



Zastosowanie markerów molekularnych do oceny genotypów jabłoni pod kątem odporności na parcha jabłoniowego (*Venturia inaequalis*)

Małgorzata Korbin, Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Edward Żurawicz
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice

Application of molecular markers in evaluation of selected apple genotypes for apple scab resistance genes

Summary

Breeding for scab resistant apple cultivars by pyramiding several genes in the same genetic background is a promising way to control this severe disease caused by *Venturia inaequalis*. To achieve this goal, molecular potential of expected parental forms should be determined. Screening of 24 genotypes used in apple breeding program for the presence of regions, linked to the resistance to apple scab with DNA markers flanking regions of four major genes *Vf*, *Vbj*, *Vr* and *Vm*, was conducted in the Research Institute of Pomology and Floriculture. All investigated resistance (R) regions were identified in evaluated population and three clusters representing the group of the genotypes without or with single tested R-gene and two groups of the genotypes, being the parallel donors of 3-4 R-genes, were generated.

Key words:

Venturia inaequalis, molecular markers, screening for resistance.

Adres do korespondencji

Małgorzata Korbin,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarnictwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice;
e-mail:
mkorbin@insad.pl

1. Wstęp

Parch jabłoniowy, powodowany przez grzyb *Venturia inaequalis* (Cook) Aderh. jest jedną z najgroźniejszych chorób jabłoni w strefie klimatu umiarkowanego. Przez wiele lat odporność odmian hodowlanych jabłoni na parcha uznawano za cechę kodo-

waną wyłącznie przez gen *Vf*, pochodzący z *Malus floribunda* 821 (1,2). W końcu lat 80. ubiegłego wieku zaobserwowano przełamanie odporności w wielu odmianach zawierających gen *Vf* i uznawanych za odporne na tę chorobę (3). Wykrycie kolejnych ras *V. inaequalis* (4) i identyfikacja nowych genów warunkujących występowanie cechy odporności na różne rasy patogena (5-8) zainicjowało nową strategię w hodowli odpornościowej, uwzględniającą pełną analizę molekularną materiałów wyjściowych (9,10). Celem tej pracy była ocena wybranych genotypów jabłoni z kolekcji hodowlanej Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa pod kątem obecności czterech genów warunkujących odporność na różne rasy parcha jabłoni oraz próba doboru najlepszych materiałów wyjściowych dla hodowli odpornościowej tego gatunku, prowadzonej w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarstwa (ISK) w Skierniewicach.

2. Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły rośliny 22 odmian *Malus domestica* o różnej podatności na parcha jabłoniowego ('Antonówka Zwykła', 'Ariwa', 'Gold Milenium', 'Free Redstar', 'Golden Delicious', 'Gold Rush', J-79, 'McIntosh', 'Melfree', 'Nova Easygro', 'Pinova', 'Rajka', 'Reandra', 'Realka', 'Red Rome', 'Remura', 'Resi', 'Retina', 'Rewena', 'Rome Spur', 'Rubinola', 'Topaz') oraz rośliny gatunków dzikich znanych jako odporne: *M. floribunda* 821 i *M. baccata jackii*. Rośliny pochodziły z kolekcji hodowlanej ISK. Z każdego z wytypowanych genotypów pobrano po 2 próby (2 g świeżych liści), z których izolowano materiał genetyczny (genomowe DNA). Izolację prowadzono metodą Aldricha i Culisa (11). Czystość i stężenie DNA w uzyskanych preparatach oceniano spektrofotometrycznie i na podstawie elektroforezy w żelu agarozowym.

