

**LOKALIZACJA GENÓW WPŁYWAJĄCYCH NA JAKOŚĆ  
JABŁEK NA MAPIE REFERENCYJNEJ GENOMU JABŁONI  
(*Malus domestica* Borkh.)**

**Localization of genes affecting fruit quality on the genome reference  
map of apple (*Malus domestica* Borkh.)**

Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Małgorzata Korbin  
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach  
ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice  
e-mail: sylwia.keller@insad.pl

ABSTRACT

Six EST fragments of genes responsible for sugar metabolism and plant response to stress were isolated and identified in a comparative analysis with the NCBI database. By studying the polymorphism of the isolated ESTs that was observed after CAPS and SSCP reactions it was possible to generate molecular markers for the analysed genes. Moreover, an analysis of the segregation of the markers in a population set of 48 individuals derived from the 'Fiesta' x 'Discovery' cross, and an estimation of the recombination frequency between the generated markers and the published ones made it possible to localize the genes of interest on the 'Fiesta' x 'Discovery' reference map.

**Key words:** *Malus domestica* Borkh., molecular markers, CAPS, SSCP, candidate genes, genetic map

WSTĘP

Głównym celem hodowli twórczej jest uzyskanie nowych odmian o cechach fenotypowych, pożądaných zarówno przez producenta, jak i konsumenta (Watada i Abbot 1985; Kellerhals i in. 2004; Abbot i Kole

2008). W przypadku roślin drzewiastych stosunkowo długi okres juvenilny powoduje, że wyprowadzenie genotypów o pożądanym cechach może trwać nawet 20-25 lat (Kellerhals i Mayer 1994). Wykorzystanie w procesie hodowlanym technik molekularnych ułatwia wybór najlepszych materiałów wyjściowych do krzyżowań, jak również przyspiesza selekcję osobników o najkorzystniejszej kombinacji genów, kodujących badane cechy (Reiter i in. 1992; Cipriani i in. 1999; King i in. 2000; Quiros i Li 2001; Yamamoto i in. 2002; Liebhard i in. 2003). Jedną z metod przyspieszania procesu hodowlanego jest generowanie markerów, sprzężonych z pożądaną cechą, na podstawie analizy polimorfizmu genomowego DNA. Wykrywanie fragmentów polimorficznych w populacji segregującej (Mohan i in. 1997; Silfverberg-Dilworth i in. 2006) i ocena rozkładu ich dziedziczenia w takiej populacji, umożliwia ustalenie odległości mapowych pomiędzy badanymi regionami genomu i zlokalizowanie badanych genów/markerów na mapie genetycznej rośliny (Lander i Botstein 1989).

Badania nad umiejscowieniem na mapie genów odpowiedzialnych za jakość jabłek oraz złożoność ich współdziałania, wiążąca się z losowym rozmieszczeniem w obrębie często odległych regionów genomu, były tematem badań w wielu ośrodkach naukowych (Harada i in. 2000; King i in. 2000; Tartarini 2003; Costa i in. 2005; 2008). Dzięki studiom nad molekularnymi mechanizmami dziedziczenia niektórych spośród tych cech (Ritter i in. 1990; Ullah 2004) udało się znacznie zagęścić dotychczas opisane mapy referencyjne genomu *Malus domestica* (Hemmat i in. 1994; Maliepaard i in. 1998; Liebhard i in. 2002).

Badania nad zagęszczaniem mapy genomu jabłoni podjęto w Pracowni Niekonwencjonalnych Metod Hodowli Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa w ramach projektu HiDRAS (5 Program Ramowy EU) w 2005 roku. W niniejszej publikacji przedstawiono wyniki prac nad zlokalizowaniem na mapie genetycznej *M. domestica* sześciu fragmentów EST (Express Sequence Tags – znaczników sekwencji kodujących), zidentyfikowanych jako geny wpływające na metabolizm cukrów w owocach i reakcję rośliny na stres.

