

УДК 663.252.41:575.22

UDC 663.252.41:575.22

03.00.00 Биологические науки

Biology

АПРОБАЦИЯ МЕТОДА SSR-АНАЛИЗА ДЛЯ ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИИ КОММЕРЧЕСКИХ ШТАММОВ ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ*

APPROBATION OF SSR-ANALYSIS FOR DNA-IDENTIFICATION OF COMMERCIAL WINE YEAST STRAINS

Супрун Иван Иванович
к.б.н., зав. лабораторией
SPIN-код (РИНЦ):7124-5304
supruni@mail.ru

Suprun Ivan Ivanovich
Cand. Biol. Sci., head of the laboratory
SPIN: 7124-5304
supruni@mail.ru

Токмаков Сергей Вячеславович
к.б.н., научный сотрудник
SPIN-код (РИНЦ):3196-9049

Tokmakov Sergei Vyacheslavovich
Cand. Biol. Sci., staff scientist
SPIN:3196-9049

Агеева Наталья Михайловна
д.т.н., профессор, главный научный сотрудник
SPIN-код (РИНЦ):3807-3865

Ageeva Natalia Mikhailovna
Doctor of technical sciences, main scientific worker,
professor, SPIN:3807-3865

Насонов Андрей Иванович
к.б.н., старший научный сотрудник
SPIN-код (РИНЦ): 5636-6106
Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, Россия, г. Краснодар, ул. 40 лет Победы, 39

Nasonov Andrey Ivanovich
Candidate of agricultural sciences, senior scientific worker
SPIN: 5636-6106
North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture, Russia, Krasnodar, 40 let Pobedy street, 39

В ходе исследований была выполнена апробация метода ДНК-анализа для генотипирования некоторых коммерческих штаммов винных дрожжей с использованием микросателлитных последовательностей генома. В работе были апробированы 5 полиморфных SSR-маркеров на выборке из 15 дрожжевых препаратов. Апробированные SSR-маркеры показали высокий уровень информативности и могут быть использованы для анализа генетического разнообразия винных дрожжей

The study was performed to genotype some commercial wine yeast strains with SSR-markers. Five polymorphic SSR-markers were tested in a selection of 15 yeast strains. Tested SSR-markers showed a high level of informativeness as well as polymorphism and can be used further to analyze the genetic diversity of wine yeast

Ключевые слова: ВИННЫЕ ДРОЖЖИ, ШТАММЫ, ДНК-МАРКИРОВАНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ, МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ ДНК-МАРКЕРЫ

Keywords: WINE YEAST, STRAINS, DNA-MARKERS, IDENTIFICATION, SSR-MARKERS

DOI: 10.21515/1990-4665-125-009

Введение

Современный этап развития винодельческой отрасли предполагает использование зачастую широкого перечня штаммов дрожжей, обладающих отличающимися физиолого-биохимическими

*Работа выполнена при поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (проект № 16-48-230347 p_a)

характеристиками – спирто-, сульфито-, холодо- и термоустойчивостью, а также позволяющих получать высококачественные виноматериалы с заданными характеристиками. В связи с этим, в настоящее время, актуальным является направление исследований, связанное с селекцией новых штаммов, обладающих комплексом необходимых характеристик. При этом возможно создание как генетически новых уникальных штаммов, за счет проведения процесса половой гибридизации штаммов и последующего отбора лучших образцов на основе оценки их технологических свойств, так и поиск штаммов в естественных условиях (в ампелоценозах) и отбор лучших по результатам комплексной оценки выполняемой исходя из требований виноделия.

В связи с этим особую важность приобретает вопрос оценки генетической идентичности используемых штаммов и изучения их генетического разнообразия. Данные вопросы обладают высоким уровнем значимости не только при идентификации существующих коммерческих штаммов *S. cerevisiae*, но также и при проведении поиска новых штаммов винных дрожжей в естественных условиях.

В настоящее время наибольшую распространенность получили методы идентификации биологических образцов (видов, штаммов микроорганизмов, сортов, гибридов и т.д.), основанные на анализе структуры ДНК. Методы молекулярно-генетического маркирования на уровне ДНК (ДНК-маркирование), позволяют с высоким уровнем достоверности идентифицировать генотипы. Их использование дает возможность идентифицировать генетическую чистоту дрожжевой культуры, проводить ДНК-паспортизацию штаммов, а также оценивать уровень генетического разнообразия природных популяций.

