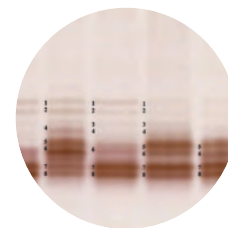


УДК 635.152:631.531
DOI:10.18619/2072-9146-2017-5-3-8

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ЭСТЕРАЗНОГО СОСТАВА ЗРЕЛЫХ СЕМЯН ОБРАЗЦОВ РЕДИСА (*RAPHANUS SATIVUS* L.) КОЛЛЕКЦИИ ВИР



EVALUATION OF ESTERASE POLYMORPHISMS IN MATURE SEEDS OF RADISH (*RAPHANUS SATIVUS* L.) ACCESSIONS OF VIR COLLECTION

Рудакова А.С.¹ – к.б.н., ведущий научный сотрудник
лаборатории биохимии растений,
Рудаков С.В.¹ – научный сотрудник лаборатории биохимии растений,
Артемьева А.М.² – к.с.-х.н., заведующая отделом
генетических ресурсов овощных и бахчевых культур
Курина А.Б.² – аспирант
Кочерина Н.В.² – к.б.н., старший научный сотрудник
лаборатории молекулярной и экологической генетики
Чесноков Ю.В.³ – д.б.н., директор ФГБНУ АФИ

¹ Государственный университет Молдовы
2009, Республика Молдова, г.Кишинев, ул. Матеевича, д. 60
E-mail: rud-as@mail.ru, rudacov@yahoo.com

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт
генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»
190000, Россия, г.Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 42-44
E-mail: akme11@yandex.ru

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Агрофизический научно-исследовательский институт»
195220, Россия, г.Санкт-Петербург, Гражданский проспект, д. 14
E-mail: yuv_chesnokov@agrophys.ru

Rudakova A.S.¹, Ph.D. in Biology, Researcher in Laboratory of Plant Biochemistry
Rudakov S.V.¹, Researcher in Laboratory of Plant Biochemistry
Artemyeva A.M.², Ph.D. in Agriculture, Head of Vegetable
and Cucurbits Crop Plant Genetic Resources Department
Kurina A.B.², Postgraduate Student
Kocherina N.V.², Ph.D. in Biology, Senior Researcher
in Laboratory of Molecular and Ecological Genetics
Chesnokov Yu.V.³, Doctor of Sciences in Biology,
Director of Agrophysical Research Institute

¹ State University of Moldova
Mateevich Str. 60, 2009 Kishinev,
Republic of Moldova

² Federal State Budgetary Scientific Organization
«Federal Research Centre N.I. Vavilov
All-Russian Research Institute
of Plant Genetic Resources»
B. Morskaya St., 42-44, St.-Petersburg, 190000, Russia

³ Federal State Budgetary Scientific Organization
«Agrophysical Research Institute»
Grazhdanskiy Ave., 14, St-Petersburg, 195220, Russia;
E-mail: yuv_chesnokov@agrophys.ru

Проведена биохимическая оценка 25 образцов редиса (*Raphanus sativus* L.) по эстеразным изоферментам зрелых семян. Результаты эксперимента выявили широкий спектр разнообразия среди генотипов, основываясь на их электрофоретических зонах эстеразных изоферментов. Выявленный изоферментный комплекс эстераз был представлен восемью изоформами с молекулярными массами от 37.7 кД до 57.6 кД. Все образцы были разделены на 13 электрофоретических зимотипов, отличающихся друг от друга наличием или отсутствием определенных зон. Наиболее часто встречается электрофоретический зимотип Gr. 1, который включает в себя 24% от общего количества оцененных образцов. С частотой 4% встречаются 8 зимотипов (Gr. 6 – Gr. 13). Три группы (Gr. 2, Gr. 3 и Gr. 4) обладали одинаковой частотой встречаемости – 12%. Зимотип Gr. 5 включал в себя максимальное количество зон – 8. С наименьшим количеством зон (по 4) были обнаружены 2 зимотипа – Gr. 3 и Gr. 12. Мономорфными оказались 2 зоны эстераз – 7 и 8 зоны (Mr = 39.7кД и Mr = 37.7 кД, соответственно). Остальные шесть зон оказались полиморфными, т.е. могли отсутствовать в определенных зимотипах. Частота встречаемости каждой зоны в различных зимотипах варьировала от 6.58% до 17.11%. В результате исследования были выделены образцы, которые могут служить наиболее перспективными родительскими формами при проведении генетико-селекционных исследований у данной культуры.