## MATERIAŁ I METODY

**Materiał badawczy.** Badania prowadzono na DNA wyizolowanym z roślin odmian Fiesta i Discovery oraz z 48 roślin potomnych z populacji segregującej ‘Fiesta’ x ‘Discovery’. Owoce odmian Fiesta i Discovery różnią się terminem dojrzewania, zawartością cukrów, jędrnością i kwasowością. Wysoki stopień kwasowości, niska zawartość cukrów oraz niezadowalająca jędrność owoców ‘Discovery’ wpłynęła między innymi na negatywną ocenę konsumentów (Liebhard i in. 2002; Kellerhals i in. 2004), co należy wziąć pod uwagę przy opracowywaniu programów hodowlanych z udziałem tej odmiany.

Fragmety EST wybrano na podstawie analizy mikromacierzy dla matryc uzyskanych z owoców obu odmian, we współpracy z Uniwersytetem w Mediolanie.

**PCR.** Fragmenty EST były izolowane i namnażane w mieszaninie reakcyjnej (13  $\mu$ l), zawierającej 3 ng matrycy DNA; 1x PCR buforu; 3,75 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 U Platinum Taq Polimerazy (Invitrogen); 2,5 mM dNTP (Applied Biosystem); 5 mM każdego ze starterów. Startery specyficzne dla fragmentów EST (tab. 1) zaprojektowano w Pracowni Niekonwencjonalnych Metod Hodowli przy użyciu programu komputerowego DNASTar–Lasergene 7.0. Reakcje prowadzono w termocyklerze PTC-200, MJ Research, przy następującym profilu termicznym – 120 s w temperaturze 96°C (wstępna denaturacja DNA), 30 s w temperaturze 96°C, 60 s w temperaturze 60 lub 65°C i 30 s w temperaturze 72°C (30 cykliów).

Produkty PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym w obecności markera wielkości molekularnej 1Kb (DNA faga  $\lambda$  / *Hind* III/ *EcoR* V, Fermentas).

**Ocena polimorfizmu.** Polimorfizm DNA identyfikowano po enzymatycznym trawieniu produktów PCR (technika CAPS, Cleaved Amplified Polymorphism Sequence) i ich analizie w żelu sekwencyjnym (technika SSCP, Single Strand Conformational Polymorphism). W reakcjach CAPS produkty PCR trawiono enzymem *Hae* III (0,1U) (Fermentas) w temperaturze 37°C. Polimorfizm konformacyjny SSCP

analizowano po rozdzieleniu produktów PCR w 7% żelu poliakrylamidowym (z dodatkiem 10% glicerolu) wybarwianym azotanem srebra.

Odległości mapowe pomiędzy badanymi markerami genetycznymi oszacowano za pomocą programu komputerowego JoinMap 3.0. W celu oceny przynależności badanych markerów do tej samej grupy sprzężeń wykorzystano wartości algorytmu LOD powyżej 3 (logarytm wartości osobniczych – ang. logarithm odd ratio). Pozycję poszczególnych *locus* ustalono za pomocą analizy interwałowej oraz maksymalnego prawdopodobieństwa uzyskania sprzężeń (maximum likelihood based interval mapping). Kolejność wybranych markerów genetycznych w obrębie badanych grup sprzężeń oraz dystans genetyczny w centimorganach obliczono przy użyciu mapującej funkcji *Kosambi*. Porównanie segregacji rzeczywistych względem oczekiwanych przeprowadzono na podstawie testu CHI-kwadrat, uwzględniając statystyczny błąd analizy na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ . Obraz mapy genetycznej badanych odmian wygenerowano za pomocą programu komputerowego MapChart 2.1 (Ooijen i Voorrips 2001).

