


ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ МАЛИНЫ (*RUBUS* L.)

И.В. Анурова, м.н.с.
М.А. Должикова, м.н.с., аспирант
А.В. Пикунова , к.б.н.
А.А. Толпекина, м.н.с.
Н.И. Богомолова, к.с.-х.н.


ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район, д. Жилина, ВНИИСПК, pikunova@vniispk.ru

Аннотация

Малина (*Rubus* L.) – одна из самых распространенных ягодных культур в садоводстве. Только за последние пять лет в Государственный реестр селекционных достижений РФ включено 20 новых сортов малины. В настоящее время для идентификации сортов малины используются как количественные признаки, так и качественные, которые выявляются визуально в фенотипе растений. Одним из основных недостатков таких признаков является существенная зависимость их проявления от условий выращивания. Все это делает задачу идентификации и паспортизации уже существующих и новых сортов весьма актуальной. Биотехнология привела к фундаментальному сдвигу в обнаружении и мониторинге генетической изменчивости в селекции растений и генетических исследованиях. Более эффективной и перспективной системой маркирования селекционных достижений является генетическая паспортизация сорта, представляющая собой метод получения генетически детерминированных характеристик с помощью ДНК-маркеров. Анализ микросателлитных локусов малины достаточно широко используется в зарубежных исследованиях, и весьма ограниченно в отечественных. Целью данных исследований являлось создание генетических паспортов образцов малины на основании полиморфизма микросателлитных локусов. Было протестировано 9 образцов малины коллекции ВНИИСПК: Cascade Delight, Жар-Птица, Ostaria, Лячка, Бальзам, Журавлик, Спутница, Геракл и Метеор. В пределах анализируемой выборки сортообразцов амплифицировалось от 2-х до 5-ти фрагментов в отдельном локусе. В пределах проанализируемой выборки 5 из 9 сортообразцов имеют уникальный профиль. Для сортообразцов Журавлик и Геракл, а также Спутница и Метеор получены идентичные профили, отличающиеся от других сортообразцов задействованных в анализе.

Ключевые слова: малина, генетические паспорта, микросателлитные локусы, ДНК, ПЦР

GENETIC CERTIFICATION OF RASPBERRIES (*RUBUS L.*)

I.V. Anurova, junior researcher
M.A. Dolzhikova, junior researcher, postgraduate student
A.V. Pikunova , candidate of biological sciences
A.A. Tolpekina, junior researcher
N.I. Bogomolova, candidate of agricultural science

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina,
VNIISPK, pikunova@vniispk.ru

Abstract

Raspberry (*Rubus L.*) is one of the most common berry crops in horticulture. For the last five years, 20 new raspberry varieties have been included in the State Register of Selection Achievements of the Russian Federation. Currently, to identify raspberry varieties quantitative and qualitative traits are used which are detected visually. One of the main disadvantages of such traits is the significant dependence on growing conditions. Thus, the task of identification and certification of existing and new varieties are very relevant. Biotechnology has led to a fundamental shift in the detection and monitoring of genetic variation in plant breeding and genetic researches. A more effective and promising system for marking breeding achievements is the genetic certification of the variety based on DNA-markers. SSR analysis of raspberry is widely used in foreign studies, and very is limited in Russian ones. The purpose of these studies was to create genetic passports of raspberry varieties based on the polymorphism of microsatellite loci. Nine raspberry samples (i.e. Cascade Delight, Zhar-Ptitsa, Octaria, Lyachka, Balsam, Zhuravlik, Sputnitsa, Gerakl and Meteor) of the VNIISPK collection were tested in 11 SSR loci. From two to five fragments were amplified per locus. Within the samples analyzed, for 5 out of 9 varieties unique profiles have been identified. Identical profiles were obtained for Zhuravlik and Gerakl, as well as Sputnitsa and Meteor, but those profiles differ from profiles of others varieties involved in the study.

Key words: raspberry, genetic certificates, microsatellite loci, DNA, PCR

Введение

Малина (*Rubus*) – одна из самых распространенных ягодных культур в садоводстве. Сладкие и ароматные плоды широко используются как в свежем виде, так и для переработки. Только за последние пять лет в Государственный реестр селекционных достижений РФ включено 20 новых сортов малины (Богомолова и др., 2016). Все это делает задачу идентификации и паспортизации уже существующих и новых сортов весьма актуальной.