Ключевые слова: редис, эстеразы зрелых семян, изоферментный анализ.

Для цитирования: Рудакова А.С., Рудаков С.В., Артемьева А.М., Курина А.Б., Кочерина Н.В., Чесноков Ю.В. Изучение полиморфизма эстеразного состава зрелых семян образцов редиса (*Raphanus sativus* L.) коллекции ВИР. Овощи России. 2017;(5):3-8. DOI:10.18619/2072-9146-2017-5-3-8

*A biochemical evaluation of 25 radish accessions (*Raphanus sativus* L.) on esterase isozymes of mature seeds has been carried out. The results of the experiments showed a wide range of diversity among the genotypes based on electrophoretic zones of esterase isoenzymes. The revealed isoenzyme complex of esterases was represented by eight isoforms with molecular weights from 37.7 kD to 57.6 kD. All accessions were divided into 13 electrophoretic zymotypes, differing from each other by the presence or absence of definite zones. The most often observed electrophoretic zymotype is Gr. 1, which includes 24% of the total number of accessions evaluated. There are 8 zymotypes (Gr. 6 - Gr. 13) with a frequency of occurrence 4%. Three groups (Gr. 2 - Gr. 4) had the same frequency of occurrence - 12%. Zymotype of Gr. 5 contains the maximum number of zones - 8. 2 zymotypes - Gr. 3 and Gr. 12 had the smallest number of 4 zones. Two zones of esterases - zones 7 and 8 (Mr 39.7kD and Mr 37.7 kD, respectively) were monomorphic. The remaining six zones were polymorphic, i.e. could be absent in some zymotypes. The frequency of occurrence of each zone in different zymotypes has varied from 6.58% to 17.11%. As results of this research the accessions that were selected can become the most promising parent forms for future genetic and selection studies of this culture.*

Keywords: radish, esterases of mature seeds, isoenzyme analysis.

For citation: Rudakova A.S., Rudakov S.V., Artemyeva A.M., Kurina A.B., Kocherina N.V., Chesnokov Yu.V. Evaluation of esterase polymorphisms in mature seeds of radish (*Raphanus sativus* L.) accessions of VIR collection. Vegetable crops of Russia. 2017;(5):3-8. (In Russ.) DOI:10.18619/2072-9146-2017-5-3-8

Введение

Редис – представитель семейства *Brassicaceae*, является широко распространенной овощной сельскохозяйственной культурой как на территории Республики Молдова, так и на территории Российской Федерации. Повышение продуктивности редиса и улучшение его хозяйственно ценных характеристик может быть достигнуто за счет использования современных генетико-селекционных технологий, в том числе молекулярно-генетических и биохимических маркеров, позволяющих ускорять селекционный процесс [1]. Молекулярно-генетические и биохимические маркеры являются важным инструментом в работе селекционера, они облегчают и ускоряют процесс создания новых сортов, обладающих необходимыми хозяйственно значимыми свойствами и признаками. Одними из наиболее широко используемых биохимических генетических маркеров являются изоферменты [2].

Изоферменты – это различные молекулярные вариации (формы) одного и того же фермента, выполняющие одну и ту же функцию [2, 3]. В растениях большинство ферментов, как правило, представлено несколькими изоферментными формами, часто со специфической внутриклеточной локализацией [4, 5]. Поскольку изоферменты – это с точки зрения структуры особая группа белков, то их можно дифференцировать электрофорезом. Данные электрофоретического анализа у растений часто используют для того, чтобы получить информацию о генетическом разнообразии, существующем в популяции и о степени дивергентности среди индивидуумов [4, 6]. Анализ полиморфного электрофоретического спектра

изоферментных маркеров – это быстрый и относительно дешевый подход, который успешно применяется для экспресс-оценки генетических ресурсов растений [7, 8].