К наиболее перспективным методам следует отнести метод на основе анализа микросателлитных локусов (SSR). SSR-маркеры – простые повторяющиеся последовательности – широко используются в

генотипировании и при конструировании генетических карт. Их широкое применение обусловлено равномерным распределением по геному, высоким полиморфизмом, кодоминантным характером наследования и воспроизводимостью результатов анализа. Эти характеристики сделали SSR-маркеры одними из наиболее часто используемых молекулярных ДНК-маркеров при анализе генетического разнообразия, картировании генов, популяционного анализа, выяснении филогенетических взаимосвязей на уровне вид/подвид/род и идентификации генотипов.

Благодаря широкому перечню исследований, посвященных разработке SSR-маркеров для вида *Saccharomyse cerevisiae* [1-6] была создана методическая основа для выполнения исследований, направленных на идентификацию штаммов и изучения генетических взаимосвязей между штаммами, имеющими различное географическое происхождение. Водной из таких работ [М.А. Perez et al, 2001], в которой был выполнен поиск SSR-последовательностей в геноме *S. cerevisiae* и разработка праймерных пар, фланкирующих шесть микросателлитных локусов, созданные SSR-маркеры (ScAAT1, ScAAT2, ScAAT3, ScAAT4, ScAAT5 и ScAAT6) использовали для идентификации штаммов. В результате работы авторам удалось получить штамм-специфичные ДНК-профили для 44 штаммов из 51 использованного [6].

Наличие информативных SSR-маркеров обусловило возможность дальнейшего развития данного направления исследования. На сегодняшний день известен целый ряд завершенных научных исследований, направленных на изучение генетического разнообразия и идентификацию штаммов винных дрожжей.

Одна из работ, в которой задействовали наибольшее количество SSR-маркеров – 41, позволила существенно дополнить информацию об уровне полиморфизма имевшихся SSR-маркеров винных дрожжей. На первом этапе для всех задействованных маркеров провели первичную оценку

уровня полиморфизма с использованием 10 штаммов *S. cerevisiae*. При этом данная выборка штаммов была максимально разнородной – включала образцы, происходящие из разных регионов мира. На основе первичной оценки полиморфизма отобрали 21 SSR-маркер с наибольшим уровнем полиморфизма. На следующем этапе, по результатам оценки 47 штаммов дополнительно отобрали 6 наиболее полиморфных и с их использованием провели оценку генетических дистанций для 67 штаммов. При этом уникальные ДНК-профили были получены для 58 штаммов из 67 использованных [7]. Важной информацией, полученной в данном исследовании, являются экспериментальные данные об уровне аллельного полиморфизма SSR-локусов, а также данные о диапазонах размеров амплифицированных фрагментов по каждому из маркеров [7]. В другом исследовании, на основе анализа полиморфизма 10 SSR-маркеров и MAT локуса, выполнили генотипирование 246 штаммов, для каждого из которых был получен ДНК-паспорт. ДНК-паспорта штаммов вошли в предложенную авторами генетическую базу данных [8]. Существует целый ряд примеров популяционно-генетических исследований винных дрожжей, выполненных с использованием микросателлитных ДНК-маркеров. Так, в одной из наиболее масштабных работ, была изучена внутри- и межпопуляционная генетическая структура популяций винных дрожжей в двух винодельческих регионах Португалии. В 16 точках было отобрано 2820 моноизолятов, которые на основе молекулярно-генетических данных определили в 321 штамм. В данном исследовании, использование 10 микросателлитных ДНК-маркеров позволило получить достоверную информацию о генетической взаимосвязи изученных популяций, а также о внутривидовой структуре [9].

В СКЗНИИСиВ начаты исследования, направленные на изучение генетического разнообразия винных дрожжей. Одним из главных типов ДНК-маркеров, которые используются в работе, являются

микросателлитные. В связи с этим целью данной работы являлась апробация ряда SSR-маркеров для *S. cerevisiae* и *S. bayanus* и выполнение ДНК-паспортизации штаммов винных дрожжей, входящих в состав коммерческих дрожжевых препаратов, используемых в виноделии.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования послужили активные сухие дрожжи–15 коммерческих препаративных форм штаммов винных дрожжей, используемые в виноделии (табл. 1).