В настоящее время для идентификации сортов малины используются как количественные признаки (число побегов, длина междоузлий, длина ягоды), так и качественные (окраска цветка, листьев, побегов и ягод, профиль и морщинистость листьев), которые выявляются визуально в фенотипе растений. Одним из основных недостатков таких признаков является существенная зависимость их проявления от условий выращивания, а также затрудненная идентификация в определенные сезоны года, например, в отсутствие цветения или плодоношения. В результате заключение о

принадлежности используемого посадочного материала к тому или иному сорту можно сделать лишь с определенной долей вероятности (Лебедев и др., 2015; Каган и др., 2014).

В связи с вышесказанным более эффективной и перспективной системой маркирования селекционных достижений является генетическая паспортизация сорта, представляющая собой метод получения генетически детерминированных характеристик с помощью молекулярных маркеров. Генетическая паспортизация представляет собой метод получения генетически детерминированных характеристик с помощью морфологических или молекулярных маркеров (Лебедев и др., 2015).

Описание морфологических характеристик селекционного материала – элемент классического генетического анализа и селекционного скрининга, его можно считать первым этапом генетической паспортизации. Второй этап связан с разработкой и использованием биохимических и молекулярно-генетических маркеров, так как прямое секвенирование геномов все еще достаточно дорого (Козловская и др., 2017; Калаев и др., 2012).

В мировой практике для индивидуальной паспортизации объектов сельского хозяйства используют преимущественно ДНК-маркеры. Молекулярные маркеры отличаются высоким уровнем полиморфизма между сортами и могут эффективно использоваться для оценки общих генетических характеристик (Тагиманова и др., 2014; Калаев и др., 2012).

На сегодняшний день микросателлитные ДНК-маркеры являются наиболее распространенным типом ДНК-маркерных систем, используемых при работе с генетическими ресурсами растений – определении структуры коллекций и степени генетического сходства, а также идентификация и ДНК-паспортизации образцов (Ушакова, 2015; Козловская и др., 2017).

Биотехнология привела к фундаментальному сдвигу в обнаружении и мониторинге генетической изменчивости в селекции растений и генетических исследованиях. В генетических исследованиях малины и ежевики были использованы различные методы молекулярных маркеров, случайную амплифицированную полиморфную ДНК (RAPD), простые повторы последовательности (SSR), полиморфизм длины амплифицированного фрагмента (AFLP) и другие (Swanson et al., 2011). Graham J и др. была разработана первая генетическая карта для красной малины (*R. idaeus* L.) (Graham et al., 2004). Наиболее полные генетические карты для красной малины, полученные на сегодняшний день, были недавно представлены Ward et al. используя GBS для генерации SNP-маркеров, дополненных набором SSR, охватывающим геном (Ward et al., 2013). Исследования с применением ДНК-маркеров недавно были проведены и на других представителях рода *Rubus*. Bushakra et al. разработали генетическую карту для черной малины (*R. occidentalis*) (Bushakra et al., 2013)

Впервые в России генотипирование микросателлитных локусов для оценки генетического полиморфизма отечественной коллекции малины проведено Пикуновой А.В. с соавторами (2013). В рамках исследований было генотипировано 12 сортообразцов малины по 9 микросателлитным локусам (Пикунова и др., 2013). Вопросам паспортизации малины с применением RAPD анализа посвящен ряд отечественных работ (Лебедев и др., 2015; Каган и др., 2014). Лебедев с соавторами представили первичные данные о полиморфности/мономорфности протестированных на малине и землянике микросателлитных локусов и их видовой специфичности (Лебедев и др., 2018).

Целью данных исследований являлось создание генетических паспортов образцов малины на основании полиморфизма микросателлитных локусов. Полученные генетические паспорта могут быть использованы для контроля процесса включения нового образца в коллекцию во избежание дублирования, выяснения с использованием молекулярных маркеров внутривидовых связей, анализа родства и т.д.

Материалы и методика исследования

ДНК из листьев выделяли по методике Doyle and Doyle (1990) с небольшими модификациями (Doyle et al., 1990).

