

УДК 576.36.575.127.632.2

Л. В. Голышкина, к.б.н.

Н. Г. Красова, д.с.-х.н.

А. М. Галашева, к.с.-х.н.

Л. В. Голышкин, к.б.н.



ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, Россия, Орел, anna-galasheva@mail.ru

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ ЗАВЯЗИ ЯБЛОНИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ВЕСЕННЕГО ПЕРИОДА

Аннотация

У пяти сортов яблони из коллекции ВНИИСПК Антоновка обыкновенная, Имрус, Синап орловский, Рождественское, Юбиляр исследовали реакцию на воздействие отрицательной температуры $-3,5^{\circ}\text{C}$ – 1,5 час (май) на активность отдельных антиоксидантных ферментов и содержание свободного пролина, малонового диальдегида в течение весенней вегетации (май). Изучение проведено в динамике в завязях и плодах по пяти фазам от бутонов со слабо выдвинутыми лепестками до развивающегося плода весом до трех грамм.

Выявлено, что сорта различаются по активности ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и общей пероксидазы), содержанию свободного пролина, малонового диальдегида. Активность пероксидазы и каталазы при стрессе у изучаемых сортов по фазам проявилась разнонаправлено: у отдельных сортов - повышением активности в фазе выдвинутых бутонов, или понижением в фазе раскрытых цветков после оплодотворения, но резким повышением активности пероксидазы на этой стадии у сорта Юбиляр. Активность каталазы у всех сортов в развивающемся зародыше выше, чем в бутонах. Определение активности супероксиддисмутазы показало незначительные колебания у сортов под воздействием $-3,5^{\circ}\text{C}$ – 1,5 часа. Подобная картина проявлялась в содержании свободного пролина. Отмечено резкое уменьшение его концентрации в развивающемся плоде у всех сортов. Содержание малонового диальдегида изменялось в сторону повышения при стрессе в фазах окрашенных бутонов и раскрытых цветков после оплодотворения. Активно реагирует на температурный стресс триплоидный сорт Юбиляр. Таким образом, реакция систем, обеспечивающих защиту от действия отрицательной температуры у исследованных сортов яблони, была различной. Уровень активности ферментов и содержание изученных метаболитов зависел от сорта яблони и фазы развития завязи.

Ключевые слова: яблоня, гипотермия, пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутазы, пролин, малонового диальдегид

UDC 576.36.575.127.632.2

L. V. Golyshkina, candidate of biological sciences

N. G. Krasova, doctor of agricultural sciences

A. M. Galasheva, candidate of agricultural sciences

L. V. Golyshkin, candidate of biological sciences

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, Russia, Orel, anna-galasheva@mail.ru

**THE ACTIVITY CHANGE OF ANTIOXIDANT FERMENT SYSTEMS
AND PEROXIDE OXIDATION OF LIPIDS IN TISSUES OF THE DEVELOPING OVARY
UNDER THE EFFECT OF LOW TEMPERATURE IN SPRING**

Abstract

The low temperature effect (3,5°C below zero during 1,5 hour) on the activity of some antioxidant ferments and content of free proline, malone dialdehyde was studied in five apple varieties differing in ploidy from the VNIISPK collection: Antonovka Obyknovennaya, Imrus, Sinap Orlovsky, Rozhdestvenskoye and Yubilar during spring vegetation (in May). The study was fulfilled in dynamics in ovaries and fruits according to five phases from flower buds with weakly pulled out petals to a developing fruit, up to 3 gram in weight.

The investigations demonstrated that the varieties differed in ferment activity (superoxiddismutase, catalase and total peroxidase) and content of free proline, malone dialdehyde. The activity of peroxidase and catalase under the stress was displayed differently in studied varieties according to phases: in some varieties by higher activity at the phase of pulled out petals or lower activity at the phase of opened flowers after fertilization but sharp increase of peroxidase activity in Jubilar at the same phase. The catalase activity in all the studied varieties was higher in the developing embryos than in flower buds. The determination of superoxiddismutase activity showed insignificant variations within varieties under 3,5°C below zero during 1,5 hour. The same picture was displayed in the content of free proline. A sharp reduce of its concentration was noted in the developing fruit in all studied varieties. The content of malone dialdehyde changed towards the increase under the stress in phases of colored flower buds and opened flowers after fertilization. Triploid Jubilar actively responded to a temperature stress. Thus, the reaction of systems providing the protection against the effect of low temperatures in the studied apple varieties was different. The level of ferment activity and content of the studied metabolites depended on the apple variety and phase of ovary development.