Fragmenty zawierające geny odporności amplifikowano w PCR ze starterami SCAR zaprojektowanymi syntetyzowanymi na bazie sekwencji markerów zlokalizowanych na mapie genomu jabłoni (7,8,12-15). Do amplifikacji regionu *Vf* zastosowano startery: ACS03 (*taagacccactgttttggcatg/gaattcagagtttagtctttcaatt*), ACS07 (*gtgccaatgtaatcagagtgacgtg/atgtaggtggtgatgtatctggatt*), ACS09 (*acatggaagatgaaggagaaggag/gataaattgagtgactgcaaagcg*), AM19 (*cgtagaacggaatttgacagtg/gacaaagggcttaagtctcc*) i AL07 (*tggaagagagatccagaagatg/catccctccacaaatgcc*). Do amplifikacji regionu *Vbj* użyto starterów K08, T06 i Z13 (*gaacactgggcaaaggaac/ taaagccacgttctctcgc; cgttcaactcataagtggtcc/aagggcagaatgataaaagcc; ccttagcatgccataaaacc/ccagtggaaatatttcgagg*). Do amplifikacji fragmentu zawierającego gen *Vr* użyto starterów AD13 (*ggttctctgtaaagctag/ggttctctgcccacaaca*), a do namnożenia genu *Vm* starterów OBP12 (*ccttgacgcagctt/ccttgacgcactctag*). Reakcje amplifikacji prowadzono w termocyklerze PTC-200 MJ Research (35 cykli) przy profilu termicznym 94°C przez 30 sekund, 60-67°C (zależnie od startera) przez 30 sekund i 72°C przez 60 sekund. Mieszanina reakcyjna (13 µl) zawierała 3 ng genomowego DNA, 5U Taq Polimerazy Platinum w buforze z 10 mM MgCl₂ (Invitrogen) i 5 mM każdego startera. Produkty PCR były rozdzielane w 1%

żelu agarozowym, wybarwiane bromkiem etydyny i wizualizowane w świetle UV. Wielkość produktów oceniano poprzez porównanie z DNA faga λ trawionego enzymami restrykcyjnymi *EcoR* I i *Hind* III (Frementas).

3. Wyniki i dyskusja

W wyniku reakcji amplifikacji przeprowadzonej na matrycy genomowego DNA izolowanego z różnych genotypów *Malus* sp. z dziesięcioma starterami SCAR, specyficznymi dla regionów *Vf*, *Vr*, *Vbj* i *Vm*, uzyskano 15 produktów o długości od 240 do 1300 pz (tab. 1,2).

W reakcji ze starterami ACS03, ACS07 i ACS09, specyficznymi dla fragmentów flankujących region *Vf* (14), produkty PCR o oczekiwanej długości (odpowiednio: 240 pz, 320 pz i 490 pz) uzyskano dla 15 genotypów. W reakcji na matrycy DNA roślin 'Antonówka zwykła', 'Red Rome', 'Red Spur', 'Golden Delicious', 'McIntosh', 'Remura' i 'Pinova' produktów amplifikacji z tymi starterami nie obserwowano lub były to produkty uzyskane w PCR z pojedynczymi parami starterów (np. 'Remura' ze starterami ACS03). Wyniki testów ze starterami AL07 i M19, także używanymi do flankowania regionu *Vf* przy zagęszczaniu mapy genomu jabłoni (13,14,16,17), potwierdziły obecność pożądanego fragmentu w 14 z wymienionych genotypów (tab. 1). W reakcji amplifikacji na matrycy DNA wyizolowanego z tkanek tych roślin uzyskiwano produkt o długości około 470 pz (*M. floribunda* 821, 'Resi' i *M. baccata jackii*) lub dwa produkty o długości 470 pz i 720 pz. W reakcjach prowadzonych na matrycy genomowego DNA roślin 'Retina', 'Antonówka zwykła', 'Red Rome', 'Red Spur', 'Golden Delicious' i 'McIntosh' uzyskano wyłącznie produkty o długości 720 pz. Biorąc pod uwagę fakt, że *M. floribunda* jest uznanym donorem odporności na wcześniej znane rasy *V. inaequalis* i donorem genu *Vf* (18,19) oraz dane potwierdzające, że *Vf* jest genem dominującym, dziedziczonym w sposób mendlowski (20) można uznać, że genotypy, dla których uzyskano wyłącznie amplikon o długości 470 pz są odpornymi homozygotami dominującymi (RR) (tab. 3). Do grupy donorów odporności należą także heterozygoty (Rs) generujące w PCR produkty 470 i 720 pz, podczas gdy pojedynczy produkt 720 pz występuje w roślinach porażanych przez patogena. Założenie to znajduje potwierdzenie w wynikach badań fenotypowych uzyskanych dla niektórych z tych odmian (3,9).

