культур в отдельных регионах мира. Анализ геномного полиморфизма диких видов дает возможность дополнить знания в области эволюции и выяснить филогенетические взаимосвязи на разных таксономических уровнях.

Среди плодовых культур из семейства розоцветных наибольшее количество SSR-маркеров идентифицировано у персика и яблони. Для этих культур построены наиболее детальные молекулярно - генетические карты с использованием SSR ДНК-маркеров.

Одна из наиболее крупных работ по идентификации и секвенированию SSR-локусов у яблони была выполнена [1]. Ее результатом стали 140 впервые идентифицированных микросателлитных локусов и праймерные пары, их фланкирующие. Даная маркерная система на настоящий момент одна из наиболее широко используемых в исследованиях, направленных на оценку внутривидового генетического полиморфизма среди плодовых культур. Так L. Goulao and C.M. Oliveira (2001) провели оценку степени генетического родства и ДНК - фингерпринт в выборке из 41 сорта яблони с использованием SSR и ISSR ДНК-маркерной системы [2]. В результате работы все сорта были идентифицированы по уникальным аллельным комбинациям.

В качестве одного из наиболее крупных проектов в данной области исследований следует отметить исследования группы ученых из Национального центра сохранения генетических ресурсов Государственного департамента США по сельскому хозяйству (USDA-ARS-National Center for Genetic Resources Preservation). В данной работе, с использованием анализа полиморфизма микросателлитных локусов ядерного генома, а также полиморфных маркеров хлоропластного генома выполнили оценку уровня генетического разнообразия коллекции образцов диких видов груши, собранных в Европе и на Ближнем востоке, а также коллекции сортов и видов яблони (порядка 1900 образцов) [3]. По ре-

зультатам исследований был выявлен ряд дубликатных образцов, а данные генотипирования послужили основой для формирования базы данных геномных фингерпринтов образцов. В изучении микросателлитного полиморфизма груши в данном исследовании был использован ряд ДНК-маркеров, идентифицированных и картированных в геноме яблони. Данный подход широко используется в связи с достаточно высоким уровнем гомологии геномов этих видов.

Первой косточковой культурой, у которой были изучены микросателлитные ДНК-маркеры является персик. На основе двух богатых AC/GT и AG/CT повторами геномных библиотек сорта «Redheaven», селекции США были впервые синтезированы 17 микросателлитных праймеров, полиморфизм которых был апробирован на 10 генотипах персика и нектарина. Так же была проанализирована возможность использования данных праймерных пар у других культур рода *Prunus*. 10 праймерных пар из 17 давали четкий ПЦР продукт у таких видов, как слива домашняя, слива японская, абрикос, миндаль, черешня и вишня [4].

Разработанные на персике и черешне микросателлитные ДНК-маркеры были использованы для построения генетической карты *Prunus*. SSR были обнаружены во всех восьми группах сцепления на данной карте, и их распределение было относительно равномерным, что обеспечило широкий охват генома средней плотности 5.4 cM / SSR. Из набора были выделены двадцать четыре монолокусных SSR, высоко полиморфных у персика и равномерно распределенных по геному [5].

Основываясь на использовании SSR маркеров были проведены широкомасштабные исследования по генетическому разнообразию сортов персика. Коллекция генетических ресурсов данной культуры, насчитывающая порядка 212 сортов и охватывающая широкий спектр внутривидовой изменчивости, была проанализирована с помощью 16 микросателлитных маркеров. Из всех изученных генотипов 195 имели уникальные фингерпринты [6].

Одно из наиболее обширных исследований на сливе было проведено по изучению генетического разнообразия и взаимосвязи генетической структуры сортов с фенотипическими признаками у трех видов из Французской национальной коллекции сливы (*P. domestica* L., *Prunus cerasifera* Ehrh. и *Prunus spinosa* L.). Совместно с SSR маркерами в работе использовались маркеры хлоропластной ДНК. Данные, полученные по SSR, подтвердили гибридное происхождение *P. domestica* от *Prunus cerasifera* и *Prunus spinosa*. При этом SSR маркеры показали более высокий уровень полиморфизма, чем маркеры хлоропластной ДНК [7].

Очевидно, что микросателлитные маркеры нашли широкое применение в генетических исследованиях рода *Prunus*. Они эффективны при ДНК-паспортизации генплазмы, определении генетического разнообразия, выявлении родительских форм, а также в сортовой идентификации и построении генетических карт видов, принадлежащих к данному роду. Все это подтверждает высокую перспективность использования данного типа ДНК – маркеров в решении различных задач в генетике и селекции плодовых культур.