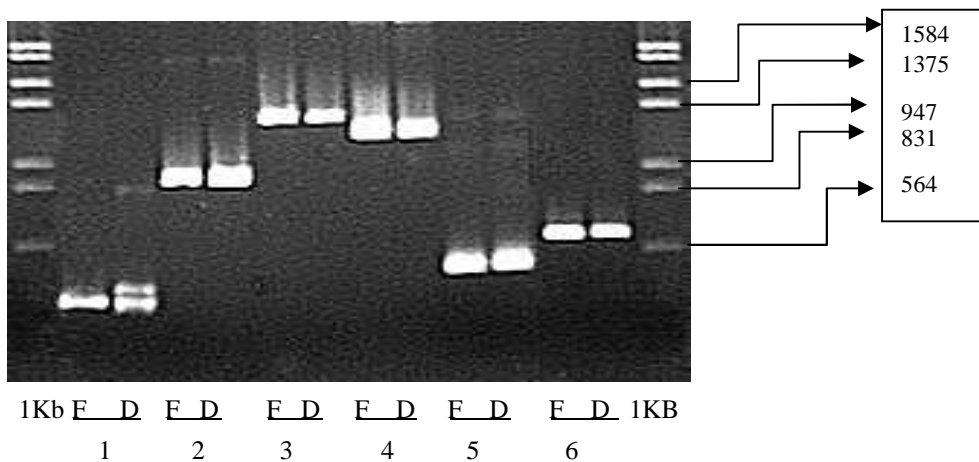
## WYNIKI I DYSKUSJA

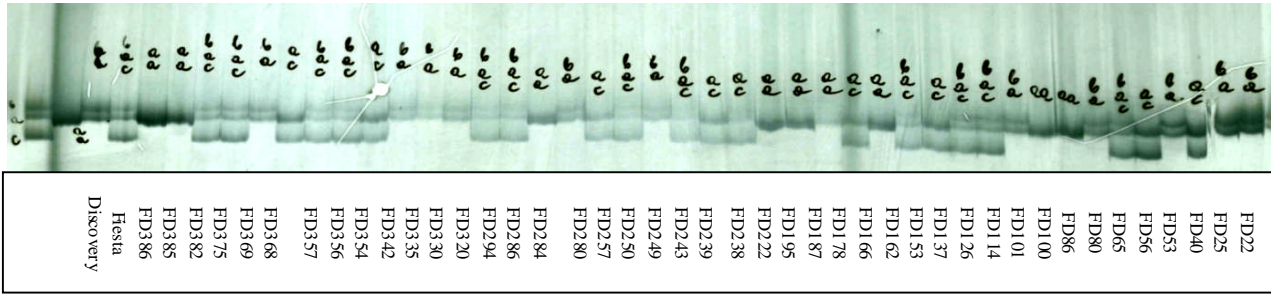
W reakcji z sześcioma parami starterów, zaprojektowanymi w Pracowni Niekonwencjonalnych Metod Hodowli ISK, otrzymano produkty o długości: 1250 pz (startery: MALDO2/R-F) 1100 pz (MALDO3/R-F), 600 pz (AAZA/R-F), 850 pz (GluSTra/R-F), 200 pz (Def R-F) oraz 280 pz (Perox R-F) (rys. 1).

Na podstawie analizy porównawczej sekwencji wyżej wymienionych produktów z sekwencjami zawartymi w bazie NCBI GenBanku, potwierdzono homologię sekwencji wyizolowanych fragmentów DNA do regionów EST genów: defensyny (Nr dostępu: DT040248), MT2 MALDO (Nr dostępu: DR998097), ATM2 MALDO (Nr dostępu: DR995640), peptydazy AAZA M9 (Nr dostępu: CN897107), peroksydazy (Nr dostępu: DT040361) oraz S-transferazy glutationu (Nr dostępu: CN580380). W reakcji z czterema parami starterów uzyskano produkty o długościach odpowiadających

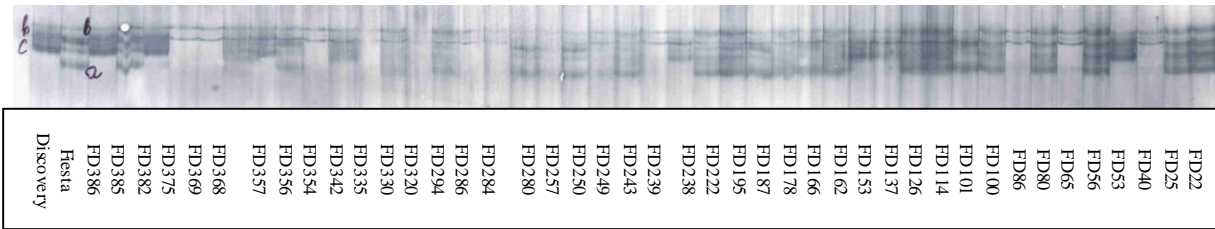
długościom fragmentów opisanych z GenBanku, podczas gdy startery Def R-F i Perox R-F generowały fragmenty krótsze niż opisane w NCBI (tab. 1).