Tabela 1

Produkty reakcji amplifikacji na matrycy DNA genotypów z badanej populacji jabłoni ze starterami SCAR, specyficznymi dla sekwencji flankujących gen *Vf*

Analizowany genotyp	Region <i>Vf</i>				
	produkty PCR (pz) uzyskane w reakcji ze starterami SCAR (5 par)				
	AL07	M19	ACS03	ACS07	ACS09
Antonówka	-720	—	—	—	—
Ariwa	470 (R), 720	530	240	320	490
Free Redstar	470 (R), 720	530	240	320	490
Gold Milenium	470 (R), 720	530	240	320	490
Gold Rush	470 (R), 720	530	240	320	490
Golden Delicious	720	—	—	—	—
J-79	470 (R), 720	530	240	320	490
<i>M. floribunda</i> 821	470 (R)	530	240	320	490
<i>M. baccata jackii</i>	470 (R)	530	240	320	490
McIntosh	720	—	—	—	—
Melfree	470 (R), 720	530	240	320	490
Nova Easygro	470 (R), 720	530	240	320	490
Pinova	720	—	240	320	—
Rajka	470 (R), 720	530	240	320	490
Realka	470 (R), 720	530	240	320	490
Reanda	470 (R), 720	530	240	320	490
Red Rome	720	—	—	—	—
Remura	720	—	240	—	—
Resi	470 (R)	530	240	320	490
Retina	720	—	240	320	490
Rewena	470 (R), 720	530	240	320	490
Rome Spur	720	—	—	—	—
Rubinola	470 (R), 720	530	240	320	490
Topaz	470 (R), 720	530	240	320	490

R — allel warunkujący odporność.

W reakcji ze starterami specyficznymi do fragmentów DNA flankujących gen *Vbj* (8), uzyskano produkty PCR o długości około 740 pz i 900 pz (starter K08), 770 pz (Z-13) i 800 pz (T06) (tab. 2). Produkt o długości 740 pz był amplifikowany na matrycy DNA rośliny *M. baccata jackii*, będącej donorem *Vbj*, na matrycy DNA 19 innych roślin znanych jako mało podatne na parcha jabłoniowego (m.in. *M. floribunda* 821, 'Retina', 'Ariwa', J-79, 'Melfree', 'Gold Milenium', 'Free Redstar', 'Gold Rush', 'Antonówka Zwykła', 'Red Rome', 'Rome Spur' i 'Resi'), a także w roślinach odmiany McIntosh.

tosh, bardzo wrażliwej na porażenie przez *V. inaequalis*. Fragment 740 pz nie był namnażany w reakcjach na matrycy DNA roślin 'Rubinola', 'Rajka', 'Topaz' i 'Golden Delicious'. Dla roślin tych, a także dla roślin 'Retina', 'Ariwa', 'Gold Milenium', 'Free Redstar', 'Gold Rush' uzyskano produkt o długości 900 pz, amplifikowany w PCR, ale nie sprzężony z cechą odporności (8). W reakcji ze starterem Z-13 produkt o oczekiwanej długości około 770 pz był namnażany w oparciu na DNA roślin 'Gold Milenium', 'Gold Rush', 'Red Rome', 'Rome Spur', 'McIntosh', 'Resi', 'Pinova', 'Realka', 'Rewena' oraz *M. baccata jackii*. W reakcji ze starterem T06 dla żadnej z badanych roślin nie uzyskano produktu o długości 400 pz, który prawdopodobnie zawiera gen odporności (8), a obserwowano jedynie przypadkowo amplifikowany fragment o długości około 800 pz (tab. 2).