Учитывая высокую актуальность исследований в данном направлении в СКЗНИИСиВ начаты исследования по изучению генетического полиморфизма автохтонного и интродуцированного генофонда плодовых культур, принадлежащих к родам *Malus*, *Prunus* и *Pyrus*, на основе анализа полиморфизма микросателлитных последовательностей с применением фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе ABI-Prism 3130, а также разработка системы генетической паспортизации и идентификации образцов коллекций генетических ресурсов плодовых культур. На данном этапе исследований целью являлось определение наиболее информативных ДНК-маркеров на основе данных об уровне их аллельного полиморфизма, «качества амплификации» фрагментов, а также эффективности их использования в мультиплексных наборах в различных комбинациях.

Кроме того, в задачи исследований входило получение исходных данных для составления ДНК-фингерпринтов изученных генотипов.

Объекты и методы исследований. В качестве материала для исследований были использованы сорта яблони, груши, персика, нектарина, сливы алычи отечественной и зарубежной селекции, а также образцы вида *Malus orientalis*. Экстракцию ДНК проводили из молодых листьев методом ЦТАБ с некоторыми модификациями [8]. Относительное количество ДНК оценивали методом электрофореза в 1% агарозном геле по интенсивности свечения спектром в УФ спектре после окрашивания гелевых пластин бромистым этидием. Полимеразная цепная реакция выполнена на амплификаторе Eppendorf "Mastercycler Gradient".

В ходе работы был изучен полиморфизм следующих SSR-маркеров: для рода *Malus*: CH01h01, CH03d07, CH05e03, CH03a04, CN581493, CH01f03b, Hi16d02, CH04e03, CN445290, CH01h10, CH02c06, NZ05g08, CH05f06, CH04e05, CH02d08; для рода *Pyrus* CH01h0; CH04e03; CH05e03; для рода *Prunus*: BPCCT002, Ps12a02a, CPPCT022, UDP98-407, UDP98-410. В работе использовали праймеры помеченные, флуоресцентным красителем: FAM, TAMRA, R6G, ROX.

ПЦР проводили по следующей программе: 5 минут при 94°C - начальная денатурация, следующих 35 циклов: 30 секунд денатурация при 94 °С, 30 секунд отжиг праймеров при 58 °С, 30 секунд синтез при 72°C; последний цикл синтеза - 3 минуты при 72°C.

Анализ размеров амплифицированных последовательностей был выполнен с использованием автоматического генетического анализатора ABI-Prism 3130. Для анализа данных фрагментного анализа использовалась программа GeneMapper 4.0.

Результаты исследований. Одними из немаловажных критериев при отборе SSR-маркеров для изучения обширного генофонда, являются уровень аллельного полиморфизма, выявляемого по каждому из локусов при анализе целевой генплазмы, высокое "качество" амплификации, позволяющее наиболее эффективно и достоверно проводить анализ их полиморфизма. Кроме того, при первоначальном отборе маркеров, учитывается уровень полиморфизма, идентифицированный у них при анализе мирового генофонда, а также позиция на генетической карте вида, - наиболее оптимально использовать набор SSR-маркеров, равномерно распределенных по геному.

На данном этапе исследований нами было использовано 15 SSR-маркеров для анализа культурных и диких форм рода *Malus*, 3 SSR-маркера для рода *Pyrus* и 5 SSR-маркеров для рода *Prunus*. При этом оценивали уровень полиморфизма данных маркеров в выборках объемом в 40, 24 и 50 генотипов для указанных родов, соответственно. В связи с высоким уровнем гомологии генома в пределах рода *Prunus*, была выполнена также оценка возможности применения SSR-маркеров, впервые идентифицированных у персика и черешни для анализа у трех видов рода *Prunus*: *Prunus persica*, *Prunus avium*, *Prunus domestica*. Данный подход широко используется в генетических исследованиях плодовых культур [7, 9, 10].

Для оценки "качества" амплификации на начальном этапе использовали электрофорез в 8% неденатурирующем полиакриламидном геле. Исходя из результатов, а также на основании данных, полученных нами ранее [11], все из указанных SSR-маркеров были определены как перспективные к использованию в дальнейших исследованиях. На рисунках 1 и 2, в качестве примера приведены результаты электрофоретического анализа сортов яблони по SSR-локусу CH03d07 и UDP 98-407 – сорта персика, нектарина, сливы, алычи.