Основной задачей настоящей работы было проведение изоферментного анализа эстераз зрелых семян 25 образцов редиса из генетической коллекции ВИР с целью последующего выделения и подбора возможных родительских форм и/или исходного селекционно-значимого материала, предназначенных для использования в селекционных программах, направленных на повышение продуктивности у данной сельскохозяйственной культуры.

Материалы и методы

Материалом исследования служили зрелые семена 25 образцов редиса (*Raphanus sativus* L.) из коллекции ВИР (г. Санкт-Петербург) (табл. 1). Изучаемые образцы представляют пять разновидностей культуры.

Семена образцов тщательно размалывали в фарфоровой ступке, взвешивали в пробирках типа «Эппендорф» по 100 мг, добавляли 1 мл гексана и оставляли для обезжиривания на ночь в холодильнике. Затем пробы центрифугировали 10 минут при 16 тыс. об./мин. и температуре 15°C, сливали надосадочную жидкость и оставляли пробы под тягой для высушивания на воздухе.

В дальнейшем обезжиренный и высушенный растительный материал использовали для экстракции ферментов 0.01 М трис-HCl буфером при pH 8.3 в присутствии 2-меркаптоэтанола (2 мкл/мл), ЭДТА (0.5 мМ). Соотношение мука : буфер составляло 1:4, экстракцию ферментов проводили при температуре 4...8°C, продолжительность – 14-18 час. Образцы центрифугировали 10 мин, отбирали

Таблица 1. Генотипы редиса из коллекции ВИРа

№	№ каталога ВИР	Название образца	Происхождение	Разновидность
1	187	Saxa	Германия	<i>rubescens</i> Sinsk.
2	1233	Дунганский	Китай	<i>roseus</i> Sazon.
3	1566	Ранний шарлаховый круглый	США	<i>rubescens</i> Sinsk.
4	1615	Червьни с объем опашка	Болгария	<i>striatus</i> Sinsk.
5	1667	Красный великан	Россия	<i>roseus</i> Sazon.
6	1762	Ohlsens Enke Halflong	Дания	<i>striatus</i> Sinsk.
7	1855	Amager	Финляндия	<i>striatus</i> Sinsk.
8	1939	French Breakfast	Пакистан	<i>striatus</i> Sinsk.
9	2188	Candela di ghiaccio	Италия	<i>subalbus</i> Sinsk.
10	2196	Местный	Ливан	<i>rubescens</i> Sinsk.
11	2197	De Pontvil	Франция	<i>striatus</i> Sinsk.
12	2210	Саратовский	Россия	<i>rubescens</i> Sinsk.
13	2231	Vates' long scarlet	Эфиопия	<i>rubescens</i> Sinsk.
14	2245	Местный	Аргентина	<i>striatus</i> Sinsk.
15	2294	Promptus	Германия	<i>striatus</i> Sinsk.
16	2302	Long ronge arabi	Ливия	<i>rubescens</i> Sinsk.
17	2311	Largo rojo punta Blanca	Испания	<i>striatus</i> Sinsk.
18	2313	Datil encarnalo	Испания	<i>striatus</i> Sinsk.
19	2341	Largo rojo de mallorca	Испания	<i>rubescens</i> Sinsk.
20	2347	Syla	Дания	<i>subalbus</i> Sinsk.
21	2360	Helios	Чехия	<i>chloris</i> Alef.
22	2371	Safir	Дания	<i>striatus</i> Sinsk.
23	2375	Rund Lalbrot Lalbweiss	Дания	<i>striatus</i> Sinsk.
24	2379	Местный	Ливан	<i>subalbus</i> Sinsk.
25	2380	Rund rosen rod Vitspetsig H.G.	Швеция	<i>striatus</i> Sinsk.