Tabela 2

Produkty reakcji amplifikacji na matrycy DNA genotypów z badanej populacji jabłoni ze starterami SCAR, specyficznymi dla różnych sekwencji flankujących geny *Vr*, *Vbj* i *Vm*

Analizowany genotyp	Produkty PCR (pz) ze starterami SCAR				
	region <i>Vr</i>	region <i>Vbj</i>			Gen <i>Vm</i>
	startery AD13	startery K08	startery T06	startery Z13	startery Vm
1	2	3	4	5	6
Antonówka	1100	740 (R)	790	–	690 (R)
Ariwa	1100	740 (R), 900	790	–	690 (R)
Free Redstar	1100	740 (R), 900	790	–	690 (R)
Gold Milenium	950(R), 1100,1200	740 (R), 900	790	770 (R)	690 (R)
Gold Rush	950(R), 1100,1200	740 (R), 900	790	770 (R)	690 (R)
Golden Delicious	1100	900	790	–	690 (R)
J-79	950(R), 1100,1200	740 (R)	790	–	690 (R)
<i>M. floribunda</i> 821	1100	740 (R)	790	–	–
<i>M. baccata jackii</i>	1100	740 (R)	790	770 (R)	–
McIntosh	1100	740 (R)	790	770 (R)	690 (R)
Melfree	1300, 1200, 1100, 950 (R)	740 (R)	790	–	690 (R)
Nova Easygro	1100, 950 (R)	740 (R)	790	–	690 (R)
Pinova	1300, 1200, 1100	740 (R), 900	790	770 (R)	690 (R)
Rajka	1100	900	790	–	690 (R)
Realka	1100, 950 (R)	740 (R), 900	790	770 (R)	690 (R)
Reanda	1300, 1200, 1100, 950 (R)	740 (R)	790	770 (R)	690(R)
Red Rome	1100	740 (R)	790	770 (R)	690 (R)
Remura	950(R), 1100, 1300	740 (R), 900	790	–	690 (R)
Resi	1100, 950 (R)	740 (R), 900	790	770 (R)	690 (R)
Retina	1300, 1200, 1100, 950 (R)	740 (R), 900	790	–	690 (R)

1	2	3	4	5	6
Rewena	1300, 1200, 1100, 950 (R)	740 (R), 900	790	770 (R)	690 (R)
Rome Spur	1100	740 (R)	790	770 (R)	690 (R)
Rubinola	1100	900	790	–	690 (R)
Topaz	1100	900	790	–	690 (R)

R — region sprzężony z odpornością na parcha jabłoniowego.

W reakcji ze starterem AD13 specyficznym dla genu *Vr* z rosyjskiej siewki R12740-7A (5,21) uzyskano produkty o długości 1300, 1200, 1100 i 950 pz. Fragmenty o długości 1300/1200 pz, 1100 pz i 950 pz zostały namnożone w oparciu na DNA pochodzącym z roślin 'Gold Milenium', 'Gold Rush', 'J-79', 'Melfree', 'Reanda', 'Rewena', 'Retina' i 'Remura'. Produkt o długości 950 pz występował także w DNA wyizolowanym z roślin 'Realka', 'Nova Easygro' i 'Resi', a produkt 1100 pz był obecny we wszystkich próbach, pochodzących z analizowanych genotypów. Ustalono, że wyłącznie produkt o długości 950 pz jest związany z cechą odporności (R) na *V. inaequalis*, podczas gdy pozostałe produkty występują także w DNA roślin podatnych na parcha jabłoniowego (8). W reakcji ze startem OBP12 (7) specyficznym dla genu *Vm*, którego znanym donorem jest *M. micromalus* (22) produkt PCR o oczekiwanej długości około 690 pz wykryto dla wszystkich testowanych roślin, z wyjątkiem *M. floribunda* i *M. baccata jackii* (tab. 2).