Таблица 1 – Использованные в работе препараты винных дрожжей

Коммерческое наименование дрожжей	Страна - производитель	Назначение
Oenoferm Klosterneuburg	Германия	чистое брожение суслу и мезги
Oenoferm Rouge	Германия	производство красных столовых вин
Fantastici	Франция	производство игристых вин бутылочным и акратофорным способом
Oenoferm Douguet	Германия	производство белых вин с остановкой брожения
SP 49	Швеция	производство спирта
IOC 1102	Франция	винификация белых, розовых и легких красных вин
Zimaflöre X5	Франция	для получения чистых и ароматичных белых вин, хорошей интенсивностью аромата
Vinomax	Франция	термоустойчивые, холодное брожение, брожение при температуре 25-30°C
Primavera	Италия	производство шампанских и столовых виноматериалов, холодное брожение, спиртоустойчивые
Oenoferm	Германия	универсальные, брожение суслу и мезги
Viniferm blanc	Бельгия	для столовых вин с сохранением сортового аромата
France Reims Champagne	Франция	для игристых вин с ярким ароматом
France Champagne Premium	Франция	для классического шампанского (вторичное брожение в бутылках)
France Perlage	Франция	для игристых вин по акратофорной технологии
Prosecco Egance	Италия	производство игристых вин

Все образцы были представлены высушенным препаратом культуры.

Для экстракции ДНК использовали апробированный ранее упрощенный метод с общей продолжительностью экстракции около 1,5-2 часов [10]. Использовали экстрагирующий буфер следующего состава: 200 mM TrisHCL (pH 8,5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS. Для

экстракции 30-40 мг пробы лиофильно высушенных дрожжей гомогенизировали в 300 мкл экстрагирующего буфера и инкубировали в течение 10 минут при 65° С. Этап инкубации был введен нами в протокол экстракции, т. к. в оригинальной методике инкубация при 65° С отсутствует. Далее экстракцию проводили по методике, описанной Zhang [11].

Для апробации были отобраны 5 микросателлитных маркеров с различной степенью полиморфности – С6, С11, YPL009с, ScYOR267с и ScAAT4. Прямой праймер в каждой праймерной паре был мечен соответствующим флуоресцентным красителем (ROX – красный, R6G – зеленый, FAM – синий и TAMRA – желтый) – см. Табл. 2.

ПЦР проводили на амплификаторе BioRad T100 в объеме 25 мкл; в состав ПЦР-смеси входили: 1х ПЦР буфер (СибЭнзим), 0,05 mM dNTP, 0,32 mM каждого праймера, 1,5 ед. Taq ДНК полимеразы (СибЭнзим), 40 нг ДНК и деионизированной воды до общего объема реакционной смеси 25 мкл.

Условия ПЦР следующие: денатурация при 95° С 2 мин, затем 35 циклов – 10 с при 95° С, 58° С – 30 с, 72° С – 30 с; финальная элонгация при 72° С – 10 мин.

Проверку качества выделенной ДНК и наличия ПЦР-продуктов проводили разделением в агарозном 1,5% геле в 0,5X ТБЕ буфере при напряжении 150 V в течении 30 минут. После окрашивания гелевых пластин в бромистом этидии, продукты ПЦР визуализировали в ультрафиолетовом свете.

Фрагментный анализ проводили на генетическом анализаторе AB3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, FosterCity, California) при напряжении электрофореза 15 кВ длительностью 600 секунд.

Перед проведением фрагментного анализа, 1 мкл ПРЦ-продукта растворяли в 20-60 мкл деионизированной воды, затем 1 мкл разведенного

ПРЦ-продукта переносили в приготовленный непосредственно перед использованием буфер нанесения следующего состава – 8,85 мкл Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, Foster City, California) и 0,15 мкл размерного стандарта (S450, COrDIS, Syntol). Разведенный ПРЦ-продукт в буфере нанесения подвергали денатурации в течении 5 минут при 95° С, после охлаждения на льду, образец помещали в плашку генетического анализатора.