Porównanie wzorów prążkowych, uzyskanych po trawieniu fragmentów EST genu MT2 MALDO, peptydazy AAZA M9 i S-transferazy glutationu, wyizolowanych w reakcjach na matrycach DNA z 48 pojedynków 'Fiesta' x 'Discovery', umożliwiło zidentyfikowanie 3 markerów typu CAPS (tab. 1, rys. 3). We fragmentach EST odpowiadających genom defensyny, peroksydazy i ATM2MALDO nie stwierdzono występowania polimorfizmu CAPS. Jednocześnie porównanie wzorów prążkowych uzyskanych po rozdiale elektroforetycznym EST, wyizolowanych z matryc pochodzących z 48 roślin potomnych 'Fiesta' x 'Discovery', pozwoliło na zidentyfikowanie 3 kolejnych fragmentów polimorficznych (markerów SSCP) dla genów defensyny (rys. 2), peroksydazy i ATM2 MALDO.





Rysunek 2. Segregacja SSCP genu defensyny w populacji segregującej 48 osobników z rodziny ‘Fiesta’ x ‘Discovery’ (oznaczone jako FD i numerami roboczymi) – Segregation of SSCP of defensin gene in segregating population of 48 individuals derived from ‘Fiesta’ x ‘Discovery’ cross

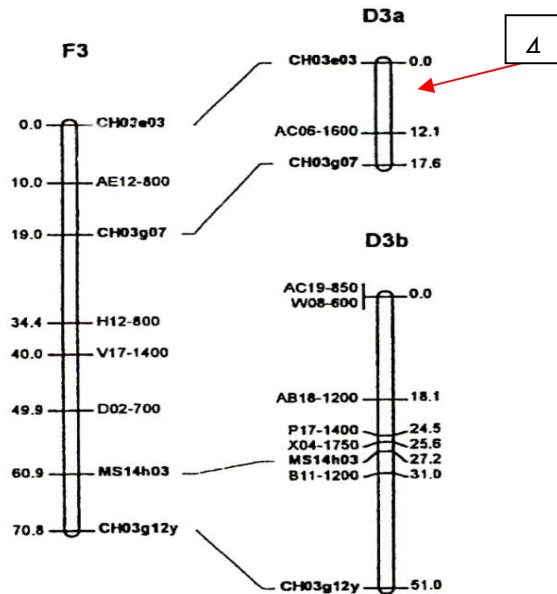


Rysunek 3. Segregacja CAPS genu S transferazy glutationu w populacji segregującej 48 osobników z rodziny ‘Fiesta’ x ‘Discovery’ (oznaczone jako FD i numerami roboczymi) – Segregation of CAPS of glutathione S-transferase gene in segregating population of 48 individuals derived from ‘Fiesta’ x ‘Discovery’ cross

Tabela 1

Rola analizowanego genu, warunki PCR do jego izolacji oraz techniki stosowane do analizy polimorfizmu EST – Putative role of genes, PCR conditions and molecular markers developed for analysing polymorphism of ESTs