Key words: apple, hypothermia, peroxidase, catalase, superoxiddismutase, proline, molone dialdehyde

Введение

Среди абиотических факторов, действующих на растение, особое место принадлежит температуре. Исследования показали, что особенности действия температурного фактора различной интенсивности на устойчивость растений проявляются в изменении направленности физиологических процессов, связанных с различными сторонами метаболизма клетки (Титов и др., 2006; Foyer, Noctor, 2005; Колупаев, Карпец, 2010; Кошкин, 2010). В настоящее время в научной литературе представлен большой экспериментальный материал по плодовым культурам по

отдельным видам устойчивости растений к экстремальным температурам (Гудковский и др., 2005; Леонченко и др., 2007; Красова и др., 2014). Решающая роль в адаптации растений к воздействию неблагоприятных факторов принадлежит защитным биохимическим системам, индуцируемым под влиянием этих факторов. Экспериментально установлено, что все без исключения стрессоры нарушают протекание физиологических процессов, что приводит к появлению активных форм кислорода (АФК), крайне отрицательно влияющих на клеточный метаболизм. Клетки защищаются от АФК с помощью антиоксидантов. Существуют два протекторных механизма защиты: ферментативный и неферментативный. Их синтез индуцируется в ответ на повышение уровня этих радикалов. К ферментам относятся пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза и другие ферменты; в другую группу входят различные органические низкомолекулярные соединения, как фенольные, аминокислоты и др. (Колупаев, Карпец, 2010; Кошкин, 2010). Поэтому поиск параметров для сравнения адаптационных возможностей плодовых культур представляет значительный интерес.

В связи с вышеизложенным в последнее время возник большой научный интерес к периоду цветения и оплодотворения, поскольку получение урожая у большинства сельскохозяйственных культур тесно связано с цветением. Неблагоприятные погодно-климатические условия вегетационного периода причиняют большой вред плодовым культурам, снижают их продуктивность. Особенно наносят вред садам периодически повторяющиеся весенние заморозки во время цветения. Поздневесенние заморозки могут повреждать бутоны, цветки, завязи. В работах последних лет выявлена реакция сортов яблони селекции ВНИИСПК на воздействие отрицательной температуры в естественных и лабораторных условиях при промораживании бутонов и цветков (Красова и др., 2014). В предыдущих работах также изучался мужской гаметофит - функциональное состояние пыльцы отдельных сортов яблони в период гибридизации при искусственном моделировании заморозков в лабораторных условиях (Гольшикина и др., 2012). Было выявлено, что пониженные температуры до -3°C в сформированных пыльниках больше влияют на степень жизнеспособности пыльцы, чем на ее фертильность. Различия в фертильности по сортам получены при действии температуры $-3,5^{\circ}\text{C}$ в бутонах на побегах.

В связи с этим для селекции важно знание комплекса физиолого-биохимических признаков, определяющих устойчивость плодовых в генеративной сфере, а также способности к адаптации. В научной литературе слабо освещена информация по изучению физиолого-биохимических процессов и механизмов, происходящих в плодовых растениях при адаптации к стрессу в женской генеративной сфере в процессе развития завязи и формирования плода (Красова и др., 2014; Abassi, Kushad, Endress, 1998; Braybrook, Harada, 2008; Du, Bramlage, 1994; Scalabrelli, Cinelli, 1991; Wang, Jiao, Faust, 1991). В то же время в связи с многолетним жизненным циклом для плодовых растений актуальны все типы стрессовых воздействий. Под воздействием низких температур, начиная от стадии редукционного деления, и на всех последующих этапах, включая цветение, уязвимость генеративных структур по мере их развития, как правило, повышается.

Таким образом, в решении вышестоящих проблем большое значение имеет изучение физиолого-биохимических процессов и механизмов, происходящих в генеративных органах и тканях плодовых растений при адаптации к стрессу.

Задачей настоящей работы явилось сравнительное изучение отрицательной температуры весеннего периода на ряд элементов антиоксидантной системы в развивающихся завязях различных сортов яблони.