Протестировано 9 образцов малины коллекции ВНИИСПК: Cascade Delight, Жар-Птица, Ostaria, Лячка, Бальзам, Журавлик, Спутница, Геракл и Метеор.

Выделенную ДНК разбавляли в 7 раз и использовали для проведения ПЦР. ПЦР проводили с использованием реактивов и BioTaq полимеразы фирмы Dialat Ltd. Проанализированные микросателлитные локусы перечислены в таблице 1. Они представляют 5 групп сцепления малины из 7. Праймеры синтезированы в фирме Синтол.

Таблица 1 – Параметры амплификации 11-ти микросателлитных локусов, задействованных в анализе

Локус	Температура отжига, °С	Ведущий праймер с хвостом 5'→3'	Обратный праймер 5'→3'
RubPara_SQ008_D04	53	aacaggtatgaccatga TTGAGAACCATGCCTACATATCTT	gttt GCTGGAAATGGATTGAATGG
ERubLR_SQ07_4_D05	50	aacaggtatgaccatga CTTCTTTCCAACCGATTTC	gttt ACGAATTGATTTTCATCAACC
ERubLR_SQ01_B06	53	aacaggtatgaccatga CCTCTACACCACCCATCAG	gttt CGTCATCGTCATCTCTCTCG
ERubLR_SQ19_3_G09	53	aacaggtatgaccatga GTTTCGTCATCGTCATCTCTC	gttt AGAAAACCAAACCCCTCTAC
ERubLR_SQ07_2_H02	50	aacaggtatgaccatga TGGCAATCAACCACTCTGTG	gttt CAAACTGACAAACGCTCTTCC
RubEndo_SQ004_N23	53	aacaggtatgaccatga CACTGCAAGGTGTCGTTTGT	gttt ATAGCTCCGGCAATCCATC
ERubLR_SQ19_1_A05	50	aacaggtatgaccatga GTTTGCTTCCCTTCGTAGTC	gttt TATACTAATGGCCACCTTGG
ERubLR_SQ06_2_E01	53	aacaggtatgaccatga GCAGGAGTTGGACGAGTAG	gttt TTTCCAGATCAAACAAGACC
ERubLR_SQ01_120	50	aacaggtatgaccatga TCTTTTGCGGTGGCTACAAG	gttt CAACCCGAAGTCTACAACAGC
ERubLR_SQ01_M20	50	aacaggtatgaccatga TTACGAACACCCATTAATTTAAGTC	gttt AATCCTGAGACCGACGAGTG
ERubLR_SQ01_G16	50	aacaggtatgaccatga GCACCCTAATCTCCATGACC	gttt CCGCTGTAGTTCCTGTAGGC

Условия ПЦР следующие: денатурация 5 мин при 95°C, затем 30 циклов – 30 с при 95°C, температура отжига специфична для конкретной пары праймеров, экспериментально подобранная – 30 с, 72°C – 30 с; финальная элонгация 72°C – 10 мин. (Должикова и др., 2018). Разделение ПЦР продуктов осуществляли в 8% ПААГ с последующим окрашиванием нитратом серебра, разгонка длилась 4,5 часа при напряжении 40 В.

Все этапы анализа с момента проведения ПЦР были проделаны трижды с использованием двух марок амплификаторов: амплификатор 2720 (Applied Biosystems, USA), амплификатор T200 (Bio Rad, USA).

Размеры фрагментов вычислялись условно путём сравнения с размерами молекулярного маркера DNA MW Ladder M50bp (фирма-производитель Dialat Ltd, размеры фрагментов: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 п.н.).

Результаты исследований и их обсуждение

При повторении анализа существенных различий в количестве и размерах

амплифицируемых фрагментов не обнаружено. В пределах анализируемой выборки сортообразцов амплифицировалось от 2-х до 5-ти фрагментов в отдельном локусе (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика полиморфизма 11-ти микросателлитных локусов у анализируемой выборки сортообразцов