Nr, nazwa genu (numer referencyjny w Gen-Banku)	Rola genu	PCR: Temperatura przyłączenia	Sekwencje starterów	Długość produktu PCR(bp)	Marker do analizy polimorfizmu EST	Lokalizacja wybranych genów na chromosomach
1. defensyna (DT040248)	N-terminacja łańcuchów białkowych podczas działania czynników zewnętrznych	60°C	Def/R-F- 5'ggacgatggttgctgagggtagg 3'gcatttcaaacgtagggcattag	200	SSCP	LG 2
2. peroksydaza (DT040361)	ochrona przed uszkodzeniami tkanek roślinnych	60°C	Perox/R-F -5'cagtacgtgagaaatgacc 3'ccaaaggagaagaagccaaaagat	280	SSCP	LG 5
3. MT2 MALDO (DR998097)	kodowanie białek wiążących metale ciężkie (cynk, kadm, nikiel, miedź, itp.)	60°C	MALDO2/R-F - 5'gagcggtttatctgcttct 3'tattctaaaaacacgaccttc	1250	CAPS	LG 12
4. ATM2 MALDO (DR995640)	grupowanie pozycji cysteiny w łańcuchu białkowym	60°C	MALDO3/R-F - 5'catttcataacatcacaagaccac 3'tcgagctaaaccctaaaaca	1100	SSCP	LG 3
5. Peptydaza AAZA M9 (CN897107)	aktywacja molekuly wody poprzez regulację przepływu jonów cynku w wiązках przewodzących	65°C	AAZA/R-F - 5'ggcagcccttgaaaccata 3'ctgtgattagctctccaacctt	600	CAPS	LG 6
6. S-transferaza glutationu (CN580380)	kodowanie białek typu GST, biorących udział w indukcji i regulacji mechanizmów apoptozy	60°C	GluSTra/R-F - 5'gctgcaatgcgagttttt 3'tggggaggtggtgaagat	850	CAPS	LG 3



Rysunek 4. Lokalizacja genów S transferazy glutationu (6) i ATM2 MALDO (4) na mapie chromosomu 3. Mapa referencyjna 'Fiesta' i 'Discovery' – Localization of the glutathione S-transferase (6) and ATM2 MALDO (4) genes on the linkage group 3. Reference map 'Fiesta' x 'Discovery' (Liebhard i in. 2002)

Częstość rekombinacji między markerami wygenerowanymi w ISK a markerami referencyjnymi, oszacowana na podstawie analizy statystycznej rozkładu markerów w segregującej populacji 'Fiesta' x 'Discovery' (program JoinMap 3.0), wynosiła od 1 do 5%. Na podstawie określonego procentowo rozkładu rekombinantów ustalono, że analizowane geny są zlokalizowane w obrębie pięciu grup sprzężeń (tab. 1) scharakteryzowanych dla mapy referencyjnej 'Fiesta' x 'Discovery' (Liebhard i in. 2002), w tym gen defensyny na chromosomie 2, geny ATM2 MALDO oraz S-transferazy glutationu na chromosomie 3 (rys. 4), gen peroksydazy na chromosomie 5, gen peptydazy AAZAM9 na chromosomie 6, a gen MT2 MALDO na chromosomie 12.



Od czasu pojawienia się pierwszej mapy referencyjnej genomu jabłoni (Hemmat i in. 1994), próby jej wysycenia przez zlokalizowanie na mapie genów związanych z jakością owoców były podejmowane w wielu ośrodkach badawczych na świecie. W wyniku prac kilku zespołów ustalono, że geny związane z soczystością owoców są zlokalizowane na chromosomie 16, a geny kodujące określoną kruchość jabłka na chromosomach 1, 5, 10, 12 i 13 mapy genetycznej *Malus domestica* Borkh. (King i in. 2000). Analiza molekularna markerów dla genów ACC (syntetaza 1-aminocyklopropano 1-karboksylazy) i ACO (oksydaza 1-aminocyklopropano 1-karboksylazy) (Harada i in. 2000), kontrolujących stężenie etylenu w tkance owoców, umożliwiły zlokalizowanie tych genów w obrębie grup sprzężeń 10 oraz 15 (Costa i in. 2005). Zgodnie z wynikami uzyskanymi przez innych autorów, jakość owoców regulowana jest przez grupy kilku lub nawet kilkunastu alleli danego genu, np. kilka heterologicznych alleli genu ekspansyny, opisanych w NCBI, wykazywało bezpośredni związek z regulacją procesu dojrzewania owoców, co potwierdza złożoność procesów prowadzących do uzyskania kompleksu cech jakościowych (Costa i in. 2008). Stwierdzono także, że obecność genów nie mających bezpośredniego wpływu na jakość owoców, a regulujących inne ważne procesy (np. procesy detoksyfikacji), może pośrednio wpływać na jakość jabłek (Han i in. 2007).