Podsumowując przedstawione wyniki można stwierdzić, że w testowanej populacji genotypów jabłoni obecne są wszystkie cztery analizowane geny odporności na parcha jabłoniowego (tab. 3). Rozkład tych genów i ich obecność zarówno w odpornych w warunkach polowych gatunkach dzikich jak też w odmianach wykazujących różny stopień podatności na parcha jabłoni w testach polowych (np. 'Antonówka zwykła' a 'McIntosh') potwierdza równocześnie złożoność zjawiska odporności na tę chorobę. Badania nad mechanizmami odporności i wytwarzaniem odmian odpornych na parcha jabłoniowego trwają od wielu lat (19,23-25). Dotychczas wykryto sześć głównych genów odpowiadających za odporność na znane rasy *V. inaequalis* (8). Mechanizm nie został jednak całkowicie rozpoznany nawet dla genu *Vf*, który zapewnia roślinom odporność na wiele izolatów należących do pięciu ras *V. inaequalis* (23). Wiadomo, że pełna, monogeniczna, *Vf*-zależna odporność na parcha występuje wyłącznie w ozdobnej jabłoni *M. floribunda* 821. Odporność roślin należących do odmian hodowlanych ma charakter ilościowy, a z najnowszych badań wynika, że aktywność genu *Vf* jest silnie zmodyfikowana w tych roślinach przez liczne sekwencje modulujące (26). Równolegle znanych jest ponad 70 całkowicie odpornych odmian/klonów, uzyskanych w wyniku krzyżowania konwencjonalnego z donorami genu *Vf* (27). Złożoność mechanizmu odporności na parcha znajduje także odzwierciedlenie w wynikach uzyskanych dla roślin odmiany Antonówka Zwykła (donor nie badanego w tej pracy genu *Va*), Red Rome i Rome Spur. Rośliny te wykazują małą podatność na

parcha jabłoniowego w warunkach silnej presji patogena (3), a nie stwierdzono obecności genu *Vf* w ich genomie. Z kolei w roślinach, w których genomie występują fragmenty odpowiadające regionom *Vbj* i *Vm* (tab. 1,2), a które są znane jako silnie porażane przez *V. inaequalis* (3,9), najprawdopodobniej nie obserwuje się ekspresji tych genów w warunkach polowych lub odporność jest przełamana przez inne rasy patogena.

4. Podsumowanie

Analiza rozkładu genów odporności *Vf*, *Vbj*, *Vr* i *Vm* w badanej populacji jabłoni umożliwiła wyodrębnienie trzech grup genotypów o określonym potencjale hodowlanym (rys.). Grupa I obejmowała genotypy nie zawierające regionów z genami odporności (np. 'Golden Delicious') lub zawierające pojedyncze regiony (np. 'Red Rome'). Grupa II i III obejmowały donory trzech-czterech R-regionów (m.in. 'Melfree', 'Gold Milenium', J-79). Genotypy z grupy II i III mogą stanowić cenne materiały wyjściowe dla programu hodowlanego, uwzględniającego efekt odporności piramidalnej (9,10).

Tabela 3

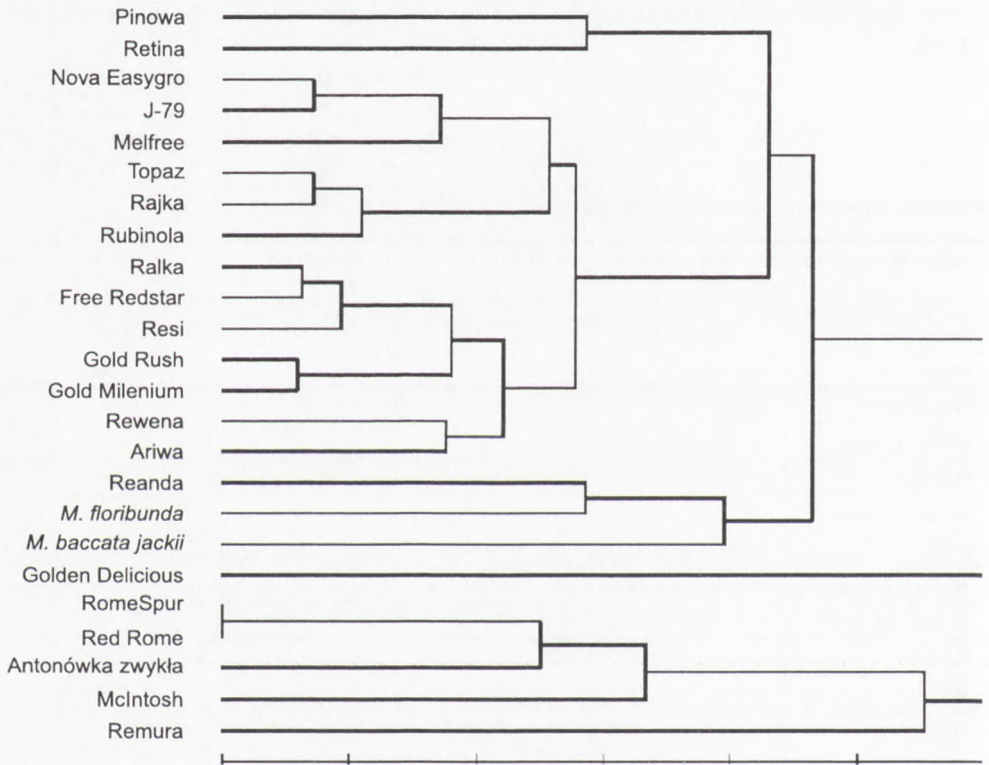
Obecność regionów sprzężonych z cechą odporności w poszczególnych genotypach