Локус	Наблюдаемое кол-во фрагментов	Приблизительные размеры аллелей (п.н.)
RubPara_SQ008_D04	4	265, 273, 275, 375
ERubLR_SQ07_4_D05	2	267, 270
ERubLR_SQ01_B06	3	218, 222, 226
ERubLR_SQ19_3_G09	3	228, 232, 236
ERubLR_SQ07_2_H02	3	248, 256, 260
RubEndo_SQ004_N23	5	240, 265, 270, 275, 280
ERubLR_SQ19_1_A05	4	227, 230, 233, 260
ERubLR_SQ06_2_E01	2	212, 220
ERubLR_SQ01_120	3	270, 274, 276
ERubLR_SQ01_M20	3	255, 265, 267
ERubLR_SQ01_G16	5	220, 222, 226, 230, 256

В пределах проанализируемой выборки 5 из 9 сортообразцов имеют уникальный профиль. Для сортообразцов Журавлик и Геракл, а также Спутница и Метеор получены идентичные профили, отличающиеся от других сортообразцов задействованных в анализе (таблица 3).

Таблица 3 – Генетические паспорта девяти сортообразцов малины

Локус	Сорта								
	Cascade Delight	Жар-Птица	Octaria	Лячка	Бальзам	Журавлик	Спутница	Геракл	Метеор
RubPara_SQ008_D04	275	273	273	375	265	273	275	273	275
ERubLR_SQ07_4_D05	270	267/270	270	267/270	267/270	267/270	267/270	267/270	267/270
ERubLR_SQ01_B06	226	218/226	218	218/226	222/226	226	218/222	226	218/222
ERubLR_SQ19_3_G09	236	228/236	228	228/236	232/236	236	228/232	236	228/232
ERubLR_SQ07_2_H02	256	248/260	260	248/256	256/260	256/260	256/260	256/260	256/260
RubEndo_SQ004_N23	240/270	265/275	275/280	265/270	240/280	270/275	265/270	270/275	265/270
ERubLR_SQ19_1_A05	230/233	233/260	230	230	230/233	233/260	227/233	233/260	227/233
ERubLR_SQ06_2_E01	212/220	212	212	212	212/220	212	212/220	212	212/220
ERubLR_SQ01_120	274/276	270	270/274	276	274/276	270	276	270	276
ERubLR_SQ01_M20	255/265	255/265	255/265	255/265	255/267	267	267	267	267
ERubLR_SQ01_G16	220/222	220/230	222	222	220/226	220/256	220/226	220/256	220/226

Примечание – уникальные, в пределах анализируемой выборки образцов, сочетания аллелей выделены жирным.

Электорофореграммы полиморфизма микросателлитных локусов, исследуемых сортообразцов представлены на рисунках 1, 2 и 3.