Материал и методы

В экспериментах использовали 5 сортов яблони из коллекции ФБГНУ ВНИИСПК - Антоновка обыкновенная, Имрус, Синап орловский, Рождественское, Юбиляр в течение весенней вегетации. Физиолого-биохимические исследования проводили по следующим методикам: активность пероксидазы (ПЕР) определяли колориметрическим методом; активность каталазы – по количеству выделяющегося кислорода при разложении H_2O_2 (Ермаков, 1987). Содержание пролина определяли по методике (Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений, 2011). Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по накоплению малонового диальдегида (МДА), оценивали спектрофотометрическим методом по прописям (Стальная, Гаришвили, 1977); активность супероксиддисмутазы (СОД) с использованием фотореактора спектрофотометрическим методом (Гринблант, 2007). Все анализы проводили в 2-кратной биологической и аналитической повторностях. На рисунках приводятся средние значения. Исследование проведено в динамике в развивающихся завязях и плодах по стадиям:

I - бутоны со слабо выдвинутыми лепестками: завязь – 2 мм, вес – 30...35 мг;

II - бутоны выдвинутые с окрашенными лепестками: завязь – 3...4 мм, вес 45...55 мг;

III - раскрытые цветки, после опыления 3...4 дня, завязь – 5...6 мм;

IV - молодые плоды через 2 недели после опыления, вес плода – 0,35...0,75 г;

V - развивающийся плод, вес – 1,2...2,5 г;

На стадиях III...V для анализа брали среднюю часть завязи и плода.

На стадиях развития завязи I, II и III были проведены модельные опыты с использованием климокамеры «ESPEC» PSL-2 KPH с воздействием отрицательной температуры $-3,5^{\circ}C$ – 1,5 час (май 2014).

Результаты

Антиоксидантная система в развивающихся завязях и плодах

В индивидуальном развитии плодовых выделяют два периода: вегетативного и репродуктивного развития. Последний охватывает этапы роста и развития репродуктивных органов: цветков, семян, плодов. Опыление, рост пыльцевых трубок в направлении яйцеклетки и оплодотворение – главный этап образования плодов. С первой недели после оплодотворения в завязи за счет деления клеток усиленно разрастается околоплодник. В этот период завязь становится поставщиком многих ростовых веществ, поскольку здесь они образуются в больших количествах, чем в вегетативных органах.

В результате проведения экспериментов на различных сортах яблони был получен широкий спектр варьирования изучаемых показателей на разных стадиях развивающихся завязей. Исследования показали, что метаболическая активность антиоксидантной системы у изученных сортов яблони в ходе развития завязи и плода протекала с различной интенсивностью. Это связано с эмбриональными процессами от ранних стадий развития зародыша и эндосперма и более поздних этапов дифференциации тканей в зародыше, с формированием семени, накоплением запасных питательных веществ в плоде. Важную роль в поддержании клеточного метаболизма играет пролин. Известен факт высокого содержания свободного пролина в пыльце (Бритиков, 1975). В связи с этим возникает вопрос об уровне пролина в женской репродуктивной системе, в частности в завязи, с тканями которых пыльцевые зерна вступают во взаимодействие сразу же или после оплодотворения.

В завязях бутона перед опылением концентрация пролина достигала более 300 мкмоль/г сырой массы у сорта Синап орловский; у остальных сортов его содержание

колебалось в пределах 225...270 мкмоль/г, незначительно различаясь по сортам. В дальнейшем шло резкое снижение концентрации пролина до 46...64 мкмоль/г на стадии раскрытого цветка и незначительно повышалась на последующих стадиях роста плода (конец мая). При этом отмечено, что только у сорта Антоновка обыкновенная концентрация пролина в этот период значительно возросла до 200 мкмоль/г. Таким образом, пролин, являясь богатым источником азота, который освобождается при его распаде в процессе дыхания, возможно, используется для построения новых аминокислот, идущих на синтез белков в растущей завязи (рисунок 1).



Рисунок 1 – Содержание пролина (а) и активность пероксидазы (б) в развивающихся завязях яблоки во время цветения и формирования плода (май 2014)

Изучение общей активности антиоксидантного фермента пероксидазы в генеративных структурах различных сортов яблоки показало, что в период бутонизации, цветения и начального этапа роста плода у большинства сортов отмечалось значительное изменение ферментативной активности (рисунок 2).