Полученные данные визуализировались в программе GeneMapper v4.1. (Applied Biosystems, Foster City, California). Кластерный анализ выполнен методом UPGMA с использованием пакета программ PAST.

Результаты исследований

Результаты фрагментного анализа с SSR-маркерами C11, C6 и ScTAA4 представлены в рабочих окнах программы GeneMapper v 4.1. (рис. 1-3).

Как видно из рисунков, амплификация с данными маркерами прошла успешно; все локусы имеют четко визуализируемые пики на электрофореграмме.

Дальнейший анализ полученных данных показал, что использованные в работе SSR-маркеры проявили различный уровень полиморфизма – от 3 до 10 аллелей на локус (Табл. 2).

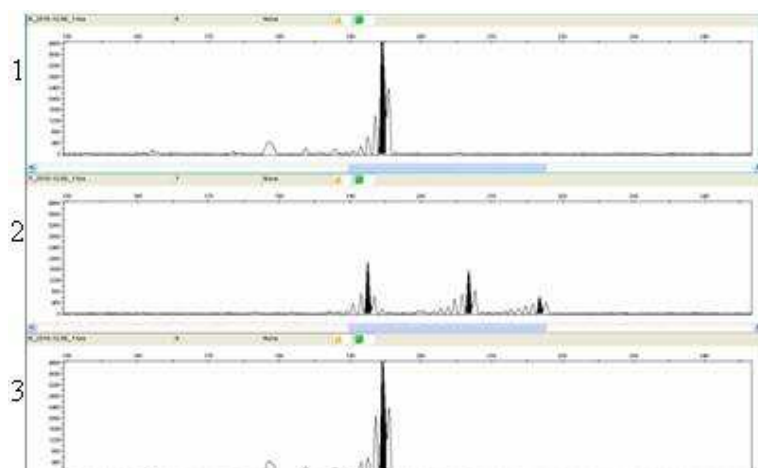


Рисунок 1 – Аллельные профили SSR-локуса C11 образцов Oenoferm Douguet (1), SP 49(2) и IOC 1102 (3)

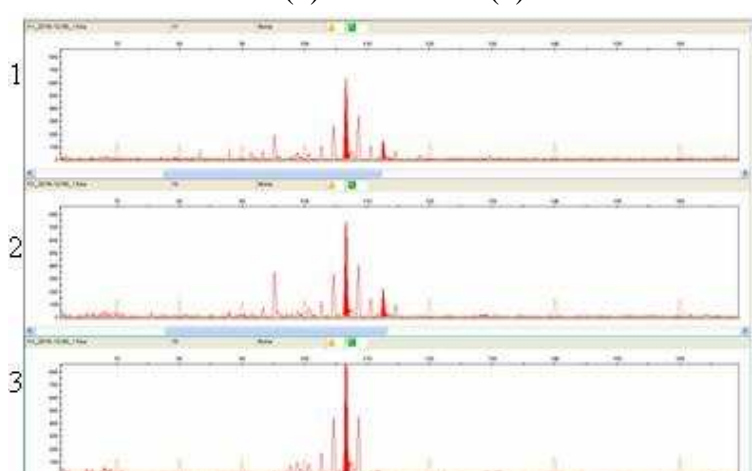


Рисунок 2 – Аллельные профили SSR-локуса C6 образцов Primavera (1), Oenoferm Rouge (2) и Viniferm blanc (3)