Wyizolowane w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarstwa fragmenty EST są odpowiednikami pełnej sekwencji lub fragmentami sekwencji genów, kodujących produkty odgrywające istotną rolę w procesach warunkujących jakość owoców. Wstępny ich dobór był oparty na analizie mikromacierzy, przeprowadzonej na matrycach pochodzących z owoców odmian Fiesta i Discovery, różniących się cechami jakościowymi jabłek. Rolę genów, których ekspresja była odmienna w badanych przez nas owocach 'Fiesta' i 'Discovery', opisali m.in. Valderrama i Clemente (2004) oraz Bacon i współautorzy (1998), którzy stwierdzili, że peptydaza AAZA wpływa na utrzymanie prawidłowego pH w komórkach przez kontrolę reakcji redukcynno-oksydacyjnych oraz

reguluje przepływ jonów w tkankach, warunkując prawidłowe ich uwodnienie. Ci sami autorzy wykazali, że rolę peroksydazy jest inhibicja reakcji brązowienia owoców, będącej efektem utleniania komponentów fenolowych, co wpływa na cechy przechowalnicze jabłek. Geny ATM2 MALDO oraz MT2 MALDO kodują natomiast białka z grupy metalotionin, bogatych w motywy cysteinowe wiążące metale ciężkie, a więc biorących bezpośredni udział w procesach detoksyfikacji komórek. Stwierdzono znaczny wzrost stężenia białek z grupy MALDO w owocach dojrzewających i dojrzałych, co potwierdza teorię dotyczącą ich roli w regulacji procesu dojrzewania jabłek (Takaya i in. 1998; Cobbett i Goldsbrought 2002). Pozostałe dwa analizowane geny, tj. gen defensyny oraz S-transferazy glutationu należą do grupy genów kodujących białka enzymatyczne, pośrednio kontrolujące stężenie etylenu w tkankach owoców. Defensyna reguluje poziom kwasu jasmonowego, będącego z kolei induktorem ekspresji innych genów, modyfikujących stężenie etylenu w owocach (Reymond i Farmer 1998). Współdziałanie białka S-transferazy glutationu z genami warunkującymi jędrność owoców związane jest z zaindukowaniem mechanizmu obumierania komórek przez apoptozę (Deng i in. 2003).

Wyizolowanie fragmentów EST, warunkujących wyżej opisane cechy jakościowe jabłek, i analiza ich polimorfizmu w obrębie populacji segregującej 'Fiesta' x 'Discovery' pozwoliły nam na umiejscowienie na mapie genetycznej jabłoni sześciu, dotychczas nie analizowanych w tym kontekście genów i przyczyniły się do wysycenia mapy referencyjnej.

## LITERATURA

- Abbot A.G., Kole C.H. 2008. Principles and practices of plant genomics. Science Publisher. Genome mapping. USA. 1: 1-29.
- Bacon M.A., Wilkinson S., Davies W.J. 1998. pH regulated leaf cell expansion in droughted plants is abscisic acid dependent. Plant Physiology. 118: 1507-1515.
- Cipriani G., Lot G., Huang W-G. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation,

- characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.* 99: 65-72.
- Cobbett C., Goldsbrought P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53: 159-182.
- Costa F., Stella S., Van de Weg W.E., Guerra W., Cecchinel M., Dallavia J., Koller B., Sansavini S. 2005. Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACSI* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh.). *Euphytica* 141: 181-190.
- Costa F., Van de Weg E.W., Stella S., Dondini L. 2008. Map position and functional allelic diversity of *Md-Exp7*, a new putative expansion gene associated with fruit softening in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*). *Tree Genetics and Genomes* 4: 575-586.
- Deng F., Jelesko J., Cramer C.L., Wu J., Hatzios K.K. 2003. Use of an antisense gene to characterize glutathione S-transferase functions in transformed suspension-cultured rice cells and calli. *Pesticide Biochem. Physiol.* 75: 27-37.
- Han S.E., Young S., Kim D., Sung S-K., Kim W.T. 2007. Expression of *MdCAS1* and *MdCAS2*, encoding apple  $\beta$ -cyanoalanine synthase homologs, is concomitantly induced during ripening and implicates MdCASs in the possible role of the cyanide detoxification in Fuji apple (*Malus x domestica* Borkh.) fruits. *Plant Cells Rep.* 26: 1321-1331.
- Harada T., Sunako T., Wakasa Y., Soejima J., Satoh T., Niizeki M. 2000. An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACSI*) accounts for the low level of ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 101: 724-746.
- Hemat M., Weeden N.F., Manganaris A.G., Lawson D.M. 1994. Molecular marker linkage map for apple. *J. Heredity* 85: 4-11.
- Kellerhals M., Bertschinger L., Gessler C. 2004. Use of genetic resources in apple breeding and for sustainable fruit production. *J. Fruit Omam. Plant Res.* 12: 53-62.
- Kellerhals M., Meyer M. 1994. Aims of the apple breeding program at Wändeswil. *Prog. Temp. Fruit Breed.* 117-121.