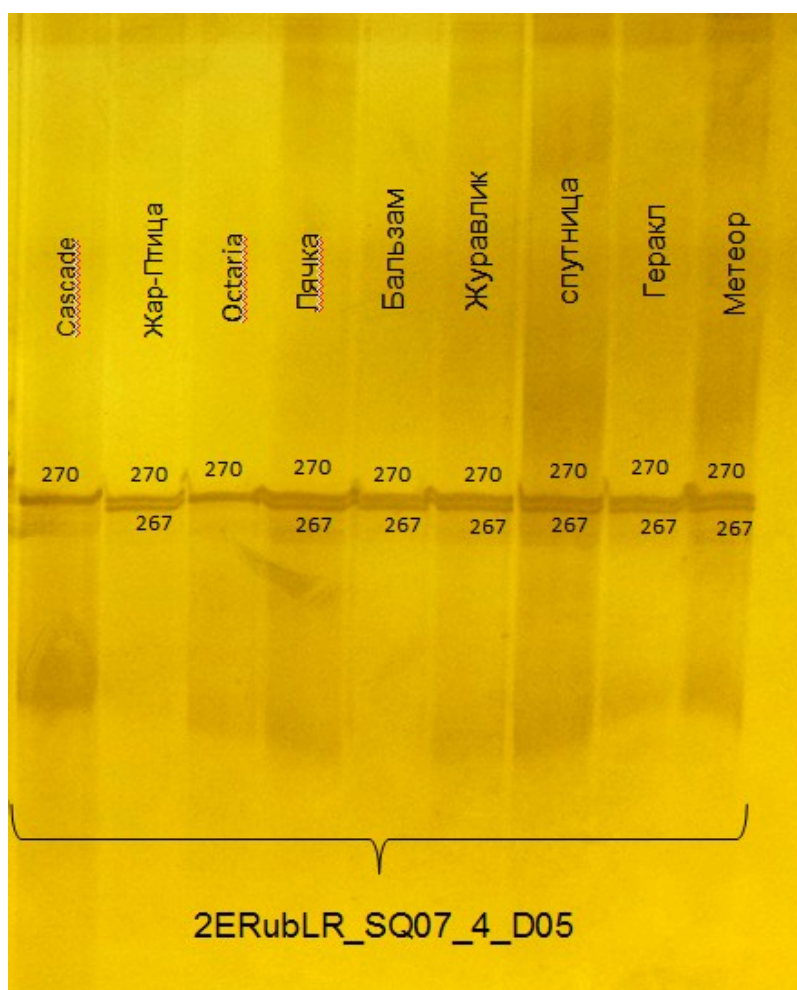


Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР продуктов локуса 2.ERubLR_SQ07_4_D05

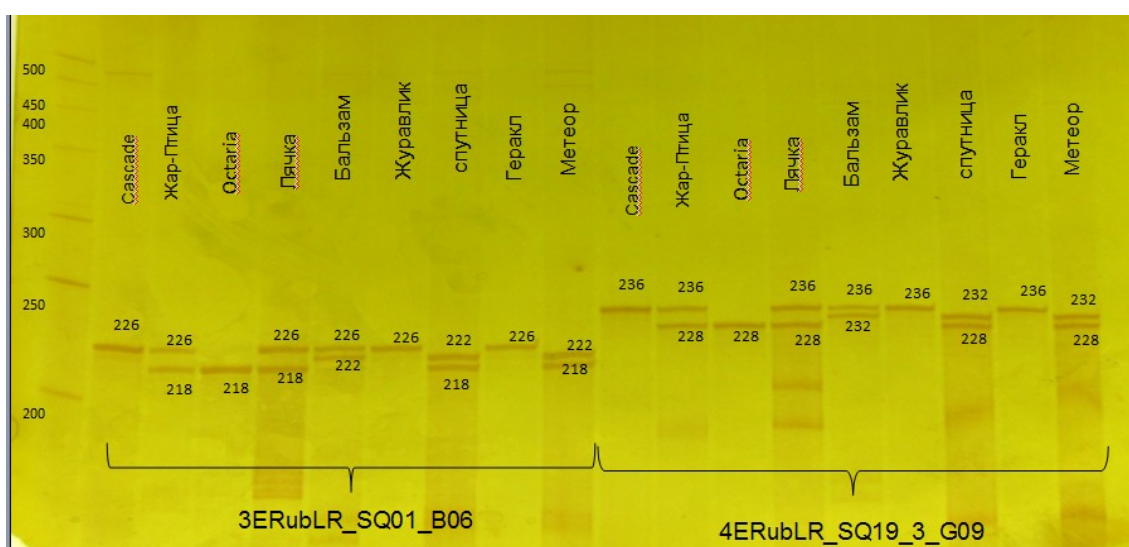


Рисунок 2 – Электрофореграмма ПЦР продуктов локуса 3.ERubLR_SQ01_B06 и локуса 4.ERubLR_SQ19_3_G09