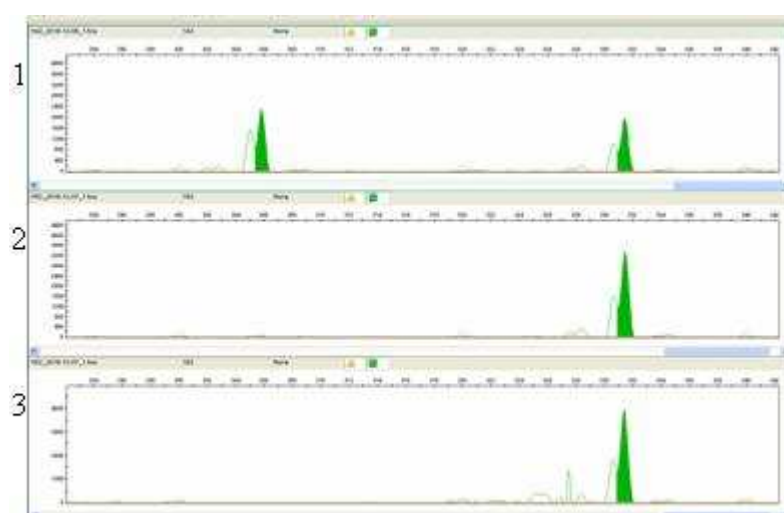


Рисунок 3 – Аллельные профили SSR-локуса ScAAT4 образцов France Reims Champagne, France Champagne Premium и France Perlage

Как видно из рисунков, амплификация с данными маркерами прошла успешно; все локусы имеют четко визуализируемые пики на электрофореграмме.

Дальнейший анализ полученных данных показал, что SSR-маркеры, использованные в работе, проявили различный уровень полиморфизма – от 3 до 10 аллелей на локус (Табл. 2).

Таблица 2 – Характеристики пяти апробированных SSR-локусов

Локус	C6	C11	YPL009c	ScYOR267c	ScAAT4
Флуоресцентная метка	ROX	TAMRA	R6G	FAM	R6G
Диапазон размера амплифицируемого продукта	95-113	186-240	257-324	280-348	272-331
Количество аллелей	3	8	10	7	4
Аллели	95/107/113	186/192/195/ /207/215/217/ /221/240	257/269/278/ /281/290/302/ /305/308/311/ /324	280/292/307/ /313/327/345/ /348	272/294/306/ /331

По маркеру C6 было выявлено всего 3 аллеля, самым распространенным аллелем явился аллель весом 107 п.о. (пар оснований) – выявлен у 12 из 15 изученных образцов. Аллель размером 95 п.о. был выявлен у двух штаммов дрожжей, 113 п.о. – у шести. Высоко полиморфными оказались маркеры C11, ScYOR267c, выявившие 8 и 7 аллелей на локус, соответственно, а маркер YPL009c оказался самым полиморфным – 10 аллелей на локус. По маркеру C11 самым распространенным аллелем явился аллель весом 217 п.о., выявленный у 9 изученных штаммов, а аллели 207п.о., 215п.о. и 221 п.о. – встречались в единичном экземпляре. По маркеру YPL009c был выявлен один уникальный аллель – 324п.о., а аллель размером 278 п.о. оказался самым распространенным – был выявлен у 6 образцов винных дрожжей. Маркер ScYOR267c выявил три редких аллеля – размерами 307, 327 и 348 п.о.

Маркер ScAAT4 не выявил редких аллелей, а самым распространенным оказался аллель размером 331 п.о.

В таблице 3 приведены ДНК-паспорта 15 изученных образцов винных дрожжей по пяти SSR-локусам. Из таблицы видно, что у образцов SP 49, Prima Vera и Oenoferm Rouge2 идентифицируется больше чем два аллеля по маркерам C11 и YPL009c. Это может быть связано с тем, что данные дрожжевые препараты представляют собой смесь штаммов.

Таблица 3– SSR-профили 15 изученных коммерческих штаммов винных дрожжей

Образец \ Лocus	C6	C11	YPL009c	ScYOR267c	ScAAT4
OK 2	95*	186	269	345	272 294
Oenoferm Rouge	107	217 240	305 324	345	331
I FANTASTICI	107 113	192 217	278 290	313	306
Oenoferm Douguet	107	195	257 281	280	331
SP 49	107 113	192 207 217	278 290 308	307 312	306 331
IOC 1102	107	195	257 281	280	331
Zimaflore X5	107	217	278 305	280 313	331
Vinomax Yeast	95	186	269	345	272 294
Prima Vera	107 113	192 217 240	278 290 302 311	313 345	306 331
Oenoferm Rouge2	107 113	192 217 240	278 290 302 311	313 345	306 331
Viniferm blanc	107	217 240	302 311	345	331
France Reims Champagne	107	195 217	302	292 348	306 331
France Champagne Premium	107	215 217	302 305	292	331
France Perlage	113	221	308	327	331
Prosecco Elegance	107 113	192 195	278 290	313	306

* - размер аллелей приведен в парах оснований (п.о.)