Analizowane genotypy	Region <i>Vf</i>	Region <i>Vbj</i>	Region <i>Vr</i>	Gen <i>Vm</i>
1	2	3	4	5
Antonówka	-/-/-/-/ (ss)	+/-/-	-	+
Ariwa	+ / + / + / + / + (Rs)	+ / - / -	-	+
Free Redstar	+ / + / + / + / + (Rs)	+ / - / -	-	+
Gold Milenium	+ / + / + / + / + (Rs)	+ / - / +	+	+
Gold Rush	+ / + / + / + / + (Rs)	+ / - / +	+	+
Golden Delicious	- / - / - / - / - (ss)	- / - / -	-	+
J-79	+ / + / + / + / + (Rs)	+ / - / -	+	+
<i>M. floribunda</i> 821	+ / + / + / + / + (RR)	+ / - / -	-	-
<i>M. baccata jackii</i>	+ / + / + / + / + (RR)	+ / - / +	-	-
McIntosh	- / - / - / - / - (ss)	+ / - / +	-	+
Melfree	+ / + / + / + / + (Rs)	+ / - / -	+	+
Nova Easygro	+ / + / + / + / + (Rs)	+ / - / -	+	+
Pinova	- / - / + / + / - (ss)	+ / - / +	-	+
Rajka	+ / + / + / + / + (Rs)	- / - / -	-	+
Realka	+ / + / + / + / + (Rs)	+ / - / +	+	+
Reanda	+ / + / + / + / + (Rs)	+ / - / +	+	+

1	2	3	4	5
Red Rome	-/-/-/- (ss)	+/-/+	-	+
Remura	-/-+/-/- (ss)	+/-/-	+	+
Resi	+/+/+/+ (Rs)	+/-/+	+	+
Retina	-/-+//+/+ (ss)	+/-/-	+	+
Rewena	+/+/+/+ (Rs)	+/-/+	+	+
Rome Spur	-/-/-/- (ss)	+/-/+	-	+
Rubinola	+/+/+/+ (Rs)	-/-/-	-	+
Topaz	+/+/+/+ (Rs)	-/-/-	-	+

Większa liczba plusów/minusów w kolumnie oznacza wyniki testów z więcej niż jedną parą starterów. Dla regionu Vf według kolejności wyniki reakcji ze starterem Al07, M19, ACS03, ACS07, ACS09. Dla regionu Vb1 według kolejności wyniki reakcji ze starterem K08, T06 i Z13.

Oznaczenia dla fragmentów uzyskanych w reakcji ze starterami Al07: ss — homozygota recesywna podatna, Rs — heterozygota dominująca odporna, RR — homozygota dominująca odporna.



Rys. Dendrogram zależności między badanymi genotypami jabłoni opracowany metodą UPGMA na podstawie analizy produktów generowanych w PCR ze starterami flankującymi regiony sprzężone z odpornością na parcha jabłoniowego. Obecność/brak produktu zestawiono w postaci matrycy 1/0. Dystans genetyczny (na osi odciętych) oznaczono dla każdej pary jednostek (OTU).