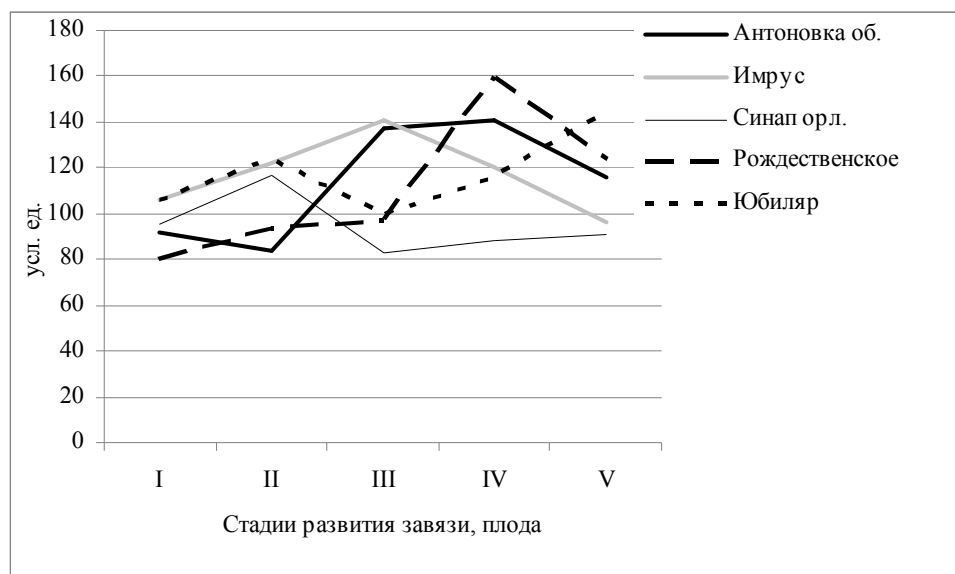


Рисунок 2 – Активность супероксиддисмутазы в семяпочках и зародышах яблоки во время цветения

По активности фермента сорта различались в завязях на стадии раскрытого цветка в период оплодотворения. Наиболее высокие показатели экстинции фермента в этот период отмечены у сорта Антоновка обыкновенная, наименьшие показатели у сорта Рождественское. После опыления и оплодотворения для растущих зародышей этот фермент, по-видимому, активно выступает как биокатализатор обменных процессов, возможно также в качестве одного из звеньев альтернативной дыхательной цепи. На последующих стадиях роста плода его активность резко снижается. Известно, что рост плода у яблони делится на 2 периода: деление клеток и растяжение клеток, что определяет темп роста плодов. Медленный рост после деления клеток представляет собой период быстрой лигнификации эндокарпа и замедленного роста мякоти, когда окислительные процессы снижены.

Активность ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы представлены на рисунках 2 и 3.

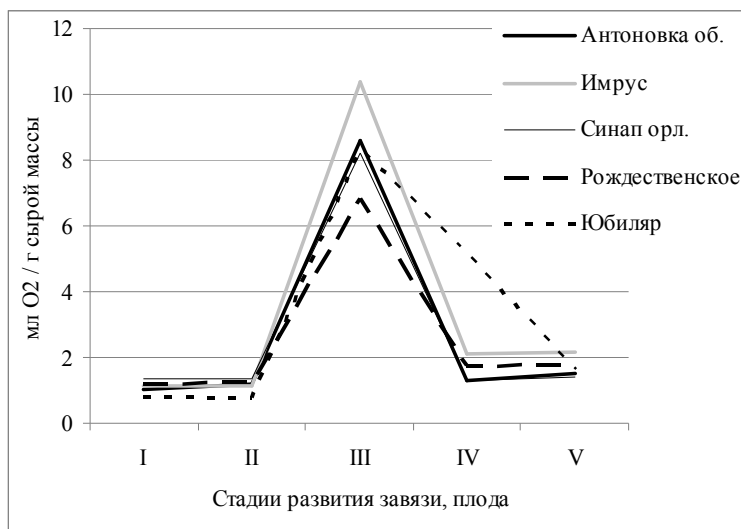


Рисунок 3 – Активность каталазы в семяпочках и зародышах яблони во время цветения