На основе полученных данных, был проведен кластерный анализ методом UPGMA. Результаты кластеризации представлены на рисунке 4.

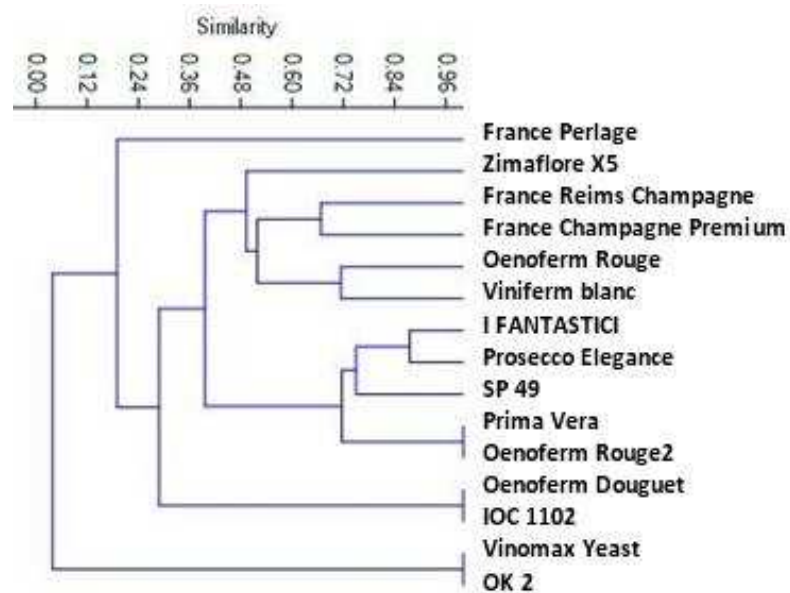


Рисунок 4 – UPGMA дендрограмма, характеризующая степень генетического сходства изученных образцов

Как видно из рисунка 4 и таблицы 3, девять образцов изученных коммерческих препаратов винных дрожжей имели уникальный аллельный набор по изученным локусам, но четкого разделения на кластеры на дендрограмме не наблюдается. Это может быть объяснено гетерогенностью изученных препаратов дрожжей, и данная возможно проблема будет решена увеличением выборки, как и изучаемых штаммов винных дрожжей, так и увеличением количества вовлеченных в анализ микросателлитных маркеров.

Три пары образцов – Prima Vera/OenofermRouge2, Oenoferm Douguet/IOC 1102 и Vinomax Yeast/OK 2 – основываясь на данных о полиморфизме пяти изученных локусов, оказались идентичными. Это может быть объяснено недостаточным количеством использованных маркеров и, возможно, высоким уровнем генетической близости данных штаммов. Дальнейшее увеличение выборки используемых маркеров позволит сделать окончательный вывод степени сходства или различия данных штаммов дрожжей.

В целом, для всех апробированных маркеров были получены легко интерпретируемые, достоверные результаты генотипирования, уровень полиморфизма, несмотря на небольшое количество маркеров, позволил получить ДНК-фингерпринты, уникальные для большей части изученных штаммов. Данные маркеры могут быть успешно применены для идентификации, генотипирования и филогенетических исследований винных дрожжей. Дальнейшее расширение выборки коммерческих препаратов винных дрожжей, наряду с вовлечением в работу новых SSR-локусов позволит сделать достоверный вывод о генетической близости изучаемых штаммов.