Literatura

1. Hough L. F., Shay J. R., Dayton D. F., (1953), Proc. Am. Soc. Hortic. Sci., 62, 805-820.
2. Rousselle G. L., Williams E. B., Hough L. F., (1974), Proc. of XIX Int. Hortic. Congress, Warsaw, vol. III, 19-20.
3. Parisi L., Lespinasse Y., Guillaumes J., Kruger J., (1993), Phytopathology, 93, 533-537.
4. Parisi L., Fouillet V., Schouten H., Groenwold R., Laurens F., Didelot F., Evans K., Fisher C., Gennari F., Kemp H., Lauter M., Patocchi A., Thissen J., Tsiouridis C., (2004), Acta Hort., 663, 107-113.
5. Hemmat B., Brown S. K., Weeden N. F., (2002), J. Am. Soc. Hort. Sci., 127, 365-370.
6. Hemmat B., Brown S. K., Aldwinkle H. S., Weeden N. F., (2003), Acta Hort., 633, 153-161.
7. Cheng F. S., Weeden N. F., Brown S. K., Aldwinkle H. S., Gardiner S. E., Bus V. G., (1998), Genome, 41, 208-214.
8. Gyax M., Gianfranceschi L., Liebhard R., Kellerhaus M., Gessler C., Patocchi., (2004), Theor. Appl. Genet., 109, 1702-1709.
9. Crosby J. A., Janick J., Pecknold P. C., Korban S. S., O'Connon P. A., Ries S. M., Goffreda J., Voodeckers A., (1992), Fruit Varieties Journal, 46(3), 145-166.
10. Zhdanov V. V., Sedov E. N., (2002), Russian Journal of Genetics, 38/12, 1411-1416.
11. Aldrich J., Cullis C. A., (1993), Plant Mol. Biol. Rep., 11, 128-141.
12. Patocchi A., Gianfranceschi, Gesler C., (1999), Theor. Appl. Genet., 99, 1012-1017.
13. Xu M. L., Korban S., (2000), Theor. Appl. Genet., 101, 844-851.
14. Huaracha E., Xu M., Korban S., (2004), Theor. Appl. Genet., 108, 274-279.
15. Patocchi A., Bigler B., Koller B., Kellerhaus M., (2004), Theor. Appl. Genet., 109, 1087-1092.
16. Gessler C., Gianfranceschi L., Koller B., Seglias N., Sierotzki H., Koch T., Tenzer I., Blaise P., (1995), Agriobiotec: Atti del Convegno Ferrara, 251-266.
17. Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S., Gessler C., (1999), Plant Breeding., 118, 183-186.
18. Crandall C. S., (1926), Illinois Agr. Expt. Sta. Bull., 275, 341-600.
19. Dayton D. F., Williams E. B., (1968), Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 93, 89-94.
20. Gessler C., (1989), in: Eds. Gessler C., Butt D. J., Koller B., *Integrated control of pome fruit diseases II*, OILB-WPRS Bulletin XII/6, 168-190.
21. Budichevskaia A., Flachovsky H., Peil A., Fisher C., Duneman F., (2006), Tree Genetics & Genomics, 2, 186-195.
22. Williams E. B., Brown A. G., (1968), Plant Dis. Rep., 52, 799-801.
23. Williams E. B., Dayton D. F., Shay J. R., (1966), Proc. Am. Soc. Hortic. Sci., 88, 52-56.
24. Williams E. B., Kuc J., (1969), Rev. Phytopathology., 7, 223-246.
25. MacHardy W. E., (1996), in: Ed. MacHardy W. E., *Apple scab: biology, epidemiology and management*, APS Press, St. Paul, Minn., 61-103.
26. Gao Z. S., van de Weg W. E., (2006), Euphytica., 151, 123-132.
27. Janick J., Cummings J. N., Brown S. K., Hemmat M., (1996), in: Eds. Janick J., Moore J. N., *Fruit breeding*, (vol. I): *Tree and tropical fruits*, John Wiley and Son, New York, 1-77.