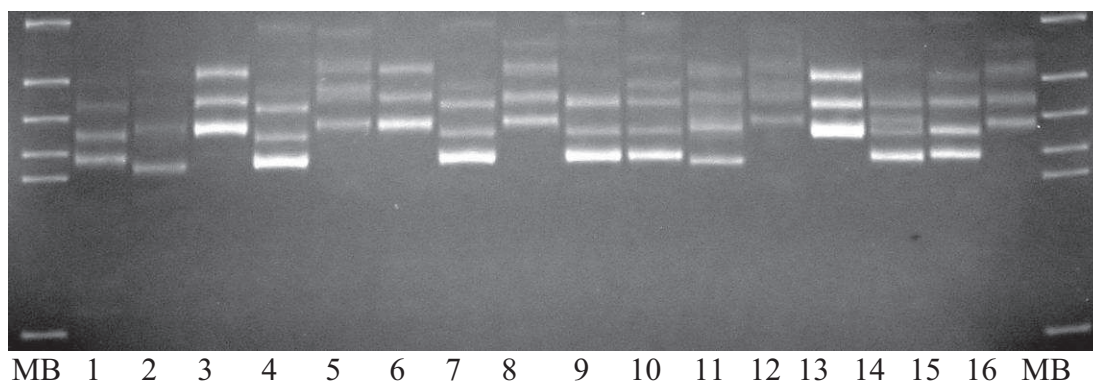


Рисунок 1 – Анализ сортов яблони по SSR - локусу CH03d07

MB-маркер молекулярной массы ДНК; сорта яблони: 1-Солнышко, 2-Курнаковское, 3-Тайна, 4-Зефир, 5-Талида, 6-Любава, 7-Фея, 8-Екатеринодарское, 9- Ноктюрн, 10- Талисман, 11-Орловское полесье, 12-Союз, 13-Старт, 14-Афродита, 15-Имрус, 16-Прима

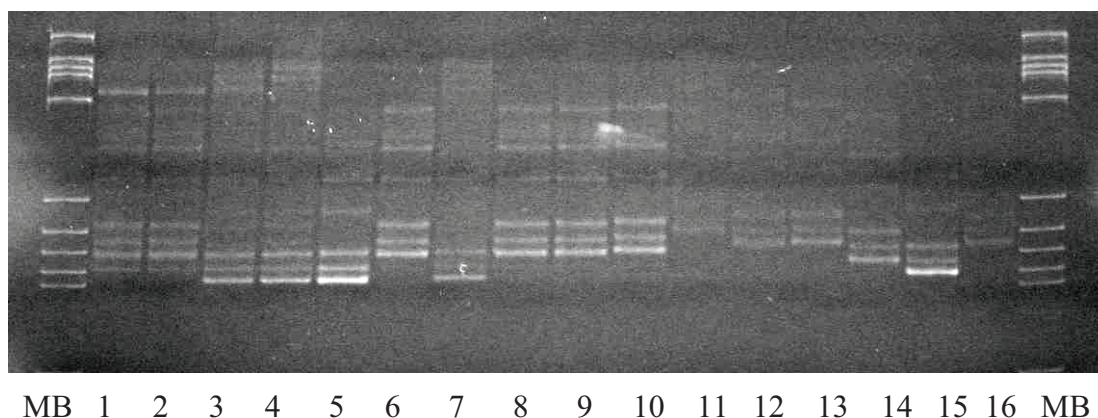


Рисунок 2 – Анализ сортов нектарина, персика, сливы и алычи по SSR - локусу UDP 98-407

Примечание — MB – маркер молекулярного веса, сорта нектарина: 1 – Краснодарец, 2 – Рубиновый, 3 – Скифянин, 4 – Лола; сорта персика: 5 – S. Isiodro, 6 – Collins, 7 – Ранний Кубани, 8 – Red Heaven, 9 – Память Симиренко, 10 – Адагум; сорта сливы и алычи: 11 – Персидская, 12 – Жёлтая местная, 13 – Цители Дроша, 14 – Пурпурная, 15 – Геогжда, 16 – Культурная красная.