Литература

1. Gallego, F.J. Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae* strains / F. J. Gallego, M. A. Perez, I. Martinez [et al.] // *American Journal of Enology and Viticulture*. – 1998. - 49, 350-351.
2. Richard, G.F. Distribution and variability of trinucleotide repeats in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / G. F. Richard, B. Dujon // *Gene*. – 1996. - 174, 165-174.
3. Richard, G.F. Trinucleotide repeats and other microsatellites in yeasts / G. F. Richard, C. Hennequin, A. Thierry [et al.] // *Research in Microbiology*. – 1999. - 150, 589-602.
4. Field, D. Abundant microsatellite polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of a selective forces / D. Field, C. Wills // *Proceeding of the National Academy of Sciences U.S.A.* – 1998. - 95, 1647-1652.
5. Techera, A.G. Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers / A. G. Techera, S. Jubany, F. M. Carrau [et al.] // *Letters in Applied Microbiology*. – 2001. - 33, 71–75.
6. Perez, M. A. Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers / M. A. Perez, F. J. Gallego, I. Martinez [et al.] // *Letters in Applied Microbiology*. – 2001. - 33, 461-466.
7. Legras, J.-L. Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains / J.-L. Legras, O. Ruh, D. Merdinoglu [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2005. - 102, 73– 83.
8. Keith, D. A database of microsatellite genotypes for *Saccharomyces cerevisiae*/ D. Keith, M. R. Richards, G. Richard [et al.] // *Antonie van Leeuwenhoek*. - 2009. – 96, 355–359.
9. Schuller, D. Genetic Diversity and Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Different Grape Varieties and Winemaking Regions / D. Schuller, F. Cardoso, S. Sousa [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. - 7(2): e32507. doi:10.1371/journal.pone.0032507
10. Супрун, И. И. Апробация метода генотипирования штаммов винных дрожжей рода *Saccharomyces* на основе анализа геномных участков Inter-Delta / И. И.

Супрун, С. В. Токмаков, Н. М. Агеева [et al.] // Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. - Краснодар: КубГАУ, 2015. - №112(08). - Шифр Информрегистра: 1121508036. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2015/08/pdf/36.pdf>

11. Zhang, L. Genetic diversity and temporal dynamics of *Venturia inaequalis* populations following two apple scab epidemics in Pennsylvania: in *Plant Pathology*. – 2010. – p. 24-33.

References

1. Gallego, F.J. Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae* strains / F. J. Gallego, M. A. Perez, I. Martinez [et al.] // *American Journal of Enology and Viticulture*. – 1998. - 49, 350-351.

2. Richard, G.F. Distribution and variability of trinucleotide repeats in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / G. F. Richard, B. Dujon // *Gene*. – 1996. - 174, 165-174.

3. Richard, G.F. Trinucleotide repeats and other microsatellites in yeasts / G. F. Richard, C. Hennequin, A. Thierry [et al.] // *Research in Microbiology*. – 1999. - 150, 589-602.

4. Field, D. Abundant microsatellite polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces / D. Field, C. Wills // *Proceeding of the National Academy of Sciences U.S.A.* – 1998. - 95, 1647-1652.

5. Techera, A.G. Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers / A. G. Techera, S. Jubany, F. M. Carrau [et al.] // *Letters in Applied Microbiology*. – 2001. - 33, 71–75.

6. Perez, M. A. Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers / M. A. Perez, F. J. Gallego, I. Martinez [et al.] // *Letters in Applied Microbiology*. – 2001. - 33, 461-466.

7. Legras, J.-L. Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains / J.-L. Legras, O. Ruh, D. Merdinoglu [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2005. - 102, 73–83.

8. Keith, D. A database of microsatellite genotypes for *Saccharomyces cerevisiae* / D. Keith, M. R. Richards, G. Richard [et al.] // *Antonie van Leeuwenhoek*. - 2009. – 96, 355–359.

9. Schuller, D. Genetic Diversity and Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Different Grape Varieties and Winemaking Regions / D. Schuller, F. Cardoso, S. Sousa [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. - 7(2): e32507. doi:10.1371/journal.pone.0032507

10. Супрун, И. И. Аprobatsiya metoda genotipirovaniya shtammov vinnykh drozhzhey roda *Saccharomyces* na osnove analiza genomnykh uchastkov Inter-Delta / I. I. Suprun, S. V. Tokmakov, N. M. Ageeva [et al.] // *Nauchnyy zhurnal KubGAU [Elektronnyy resurs]*. - Краснодар: KubGAU, 2015. - №112(08). - Shifr Informregistra: 1121508036. – Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2015/08/pdf/36.pdf>

11. Zhang, L. Genetic diversity and temporal dynamics of *Venturia inaequalis* populations following two apple scab epidemics in Pennsylvania: in *Plant Pathology*. – 2010. – p. 24-33.