Как и у ферментной системы пероксидазы, наибольшая активность каталазы проявлялась на стадии раскрытых бутонов, сорта слабо различались по количественным показателям экстинции. Динамика изменения активности фермента по стадиям развития завязи у сортов была идентична, достигая максимума количественных показателей (до 10 мл O_2 /г сырой массы). Наоборот, динамика активности СОД по стадиям формирования плода различалась по сортам, особенно в период оплодотворения и начало роста плода (рисунок 3). Повышение активности фермента у таких сортов, как Антоновка обыкновенная, Рождественское, Имрус отмечено на стадиях 3...4 с понижением активности на стадии роста плода. Наименьшие показатели активности СОД в пределах 85...80 (усл. ед.) отмечены у сорта Синап орловский. При этом активизация СОД на данных стадиях является важным фактором предотвращения в них развития окислительного стресса, что подтверждает важную роль этого высокомолекулярного антиоксиданта.

Известно, что наиболее раннее проявление ответной реакции клетки на неблагоприятное состояние связано с повышением уровня перекисного окисления липидов (Колупаев, 2010). В случае развития завязи в оптимальных условиях такая реакция проявлялась слабо.

Результаты оценки интенсивности ПОЛ по продуктам, реагирующим с тиобарбитуровой кислотой представлены на рисунке 4.

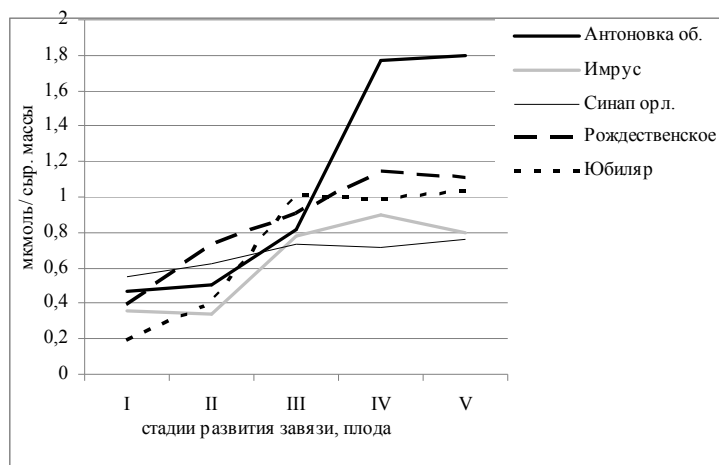


Рисунок 4 – Содержание малонового диальдегида в развивающихся завязях яблони во время цветения и формирования плода (май 2014)

Содержание МДА по стадиям развития завязи у всех изученных сортов находилось на одном уровне от 0,2 до 0,9 мкмоль/ г сырой массы в стадии 1...3, в дальнейшем по мере роста плода проявлялась тенденция в сторону повышения (0,7...1,7 мкмоль/ г). На последней стадии изучения (конец мая) выделяется сорт Антоновка обыкновенная, у которого количественное содержание МДА было несколько завышено, в среднем 1,8 мкмоль/ г по сравнению с другими сортами (0,8...1,1 мкмоль/ г).

Действие пониженной температуры на антиоксидантную систему в развивающихся завязях и плодах

Выполненные модельные опыты по действию отрицательной температуры $-3,5^{\circ}\text{C}$ – 1,5 часа во время цветения показали, что сорта различаются по активности ферментов (СОД, каталаза и пероксидаза), содержанию свободного пролина и малонового диальдегида. Пероксидаза использует перекись как окислитель множества соединений. Активность этого фермента при действии пониженной температуры во время цветения у изучаемых сортов проявилась разнонаправлено: повышением активности у сортов Антоновка обыкновенная, Синап орловский, Рождественское (стадия II), Юбиляр (стадия III), или в сторону понижения – сорта Синап орловский, Рождественское (стадия III).

Под влиянием пониженной температуры во время цветения активность каталазы в завязях исследованных сортов также изменялась по-разному.

Следует отметить, что активность фермента в контрольном варианте у всех сортов в развивающемся зародыше в 4...6 раз выше, чем в бутонах. В бутонах активность каталазы возрастала при стрессе у сорта Юбиляр (стадия II), а после опыления в развивающемся зародыше падала (стадия III). Отмечено повышение активности фермента на этой стадии у сорта Рождественское.