надосадочную жидкость и замораживали пробы при -20°C для длительного хранения и предотвращения инактивации изоферментов. Перед внесением в электрофоретическую камеру образцы размораживали при комнатной температуре.

Изоферменты разделяли методом нативного вертикального электрофореза в ПААГ, как описано в литературе [9]. Концентрация разделяющего и концентрирующего гелей была 11% и 5%, соответственно. Электрофорез осуществляли в камере Mini-PROTEAN Tetra Cell («Bio-Rad Laboratories, Inc.», USA). В качестве маркеров молекулярных масс использовали Prestained Protein Ladder («Thermo Scientific», USA). В каждый карман концентрирующего геля вносили по 15 мкг белка. Предварительно концентрацию белка в ферментных препаратах определяли методом связывания красителя по Bradford, в качестве стандарта при этом использовали БСА [10]. Электрофорез проводили на холоде ($10...15^{\circ}\text{C}$), при 10 В/см в течение 2,5 час. По окончании электрофореза гель обрабатывали реактивом на неспецифическую эстеразу [11]. Для этого гель выдерживали в красителе до появления коричневатого-фиолетовых полос, затем избыток красителя отмывали 10% уксусной кислотой.

Полученные зимограммы сканировали на сканере Epson Expression 10000XL («GE Healthcare», USA). Оценку каждого образца (значение R_f всех полос в треке, расчет молекулярных масс по стандартам) проводили с использованием программы Phoretix 1D Advanced («TotalLab, Ltd.», Great Britain).

Расчет степени наблюдаемой гетерозиготности H проводили как для каждого локуса, так и в среднем по нескольким локусам (общая гетерозиготность). Гетерозиготность популяции в каждом локусе H_l и общую гетерозиготность $H_{\text{общ}}$ рассчитывали по следующей формуле [12, 13]:

$$H_l = 2n(1 - \sum_k x_k) / 2n - 1,$$

$$H_{\text{общ}} = \sum_{l=1}^r H_l / r,$$

где l – порядковый номер локуса, n – размер популяции, x_k – оцениваемая частота k -го аллеля l -го локуса, r – общее число локусов. Также вычисляли дисперсии гетерозиготности $\text{Var}(H_l)$ по одному локусу и дисперсию средней гетерозиготности внутри популяции $\text{Var}(H_{\text{общ}})$ [14]:

$$\text{Var}(H_l) = H_l(1 - H_l) / n,$$

$$\text{Var}(H_{\text{общ}}) = \frac{1}{nr^2} \sum_l H_l(1 - H_l) + \frac{1}{nr^2} \sum_l \sum_{i \neq j} (H_{li} - H_l H_{lj})$$

Результаты

В исследованных семенах 25 образцов редиса было выявлено 8 изоформ эстеразных ферментов с молекулярными массами, варьирующими от 37,7 кД до 57,6 кД (рис. 1).

По наличию или отсутствию отдельных зон эстеразного состава все образцы были подразделены на 13 электрофоретических змотипов (Гр. 1 – Гр. 13) (табл. 2).