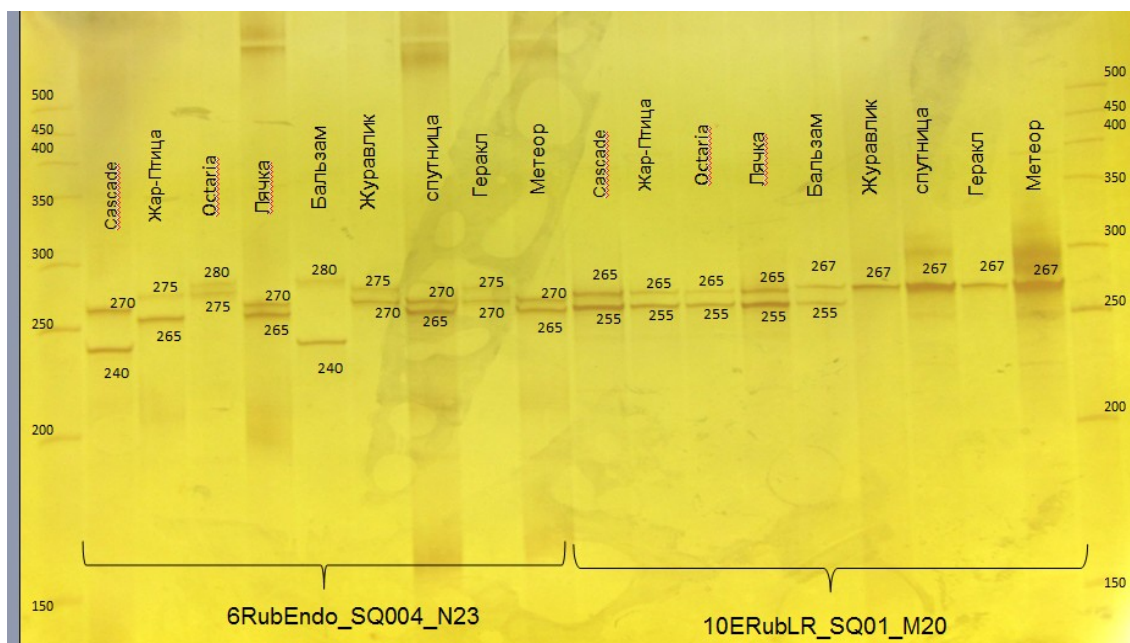


Рисунок 3 – Электрофореграмма ПЦР продуктов локуса 6.RubEndo_SQ004_N23 и локуса 10.ERubLR_SQ01_M20

В локусах ERubLR_SQ01_120 и ERubLR_SQ01_M20 разница в размерах аллелей не велика, поэтому желательно проводить детекцию на приборе типа ABI Prizm Genetic Analyzer.

Выводы

В результате исследований разработаны паспорта 5 образцов малины различного генетического и географического происхождения из коллекции ВНИИСПК. Для сортообразцов Журавлик и Геракл, а также Спутница и Метеор получены идентичные профили, отличающиеся от других сортообразцов задействованных в анализе. Положено начало созданию базы данных ДНК-паспортов малины генофонда ВНИИСПК. Выявлены редкие и уникальные аллели, которые могут быть использованы для целей подтверждения гибридности.

Литература

1. Богомолова Н.И., Ожерельева З.Е. Адаптивный потенциал малины красной к повреждающим факторам зимнего периода в полевых и контролируемых условиях Центральной России // Современное садоводство – Contemporary horticulture. 2016. №4. С.40-52. URL: <http://journal.vniispk.ru/pdf/2016/4/46.pdf>
2. Должикова М.А., Пикунова А.В, Седов Е.Н., Серова З.М. ДНК-генотипирование гибридного фонда яблони ВНИИСПК на присутствие гена VF устойчивости в парше // Современное садоводство – Contemporary horticulture. 2018. №3. С.27-32. <https://doi.org/10.24411/2312-6701-2018-10304>
3. Каган Д.И., Шестибратов К.А., Лебедев В.Г. Азарова А.Б., Филиппов М.С., Бесов С.А., Ивановская С.И., Ковалевич О.А., Барсукова М.М. Паспортизация сортов малины и ежевики и изучение их филогенетических взаимоотношений методом RAPD-анализа // Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: сборник статей международной научной конференции. Минск: ГНУ «Центральный