Как уже отмечалось выше, внутриклеточная защита растений от действия стрессовых факторов обусловлена ферментами-антиоксидантами, в частности СОД (Колупаев, 2010; Mittlerer, 2002). Определение активности СОД показало незначительное изменение активности фермента под воздействием стресса.

У сорта Юбиляр наблюдалось понижение активности фермента до 40% (стадия III). Известно, что увеличение активности СОД способствует накоплению активных форм кислорода. В данном случае кратковременный отрицательный температурный режим $-3,5^{\circ}\text{C}$ – 1,5 часа не вызвал резких изменений в метаболизме завязи. Подобная

картина проявлялась при определении содержания свободного пролина.

Отмечено резкое уменьшение содержания пролина в развивающемся зародыше у всех сортов (контроль, стадия III). Экспериментальные данные позволяют предположить, что свободный пролин может быть биохимическим фактором, стабилизирующим обмен веществ в местах своего запаса, в том числе в завязи, и понижение содержания пролина в завязях после опыления предопределено прогрессивным характером их последующего развития.

Разный уровень активности антиоксидантных ферментов оказал влияние и на перекисное окисление липидов. МДА является одним из основных продуктов ПОЛ, являясь важнейшим показателем устойчивости к стрессу (Кошкин, 2010; Титов и др., 2006). Определение содержания малонового диальдегида показало, что уровень МДА незначительно колебался в сторону повышения при стрессе у сортов Антоновка обыкновенная, Имрус (стадия II, III), у других оставался на уровне контроля, что показывает незначительные нарушения целостности клеток и снижение их функциональности при $-3,5^{\circ}\text{C}$ – 1,5 часа выражено в меньшей степени. Только сорт Юбиляр отличался значительным повышением содержания МДА на стадии окрашенных бутонов (опыт 2) (таблица 1).

Таблица 1 – Действие пониженной температуры на антиоксидантную систему в развивающихся завязях и плодах

Сорт	Стадия развития завязи	Содержание пролина, мкмоль/г сырой массы		Активность пероксидазы, условные единицы		Активность каталазы, мл O_2 / г сырой массы		Активность СОД, условные единицы		Активность малонового диальдегида, мкмоль/г сырой массы	
		контроль	$-3,5^{\circ}\text{C}$	контроль	$-3,5^{\circ}\text{C}$	контроль	$-3,5^{\circ}\text{C}$	контроль	$-3,5^{\circ}\text{C}$	контроль	$-3,5^{\circ}\text{C}$
Антоновка об.	I	116,8	146,6	3,25	-	1,02	-	92,04	-	0,471	-
	II	224,7	321,8	3,66	5,83	1,20	2,03	83,74	127,14	0,504	0,655
	III	62,1	137,4	6,32	7,30	8,57	8,25	136,85	113,36	0,816	0,957
Имрус	I	201,3	299,9	4,58	-	1,14	-	106,38	-	0,362	-
	II	259,4	234,7	5,16	4,75	1,16	1,90	122,5	127,65	0,335	0,437
	III	64,9	63,8	4,48	5,18	10,36	6,80	140,93	112,85	0,778	1,139
Синап орловский	I	137,5	150,4	3,33	-	1,36	-	95,34	-	0,546	-
	II	332,3	327,2	3,74	4,49	1,33	1,01	116,92	118,86	0,622	0,645
	III	46,3	68,0	4,99	4,58	8,20	5,30	82,72	98,04	0,732	0,846
Рождественское	I	281,4	151,5	3,42	-	1,18	-	80,22	-	0,394	-
	II	269,5	303,5	2,75	3,31	1,26	1,91	93,44	93,60	0,734	0,793
	III	49,2	90,0	2,91	2,36	6,80	10,90	97,02	81,87	0,906	0,905
Юбиляр	I	208,7	140,2	4,91	-	0,82	-	106,12	-	0,189	-
	II	262,1	302,2	5,33	5,74	0,76	4,21	124,08	130,21	0,404	1,586
	III	47,2	92,5	3,34	6,25	8,32	6,10	100,08	61,28	1,008	1,177

Таким образом, проведенные исследования показали, что даже в условиях коротковременной отрицательной температуры в развивающихся завязях изменялся метаболизм, на что указывают колебания в содержании свободного пролина, малонового диальдегида относительно контроля, а также изменения активности антиоксидантных ферментов. Однако существенных различий в активности ферментов и содержании изученных метаболитов не обнаружено. В условиях наших опытов наиболее уязвимы к действию температурного стресса у яблони бутоны с

окрашенными лепестками, раскрытые цветки (условно обозначенная в наших опытах, как I...III стадии в развитии завязи до формирования плода).