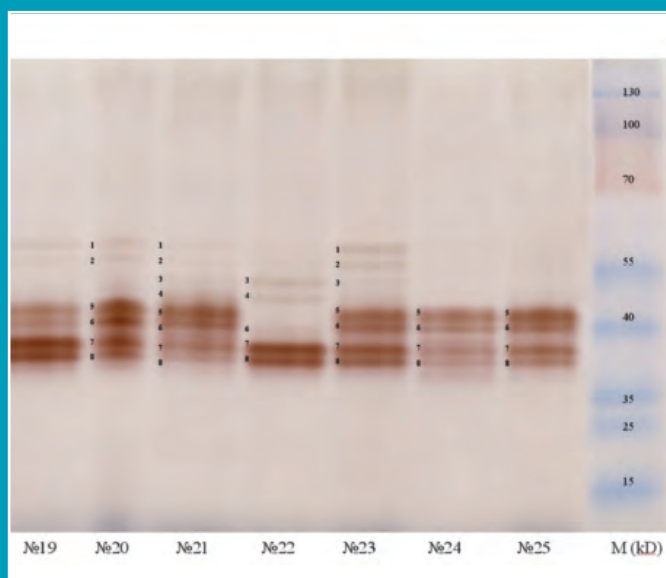
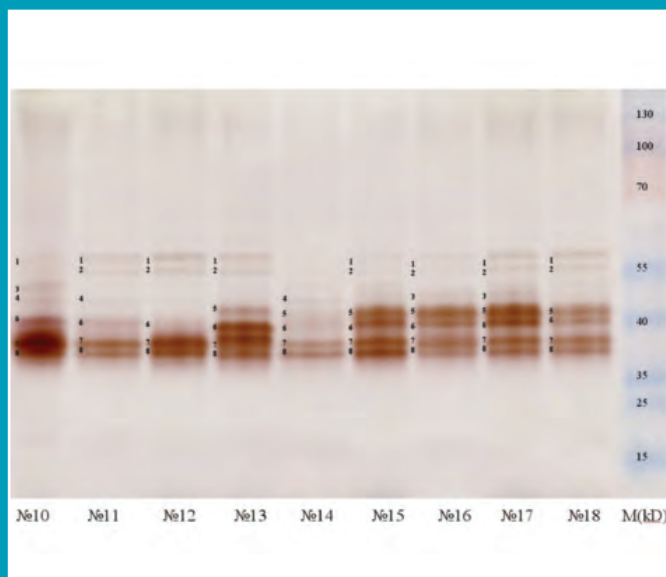
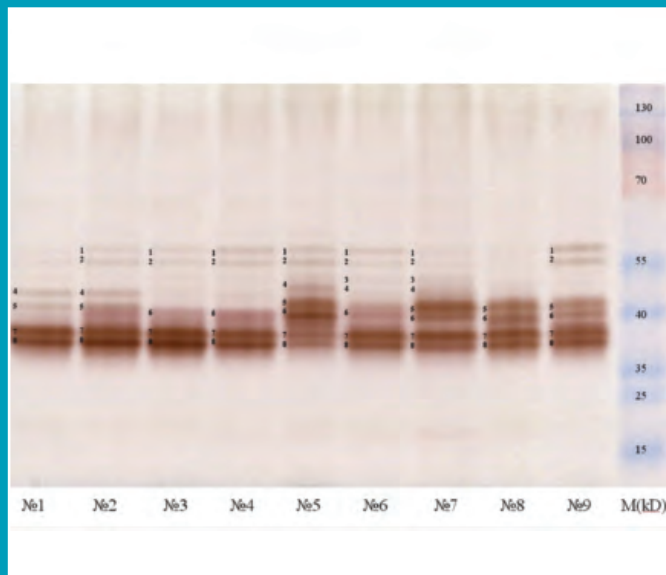


Рисунок 1. Электрофоретические профили изоформ эстераз у изученных генотипов редиса (№№1-25). Вдоль треков проставлены номера присутствующих в образце эстеразных зон, цифры справа – маркеры молекулярных масс (15-130 кД).

Таблица 2. Распределение эстеразных зон среди зимотипов редиса

Зимотип	Зона 1 57.6 кД	Зона 2 54.8 кД	Зона 3 51 кД	Зона 4 48.4 кД	Зона 5 45.5 кД	Зона 6 43.7 кД	Зона 7 39.7 кД	Зона 8 37.7 кД	Общее число зон
Гр.1	+	+			+	+	+	+	6
Гр.2	+	+	+		+	+	+	+	7
Гр.3					+	+	+	+	4
Гр.4	+	+				+	+	+	5
Гр.5	+	+	+	+	+	+	+	+	8
Гр.6	+	+		+	+	+	+	+	7
Гр.7				+	+	+	+	+	5
Гр.8	+	+	+	+		+	+	+	7
Гр.9	+		+	+		+	+	+	6
Гр.10	+	+		+		+	+	+	6
Гр.11			+	+		+	+	+	5
Гр.12				+	+		+	+	4
Гр.13	+	+		+	+		+	+	6
Всего	9	8	5	9	8	11	13	13	76\76
Частота зоны(%)	11.84	10.53	6.58	11.84	10.53	14.47	17.11	17.11	