- ботанический сад Академии наук Беларуси», 2014. С. 101-104 URL: http://microklon.ru/uploads/_pages/441/proceedings-cbg.biotech-2014_.pdf#page=102
4. Калаев В.Н., Землянухина О.А., Карпеченко И.Ю., Карпеченко К.А., Кондратьева А.М., Вепринцев В.Н. Использование методов молекулярно-генетического анализа для изучения полиморфизма ДНК растений рода *Phododendron* с целью их паспортизации // *Фундаментальные исследования*. 2012. № 6, Ч. 2. С. 323-328. URL: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=29984>
 5. Козловская З.А., Леонович И.С., Гашенко Т.А., Кондратенко Ю.Г. Молекулярно-генетическая паспортизация национальной коллекции яблони в Белоруссии. Сборник научных трудов в ГНБС. 2017. Т. 144, Ч. 1. С. 134-138. URL: http://scbook.nbgnsipro.com/download/144-1/30_144_1-2017.pdf
 6. Лебедев В.Г. Способ идентификации сортов малины на основе RAPD-маркеров // Патент РФ № 2015105268. 2015.
 7. Лебедев В.Г., Каган Д.И., Видягина Е.О. Способ генетической паспортизации селекционных достижений малины на основе RAPD-маркеров // Патент РФ № 2017112958. 2017
 8. Лебедев В.Г., Субботина Н.М., Киркач В.В., Видягина Е.О., Поздняков И.А., Шестибратов К.А. Анализ микросателлитных локусов как первый этап на пути к маркерной селекции малины и земляники // *Селекция и сорторазведение садовых культур*. 2018. Т. 5, № 1. С. 65-68.
 9. Пикунова А.В., Князев С.Д., Седов Е.Н., Богомолова Н.И. Генотипирование микросателлитных локусов яблони, малины и черной смородины из коллекции ВНИИСПК // *Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: материалы XIII молодежной научной конференции*. М.: ВНИИСБ, 2013. С. 44-46.
 10. Тагиманова Д.С., Альжанова А.Ж., Хапилина О.Н., Календарь Р.Н. Использование ПЦР амплификации – IRAP и iPBS методов для генетического анализа сортов пшеницы // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. 2014. №4. С. 30-34. <https://doi.org/10.11134/btp.4.2014.4>
 11. Ушакова Я.В. Использование технологий ДНК-маркирования в селекционно-генетических исследованиях яблони: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Краснодар, 2015.
 12. Bushakra J.M., Krieger C., Deng D., Stephens M.J., Allan A.C., Storey R., Symonds V.V., Stevenson D., McGhie T., Chagne D., Buck E.J., Gardiner S.E. QTL involved in the modification of cyanidin compounds in black and red raspberry fruit // *Theoretical and Applied Genetics*. 2013. Vol. 126, N 3. P. 847–865. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-2022-4>
 13. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. 1990. Vol. 12, N 1. P.13-15.
 14. Swanson J.D., Carlson J.E., Fernandez-Fernandez F. Raspberries and blackberries // *Genetics, Genomics and Breeding of Berries / Folta, K., Kole, C. (Eds.)*. Boca Raton: CRC Press, 2011. P. 64-105. <https://doi.org/10.1201/b10922>
 15. Graham J., Smith K., MacKenzie K., Jorgenson L., Hackett C., Powell W. The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004. N 109. P. 740–749. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1687-8>
 16. Ward J.A., Bhangoo J., Fernandez-Fernandez F., Moore P., Swanson J.D., Viola R., Velasco R., Bassil N., Weber C.A., Sargent D.J. Saturated linkage map construction in *Rubus idaeus* using genotyping by sequencing and genome-independent imputation. // *BMC genomics*. 2013. Vol. 14, N 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-2>