Следующим этапом работы было формирование мультиплексных наборов из апробированных SSR-маркеров. Используемые ДНК-маркеры были сгруппированы в мультиплексные наборы в соответствии с размером амплифицируемых фрагментов таким образом, что в каждый набор включались SSR-маркеры с неперекрывающимися диапазонами размеров амплифицированных последовательностей. Это необходимо для предотвращения перекрытия спектров флуоресценции продуктов ПЦР при проведении анализа их размеров с использованием капиллярного электрофореза. Кроме того, учитывали температуру отжига праймеров, входящих в мультиплексный набор.

Для каждого маркера в мультиплексном наборе был использован специфичный для него флуоресцентный краситель: карбоксифлуоресцеин (FAM), 6-карбоксиродамин (R6G), карбокси-X-родамин (ROX), тетраметилкарбоксиродамин (TAMRA). Каждый из

приведенных красителей имеет разные оптические спектры флуоресценции, что также позволяет проводить в одной реакции одновременную идентификацию нескольких фрагментов, синтезированных с использованием праймеров, меченых разными красителями. В таблице 1 представлены данные о мультиплексных наборах, сформированных и апробированных в ходе выполнения исследований.

Таблица 1 Мультиплексные наборы SSR-маркеров

Род	Мультиплекс	SSR маркер	Участие в других мультиплексах	Краситель	Повтор	Диапазон размеров ампликонов*
<i>Malus</i>	1	CH01h01	4,8	R6G	tc	114-134
		CH03d07		TAMRA	ct	186-226
		CH05e03	8	ROX	ga	158-190
	2	CH03a04		FAM	ct	92-124
		CN581493		R6G	ta	184-228
		CH01f03b	4	TAMRA	ag	139-183
	3	Hi16d02		FAM	tca	144-177
		CH04e03	6	TAMRA	ga	179-222
		CN445290		ROX	ag	230-242
	4	CH01h10		ROX	tc	94-114
		CH01h01	1, 8	R6G	tc	114-134
		CH01f03b	2	TAMRA	ag	139-183
		CH02c06		FAM	tc	216-256
	5	NZ05g08		ROX	-	115-147
		CH05f06		R6G	ct	166-184
		CH04e05		FAM	ga	174-227
CH02d08			TAMRA	ga	210-254	
<i>Prunus</i>	6	BPCCT002		FAM	-	170-200
		Ps12a02a		ROX	-	140-175
	7	CPPCT022		R6G	ga	220-240
		UDP98-407		TAMRA	-	180-210
<i>Pyrus</i>	8	CH01h01	1, 4	R6G	tc	99-120
		CH05e03	1	ROX	ga	146-190
		CH04e03	3	TAMRA	ga	140-234

Примечание: * - в соответствии с литературными данными [1-6].

Мультиплексные наборы, апробированные в ходе работы включают от двух до четырех SSR-маркеров. Это было обусловлено не только возможностью подбора сочетаний маркеров с неперекрывающимися диапазонами размеров амплифицированных фрагментов, но также и различным «качеством» амплификации по каждому из маркеров в зависимости от комбинации маркеров, входящих с ним в один мультиплексный набор. По отобраным мультиплексным наборам нами был выявлен уровень амплификации, достаточный для безошибочного выполнения генотипирования.

На рисунке 3, в качестве примера, проиллюстрированы результаты электрофоретического анализа с использованием метода капиллярного электрофореза на автоматическом

генетическом анализаторе/секвенаторе ABI prism 3130 (результаты обработаны в программе GeneMapper 4.0).

Приведены результаты анализа сорта яблони Красный Янтарь по мультиплексному набору №3, включающему SSR-маркеры Hi16d02 (1), CH04e03(2), CN445290(3).