Зимотип Гр. 5 характеризовался наибольшим количеством зон, в его состав включены все 8 эстераз. Наименьшим количеством зон (по 4 шт.) обладали 2 зимотипа – Гр. 3 и Гр. 12. По 6 зон было обнаружено в четырех зимотипах – Гр. 1, Гр. 9, Гр. 10 и Гр.13. Эстеразный состав Гр. 2, Гр. 6 и Гр. 8 включал в себя по 7 зон, пятью зонами был представлен состав трех зимотипов – Гр. 4, Гр. 7 и Гр.11.

Зона 7 (Mг = 39.7 кД) и зона 8 (Mг = 37.7 кД) были обнаружены в каждом зимотипе, т.е. они являются монотипными.

Остальные 6 зон были полиморфными и встречались среди зимотипов с частотой от 6.58% до 14.47%. Наиболее редко встречалась зона 3, она была обнаружена только в 5 зимотипах из 13 (6.58%). Наиболее часто среди полиморфных встречалась зона 6, она была найдена в 11 зимотипах, процент встречаемости этой зоны составил 14.47%. Зона 1 и зона 4 встречались в 9 зимотипах и их частота встречаемости достигла 11.84%.

Генотипы, имеющие сходный эстеразный состав и образующие один из зимотипов, представлены в таблице 3. Наиболее часто встречающийся зимотип - Гр. 1 - составил 24% от всех образцов, наиболее редкими зимотипами (4%) оказались Гр. 6 – Гр. 13, они были представлены одним генотипом каждый. Три зимотипа (Гр. 2, Гр. 3 и Гр. 4) встречались одинаково часто – 12 % от общего количества. Гр. 5 характеризовалась частотой встречаемости - 8%.

Зоны с высоким значением молекулярной массы (57.6 кД- 48.4кД): зоны 1– 4 - имели низкую интенсивность

Таблица 3. Зимотипы редиса и их эстеразный состав

Зимотип	Зоны эстераз*	Номера генотипов**	Всего генотипов	%
Гр.1	1, 2, 5, 6, 7, 8	9, 13, 15, 18, 19, 20	6	24
Гр.2	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8	16, 17, 23	3	12
Гр.3	5, 6, 7, 8	8, 24, 25	3	12
Гр.4	1, 2, 6, 7, 8	3, 4, 12	3	12
Гр.5	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	7, 21	2	8
Гр.6	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8		1	4
Гр.7	4, 5, 6, 7, 8	14	1	4
Гр.8	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8	6	1	4
Гр.9	1, 3, 4, 6, 7, 8	10	1	4
Гр.10	1, 2, 4, 6, 7, 8	11	1	4
Гр.11	3, 4, 6, 7, 8	22	1	4
Гр.12	4, 5, 7, 8	1	1	4
Гр.13	1, 2, 4, 5, 7, 8	2	1	4

* - зоны эстераз даны в соответствии с таблицей 2;

** - номера генотипов даны в соответствии с таблицей 1

практически во всех образцах (рис.1). Зоны 5, 6, 7 и 8 (с меньшей молекулярной массой $M_r = 45.5-37.7$ кД), наоборот, характеризовались высокой интенсивностью. Таким образом, у редиса наиболее значимыми в биохимическом плане являются зоны эстераз с меньшей молекулярной массой.