- King G.J., Maliepaard C., Lynn J.R., Alston F.H., Durel C-E., Evans K.M., Griffon B., Laurents F., Manganaris A.G., Schrevens E., Tartarini S., Verhaegh J. 2000. Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). *Teor. Appl. Genet.* 100: 1074-1084.
- Lander E.S., Botstein D. 1989. Mapping Mendelian Factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 158-199.
- Liebhard R., Gianfranceschi L., Koller B., Ryder C.D., Tarchini R., Van de Weg E., Gessler C. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding* 10: 217-241.
- Liebhard R., Kellerhals M., Pfammatter W., Jertmini M., Gessler C. 2003. Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Molecular Biol.* 52: 511-526.
- Maliepaard C., Alston F.H., Van Arkel G., Brown L.M., Chevreau E., Dunemann F., Evans K.M., Gardiner S., Guilford P., Van Heusden A.W., Janse J., Laurens F., Lynn J.R., Manganaris A.G., Den Nijs A.P.M., Periam N., Rikkerink K., Roche P., Ryder C., Sansavini S., Schmidt H., Tartarini S., Verhaegh J.J., Vrieland-van Ginkel M., King G.J. 1998. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theor. Appl. Genet.* 97: 60-73.
- Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Kroshna T.G., Yano M., Bhatia C.R., Sasaki T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker assisted selection in crop plants. *Molec. Breed.* 3: 87-103.
- Oojen J.W., Voorrips R.E. 2001. JoinMap.3 Software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Research Intern.* 1-51.
- Reiter R.S., Williams J.G., Feldmann K.A., Rafalski J.A., Tingey S.V., Scolnik P.A. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *PNAS.* 89(4): 1477-1481.
- Reymond Ph., Farmer E. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion Plant Biol.* 1: 404-411.

- Ritter E., Gebhardt C., Salamini F. 1990. Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 125: 645-654.
- Quiros G., Li C.F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Teor. Appl. Genet.* 103: 455-461.
- Silfverberg-Dilworth E., Matasci C.L., Van de Weg W.E., Kaauwen M.P.W., Walser M., Kodde L.P., Soglio V., Gianfranceschi L., Durel C-E., Costa F., Yamamoto T., Koller B., Gessler C., Patocchi A. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics Genomes* 2: 202-224.
- Takaya M., Kita M., Hisada S., Endo-Inagaki T.Y., Omura M. 1998. Characterisation of gene repertoires at mature stage of citrus fruits through random sequencing and analysis of redundant metallothionein-like genes expressed during fruit development. *Genetics* 211: 221-227.
- Tartarini S. 2003. Marker assisted selection in pome fruit breeding. (A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding. Session I: MAS in plants) Bologna University, Italy.
- Ullah I. 2004. Inheritance of important trait in bread wheat using diallel analysis. *Pakistan Research Repository* 1-136.
- Valderrama P., Clemente E. 2004. Isolation and thermostability of peroxidase isoenzymes from apple cultivars Gala and Fuji. *Food Chemistry* 87: 601-606.
- Watada A.E., Abbot, J.A. 1985. Apple quality: influences of pre- and post-harvest factors and estimation by objective methods. *Evaluation of quality fruits and vegetables* 63-81.
- Yamamoto T., Kimura T., Sawamura T., Manabe T., Kotobuki K., Hayashi T., Ban Y., Matsyta N. 2002. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. *Euphytica* 124: 129-137.