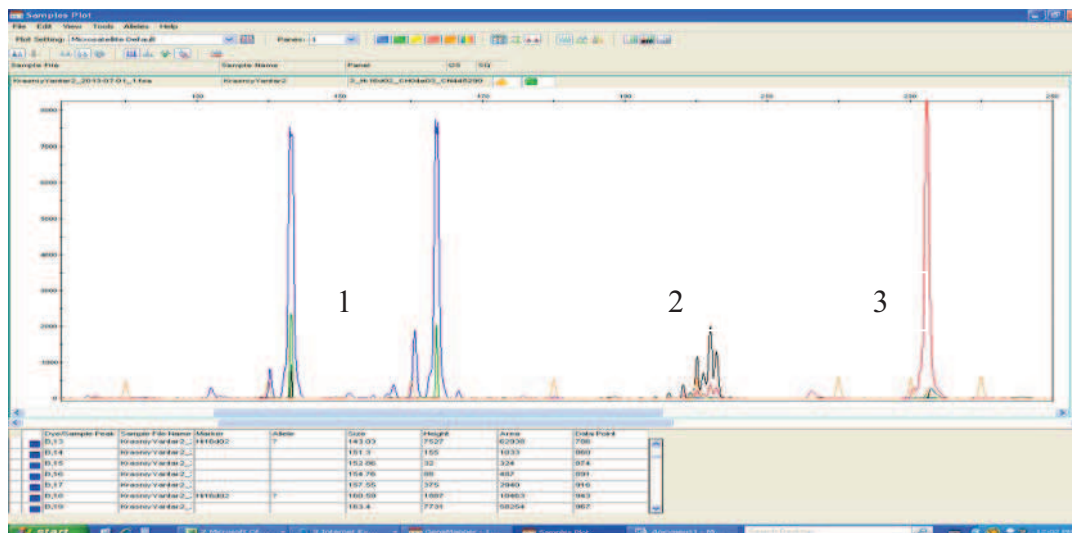


Рисунок 3 Результаты фрагментного анализа сорта Красный Янтарь по мультиплексному набору №3

Наличие двух пиков /двух фрагментов на электрофореграмме (1) свидетельствует о гетерозиготности микросателлитного локуса Hi16d02, присутствие только одного фрагмента - в данном случае это SSR-локусы CH04e03 (2) и CN445290 (3) говорит о гомозиготности по ним. ДНК - фингерпринт сорта яблони Красный Янтарь по данным SSR-локусам следующий: Hi16d02-143/163, CH04e03-203, CN445290-232.

Для отобранных SSR-маркеров был проведен анализ их аллельного полиморфизма на целевых видах. Данные об уровне полиморфизма для изученных маркеров приведены в таблице 2 и 3. Для каждого SSR-локуса указан диапазон размеров амплифицированных фрагментов, а также количество аллелей, идентифицированных в изученной выборке генотипов.

Таблица 2 Аллельный полиморфизм SSR-локусов у видов рода *Prunus*

Вид \ SSR-локус	<i>Prunus avium</i> (32*)	<i>Prunus domestica</i> (11)	<i>Prunus persica</i> (9)
BPCCT002	176-183 (4**)	176-212 (8)	222-231 (3)
Ps12a02a	166-182 (6)	160-180 (8)	164-188 (5)
CPPCT022	249-259 (4)	110-116(2)	118-124(2)
UDP98-407	184 (1)	195-223(3)	185-211 (4)
UDP98-410	122-137 (4)	Нет продукта	142-144 (2)

Примечание: * - количество изученных генотипов

** - количество выявленных аллелей

Таблица 3 Аллельный полиморфизм SSR-локусов у представителей родов *Malus* и *Pyrus*

Вид SSR-локус	<i>Malus domestica</i> (30*)	<i>Malus orientalis</i> (10*)	<i>Pyrus communis</i> (24*)
CH01h01	118-137 (6**)	125-144 (6)	103-111 (4)
CH03d07	173-230 (6)	187-227 (13)	-
CH05e03	165-190 (8)	161-194 (13)	159-212 (8)
CH03a04	92-119 (7)	92-126 (8)	-
CN581493	191-234 (8)	194-203 (6)	-
CH01f03b	144-184 (5)	143-181 (8)	-
Hi16d02	143-164 (4)	190-215 (10)	-
CH04e03	183-209 (7)	190-215 (10)	180-208 (5)
CN445290	232-252 (5)	232-239 (2)	-
CH01h10	98-113 (6)	99-118 (7)	-
CH02c06	205-276 (12)	211-275 (9)	-
NZ05g08	103-167 (8)	-***	-
CH05f06	173-192 (6)	-	-
CH04e05	178-206 (5)	-	-
CH02d08	221-264 (8)	-	-

Примечание: * - количество изученных генотипов,
 ** - количество выявленных аллелей,
 *** - анализ не проводился.

Для вида *Pyrus communis* был выполнен анализ по трем SSR-маркерам, впервые идентифицированным и картированным в геноме яблони, для которых из литературных данных известно о возможности их использования при анализе полиморфизма генома груши [3, 10].