Полученные результаты позволяют выделить в качестве потенциальных родительских форм два образца (№7 и №21), входящих в зимотип Гр. 5. Они обладают уникальным изоферментным составом, представленным всеми восемью эстеразами. Причем интенсивность зон с низким M_r (зоны 4-8) в этих образцах довольно значительная. Данные образцы представляют ценность не только по биохимическим показателям, но и по важным морфологическим и хозяйственным признакам (рис. 2). Образец №7 – Amager (к-1855, Финляндия) представляет собой сорт-популяцию типа Французский завтрак, состоящую из нескольких близких биотипов. Vegetационный период 22-27 суток. Образец характеризуется способностью формировать компактную розетку с приподнятым расположением листа в условиях защищенного грунта при недостаточной освещенности (менее 5000 Лк), при этом средняя масса корнеплода составляет 8,3 г (урожайность 2,8 кг/м²). В условиях открытого грунта урожайность может достигать 6,5 кг/м². Недостатком данного образца является быстрая потеря сочности корнеплода с образованием пустот.

Образец №21 – Helios (к-2360, Чехия) сортотипа Круглый желтый отличается очень высокой однородностью; вегетационный период его 25-30 суток. Образец среднеустойчив к недостаточной освещенности (всходы вытягиваются), но в тоже время отличается высокой товарностью урожая как в защищенном грунте, так и в открытом. Розетка полураскидистая, прямостоячая невысокая, опушение листа слабое, мягкое. Корнеплод крупный (до 21,0 г), округлый, темно-желтого цвета со слабой шероховатостью, мякоть корнеплода плотная, острого вкуса, долго не теряющая сочность. Урожайность достигает 5,2 кг/м².

Также представляет значительный интерес зимотип Гр.1. Представители этой весьма обширной группы (6 генотипов) включают в свой состав 6 эстеразных зон, из которых 4 зоны с низкой молекулярной массой представлены в значительном количестве.

Образцы, представленные в зимотипе Гр.1, относятся к трем разновидностям: *var. subalbus* Sinsk., *var. rubescens* Sinsk., *var. striatus* Sinsk. При этом пять высоко однородных образцов имеют удлиненную форму корнеплода, а образец №15 представляет собой сорт-популяцию, включающую несколько различающихся биотипов.

По данным изоферментного анализа был проведен расчет гетерозиготности популяции в каждом локусе H_i и общей гетерозиготность $H_{общ}$, а также дисперсии гетерозиготности $Var(H_i)$ по одному локусу и дисперсию средней гетерозиготности внутри популяции $Var(H_{общ})$. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Поскольку дисперсия средней гетерозиготности должна учитывать ковариации между гетерозиготностями по разным локусам, I и \hat{I} , что обусловлено их зависимостью от частоты двойных гетерозигот H_{ii} по этим локусам, то для расчетов этих



Рисунок 2. Образцы редиса сорта Amager (А) и сорта Helios (Б).

Таблица 4. Расчет гетерозиготности и дисперсии у образцов редиса по результатам изоферментного анализа

	Эстеразные зоны								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Гетерозиготность H_i	0,653	0,491	0,916	0,858	0,491	0,157	0	0	Гетерозиготность средняя $H_{общ}$ 0,446
Дисперсия $Var(H_i)$	0,009	0,01	0,003	0,005	0,01	0,005	0	0	Дисперсия $Var(H)$ 0,001

величин была использована формула предложенная Б. Вейр [14]. Следует отметить, что использованные нами формулы [12-14] позволяют рассчитать любой многочлен в наборе переменных, распределенных мультиномиально, что, в свою очередь, позволяет рассматривать выявляемую гетерозиготность как меру информационного полиморфизма, широко используемого при составлении и реализации генетико-селекционных программ. В то же время, как известно, проявление любых генетико-селекционных свойств зависит от генотипа образцов и, следовательно,

информационный полиморфизм есть ни что иное как реализация на фенотипическом и(или) биохимическом уровнях активности и распределения в геноме генов или локусов хромосом, отвечающих за проявление изучаемых признаков.

Таким образом, наличие восьми изоформ делает эстеразы зрелых семян редиса удобным биохимическим маркером, что может быть использовано при проведении как физиолого-биохимических, так и генетико-селекционных исследований.