References

1. Bogomolova, N.I., & Ozherelieva, Z.E. (2016). An adaption potential of red raspberry to damaging winter factors in the field and controlled conditions of central Russia. *Sovremennoe sadovodstvo – Contemporary horticulture*, 4, 40-52. Retrieved from: <http://journal.vniispk.ru/pdf/2016/4/46.pdf>. (In Russian, English abstract).
2. Dolzhikova, M.A., Pikunova, A.V., Sedov, E.N., & Serova, Z.M. (2018). DNA genotyping of the hybrid fund of apple VNIISPK for the presence of VF's DNA marker for resistance to scab. *Sovremennoe sadovodstvo – Contemporary horticulture*, 3, 27-32. (In Russian, English abstract). <https://doi.org/10.24411/2312-6701-2018-10304>
3. Kagan, D.I., Shestibrstov, K.A., Lebedev, V.G., Azarova, A.B., Filippov, M.S., Besov, S.A., Ivanovskaya, S.I., Kovalevich, O.A., & Barsukova, M.M. (2014). Certification of raspberry and blackberry varieties and the study of their phylogenetic relationships using RAPD analysis. In *Biotechnological methods in conservation of biodiversity and plant breeding: Proc. Sci. Conf.* (pp. 101-104). Minsk: Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. Retrieved from: http://microklon.ru/uploads/_pages/441/proceedings-cbg.biotech-2014_.pdf#page=102
4. Kalaev, V.N., Zemlyanukhina, O.A., Karpechenko, I.Y., Karpechenko, K.A., Kondratieva, A.M., & Veprintsev, V.N. (2012). Use of the methods of molecular genetic analysis for study of DNA polymorphism of Phododendron plants for the aim of their certification. *Fundamental research*, 6(2), 323-328. Retrieved from <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=29984>. (In Russian, English abstract).
5. Kazlouskaya, Z.A., Leanovich, I.S., Hashenka, T.A., & Kandratsenak, Yu.G. (2017). Molecular-genetic passportization of national apple collection in Belarus. *Works of the State Nikita Botanical Gardens*, 144(1), 134-138. Retrieved from http://scbook.nbgncsipro.com/download/144-1/30_144_1-2017.pdf (In Russian, English abstract)
6. Lebedev, V.G., (2015). Russian Federation Patent № 2015105268. *A method for identifying raspberry varieties based on RAPD markers*. Moscow: Federal Institute of Industrial Property. (In Russian).
7. Lebedev, V.G., Kagan, D.I., & Vidyagina, E.O. (2017). Russian Federation Patent № 2017112958. *Method of genetic certification of raspberry selection achievements based on RAPD markers*. Moscow: Federal Institute of Industrial Property. (In Russian).
8. Lebedev, V.G., Subbotina, N.M., Kirkach, V.V., Vidjagina, E.O., Pozdnyakov, I.A., & Shestibratov, K.A. (2018). Analysis of microsatellite loci as first stage of marker-assisted selection of raspberry and strawberry. *Breeding and variety cultivation of fruit and berry crops* 5(1), 65-68. Retrieved from https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/vniispk-storage/ckeditor_assets/attachments/330/SSSK_2018_T.5_№1.pdf (In Russian, English abstract).
9. Pikunova, A.V., Knyazev, S.D., Sedov, E.N., & Bogomolova, N.I. (2013). Genotyping of the microsatellite loci of apple, raspberry and black currant from the VNIISPK collection. In *Biotechnology in crop, livestock and veterinary science: Proc. Sci. Conf.* (pp. 44-46). Moscow: VNIISB. (In Russian)
10. Tagimanova, D.S., Alzhanova, A., Khapilina, O.N., & Kalendar, R.N. (2014). Use IRAP and iPBS molecular markers for genetic analysis of wheat varieties. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology* (4), 30-34. <https://doi.org/10.11134/btp.4.2014.4> (In Russian, English abstract).
11. Ushakova, Y.V. (2015). *Use of DNA-marking technologies in selection and genetic studies of Apple trees (Bio. Sci. Cand. Thesis)*. SKZNIISiV, Krasnodar, Russia. Retrieved from <https://kubsau.ru/upload/iblock/987/987563bc87fde8e7fdb163129ba1d1d0.pdf> (In Russian).

12. Bushakra, J.M., Krieger, C., Deng, D., Stephens, M.J., Allan, A.C., Storey, R., Symonds, V.V., Stevenson, D., McGhie, T., Chagné, D., Buck, E.J., & Gardiner, S.E. (2013). QTL involved in the modification of cyanidin compounds in black and red raspberry fruit. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(3), 847–865. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-2022-4>
13. Doyle, J.J., & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13-15.
14. Swanson, J.D., Carlson, J.E., & Fernandez-Fernandez, F. (2011). Raspberries and blackberries. In Folta, K., & Kole, C. (Eds.), *Genetics, Genomics and Breeding of Berries* (pp. 64-105). Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b10922>
15. Graham, J., Smith, K., MacKenzie, K., Jorgenson, L., Hackett, C., & Powell, W. (2004). The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 740–749. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1687-8>
16. Ward, J. A., Bhangoo, J., Fernández-Fernández, F., Moore, P., Swanson, J. D., Viola, R., Velasco, R., Bassil, N., Weber, C.A., & Sargent, D. J. (2013). Saturated linkage map construction in *Rubus idaeus* using genotyping by sequencing and genome-independent imputation. *BMC genomics*, 14(2). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-2>.