Как видно из результатов исследования, изученные SSR-локусы проявили различный уровень полиморфизма. Максимальное количество аллелей было идентифицировано для локусов CH03d07 и CH05e03 при анализе образцов вида *Malus orientalis*. В целом, с учетом полученных результатов все изученные SSR-маркеры, представленные в таблице 3, могут быть рекомендованы в изучении генетического разнообразия коллекций генетических ресурсов видов *Malus domestica*, *Malus orientalis* и *Pyrus communis* с использованием мультиплексного фрагментного анализа методом капиллярного электрофореза.

В ходе изучения полиморфизма SSR-локусов рода *Prunus* было выявлено, что два из пяти использованных маркеров могут быть использованы с ограничениями: UDP98-407 является неперспективным в изучении генетического разнообразия вида *Prunus avium* т.к. в ходе исследования по данному локусу была выявлена одна аллель у 32 сортов черешни; ДНК-маркер UDP98-410 не дает воспроизводимых результатов для вида *Prunus domestica*.

Заключение. В ходе исследований были оптимизированы экспериментальные параметры для выполнения мультиплексного SSR анализа с использованием автоматического генетического анализатора ABIprism3130. Изученные SSR-маркеры сгруппированы в мультиплексные наборы, позволяющие одновременно проводить анализ по нескольким (от 2-х до 4-х) локусам, что позволит в дальнейшем существенно сократить затраты времени на выполнение исследований. Определены перспективные SSR-маркеры, а также получены исходные данные для составления ДНК - фингерпринтов сортов.

Выполнение исследований, направленных на анализ полиморфизма микросателлитных локусов генома позволит не только существенно дополнить научную информацию о филогенетических взаимосвязях внутри родов, а также оценить генетические дистанции между различными группами сортов, но и получить исходные данные для создания базы данных ДНК-паспортов сортов, видов, межвидовых гибридов плодовых культур на основе результатов молекулярно-генетического анализа.

Литература

- 1 Silfverberg-Dilworth, E. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome // *Tree Genetics & Genomes*. - 2006. - V. 2. - P. 202-224.
- 2 Goulao, L. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus X domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers / L. Goulao, C.M. Oliveira. // *Euphytica*. - 2001. - V. - 122. - P. 81-89.
- 3 Volk, G. M. The USDA-ARS national plant germplasm system malus collection: diversity of cultivars and wild species / M. Volk, C. Richards, B. Gross [et al.] // *Sixth Rosaceous Genomics Conference (RGC6): program and book of abstracts (30th September – 4th October 2012) / Mezzocorona (Trento), Italy, 2012.* – P. 131.
- 4 Cipriani, G. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation characterisation and cross-species amplification in *Prunus* / G. Cipriani, G. Lot, W.G. Huang [et al.] // *Theor Appl Genet*. - 1999 - Vol. 99 – P.65-72.
- 5 Aranzana, MJ. Development and variation analysis of microsatellite markers in peach / MJ. Aranzana, J. Garcia-Mas, J. Carbo [et al.] // *Plant Breeding* – 2002 - Vol.121– P.87–92.
- 6 Aranzana, MJ. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification marker mutation pedigree inferences and population structure / MJ. Aranzana, J. Carbó, P. Arús // *Theor Appl Genet* – 2003 - Vol.106. – P.1341-1352.
- 7 Horvath, A. Phenotypic variability and genetic structure in plum (*Prunus domestica* L.), cherry plum (*P. cerasifera* Ehrh.) and sloe (*P. spinosa* L.) / A. Horvath, E. Balsemin, J.-C. Barbot [et al.] // *Scientia Horticulturae* – 2011. - Vol.129 – P.283–293.
- 8 Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucleic Acids Research*.- 1980.- V.10.- P. 4321-4325.
- 9 Gross, B. L. Identification of interspecific hybrids among domesticated apple and wild relatives / B. L. Gross, A. D. Henk, P. L. Forsline [et al.] // *Tree Genetics & Genomes*. – 2012. Vol. 102 - P. 865 – 870.
- 10 Yamamoto T. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear / Yamamoto T., Kimura T., Sawamura Y. [et al.] // *Theor Appl Genet*.- 2001-Vol.102-P. 865 – 870.
- 11 Супрун И.И., Токмаков С.В., Малюченко О.П., Ушакова Я.В., Бабаков А.В. Генотипирование сортов яблони российской селекции с использованием микросателлитных маркеров // *Известия ТСХА*.-№ 2011.- №6.- С.162-166.