● Литература

1. Tyagi I.D., Variability and correlation studies in bottle gourd (*Lagenaria siceraria*). // Indian J. Hort. - 1972. - Vol. 29. - #2. - P. 219-222.
2. Чесноков Ю.В. Молекулярно-генетические маркеры и их использование в предселекционных исследованиях. СПб: АФИ, 2013. - 116 с.
3. Markert C.L., Moller F. Multiple forms of enzymes; tissue, ontogenic and species patterns. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1959. - Vol. 45. - P. 753-763.
4. Tanksley, S.D., Orton T.J., (eds) Isozymes in Plant Genetics and Breeding. North-Holland Publ. Co. Amsterdam. 1983.
5. Harris H. Enzyme polymorphism in man. // Proc. Roy. Soc. (London) -1966. - Vol. 164. - P. 298-310.
6. Bailey D.C., Isozymic variations and plant breeder rights. In: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds). Isozymes in plant genetics and breeding, Part A, Elsevier, Amsterdam. - 1983. - P. 425-440.
7. Shaw S.R. Isozymes: classification, frequency, and significance // Int. Rev. Cytol. - 1969. - Vol. 25. - P. 297-332.
8. Brown A.H., Clegg M.T., Isozyme assessment of plant genetic resources // Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res. - 1983. - Vol. 11. - P. 285-295.
9. Davis B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // Annals of the NY Academy of Science. -1964. - Vol. 121. - P. 404-427.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. -1976. - Vol. 72. - P. 248-254.
11. Meon S., Protein, esterase and peroxidase patterns of phytophthora isolates from Cocoa in Malaysia // J. Islamic Acad. Sci. - 1988. - Vol. 1. - # 2. - P. 154-158.
12. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. -1978. - Vol. 89. - #3. - P. 583-590.
13. Lefèvre F., Charrie A. Isozyme diversity within African manihot germplasm // Euphytica. - 1992. - Vol. 66. - P. 73-80.
14. Вейр Б. Анализ генетических данных. М.: Мир. 1995. - С. 132-135.

● References

1. Tyagi I.D., Variability and correlation studies in bottle gourd (*Lagenaria siceraria*). // Indian J. Hort. - 1972. - Vol. 29. - #2. - P. 219-222.
2. Chesnokov Yu.V. Molekulyarno-geneticheskie markery i ih ispol'zovanie v predselekcionnyh issledovaniyah. SPb: AFI, 2013. - 116 p.
3. Markert C.L., Moller F. Multiple forms of enzymes; tissue, ontogenic and species patterns. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1959. - Vol. 45. - P. 753-763.
4. Tanksley, S.D., Orton T.J., (eds) Isozymes in Plant Genetics and Breeding. North-Holland Publ. Co. Amsterdam. 1983.
5. Harris H. Enzyme polymorphism in man. // Proc. Roy. Soc. (London) -1966. - Vol. 164. - P. 298-310.
6. Bailey D.C., Isozymic variations and plant breeder rights. In: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds). Isozymes in plant genetics and breeding, Part A, Elsevier, Amsterdam. - 1983. - P. 425-440.
7. Shaw S.R. Isozymes: classification, frequency, and significance // Int. Rev. Cytol. - 1969. - Vol. 25. - P. 297-332.
8. Brown A.H., Clegg M.T., Isozyme assessment of plant genetic resources // Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res. - 1983. - Vol. 11. - P. 285-295.
9. Davis B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // Annals of the NY Academy of Science. -1964. - Vol. 121. - P. 404-427.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. -1976. - Vol. 72. - P. 248-254.
11. Meon S., Protein, esterase and peroxidase patterns of phytophthora isolates from Cocoa in Malaysia // J. Islamic Acad. Sci. - 1988. - Vol. 1. - # 2. - P. 154-158.
12. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. -1978. - Vol. 89. - #3. - P. 583-590.
13. Lefèvre F., Charrie A. Isozyme diversity within African manihot germplasm // Euphytica. -1992. - Vol. 66. - P. 73-80.
14. Weir B. Analiz geneticheskikh dannyh. M.: Mir. 1995. - P. 132-135.