Обсуждение

Анализ полученных данных показывает, что сорта яблони неодинаково реагируют на отрицательную температуру весеннего периода. Выбранные нами показатели четко регистрируют изменения, происходящие в развивающихся генеративных структурах яблони. Метаболическая активность у изученных генотипов яблони протекает с различной интенсивностью, о чем свидетельствуют показатели содержания отдельных метаболитов (аминокислоты-пролина, МДА и ферментных систем). При этом функционирование отдельных звеньев антиоксидантных ферментных систем, в частности, пероксидазы при гипотермии может быть обусловлено увеличением концентрации ферментов или образованием конформационных изменений, что ранее было показано у яблони (Гольшкينا и др., 2010). Выделяются сорта активно реагирующие на стрессы абиотического фактора, как Антоновка обыкновенная, Рождественское, Имрус. Сорт Юбилар отличался значительным повышением содержания МДА на стадии окрашенных бутонов. Полученные результаты позволяют предположить, что активизация функционирования систем антиоксидантной защиты в стрессовых условиях является важным диагностическим показателем устойчивости плодовых растений от действия отрицательных температур. Показано, что в развивающихся завязях во время цветения при низких температурах изменялся метаболизм. Ткани побега относительно устойчивее к стрессу по сравнению с генеративными структурами. В конкретных условиях эксперимента выявлены разнонаправленные относительно контроля изменения содержания малонового диальдегида в развивающихся завязях, которые могут отражать различные фазы развития реакции на стресс в исследуемых органах и тканях.

Комплексное использование физиолого-биохимических показателей у плодовых растений позволит в дальнейшем проводить диагностику их состояния на ранних этапах воздействия стрессовых факторов, как интегральный показатель сортовой устойчивости, а также возможно проведение корректирующих мероприятий, позволяющих повысить устойчивость плодовых к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Литература

1. Бритиков Е.А. Биологическая роль пролина – М. : Наука, 1975. С.41-66.
2. Гольшкينا Л.В., Галашева А.М., Красова Н.Г., Гольшкин Л.В. Функциональная характеристика пыльцы сортов яблони при пониженных температурах весеннего периода // Плодоводство и ягодоводство России. Т.XXXIV. ч.1. 2012. С.162-169.
3. Гольшкينا Л.В., Красова Н.Г., Галашева А.М. Активность и полиморфизм некоторых ферментных систем тканей сортов яблони различной зимостойкости // Биологические основы садоводства и овощеводства (материалы межд. конф. с элементами научной школы для молодежи 22-25 сентября, 2010 г.). Мичуринск-наукоград РФ. 2010. С.101-106.
4. Гринблат А.И. Способ определения активности фермента. Патент на изобретение № 22939695. Опубликовано. Бюллетень изобретений. №5 от 20.02.2007.
5. Гудковский В.А., Каширская Н.Я., Цуканова Е.М. Стресс плодовых растений – Воронеж: Кварта, 2005. 128с.

6. Ермаков А.И. и др. Методы биохимического исследования растений // Л., 1987. 430 с.
7. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.Е. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров – Киев: Основа, 2010. 160 с.
8. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур: учебник – М.: Дрофа, 2010. 638 с.
9. Красова Н.Г., Ожерельева З.Е., Гольшклина Л.В., Макаркина М.А., Галашева А.М. Зимостойкость сортов яблони – Орел: ВНИИСПК, 2014. 184с.
10. Леонченко В.Г., Евсеева Р.П., Жбанова Т.А., Черенкова Т.А. Предварительный отбор перспективных генотипов плодовых растений на экологическую устойчивость и биохимическую ценность плодов // Методические рекомендации. – Мичуринск-Наукоград, 2007. 72 с.
11. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений – М. : БИНОМ. Лаб. знаний, 2011. 487 с.
12. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии; под ред. академика В. И. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. С. 66-67.
13. Титов А.В., Акимова Т.В., Уланова В.В., Топчнева Л.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур – М.: Наука, 2006. 144 с.
14. Abassi N. A., Kushad M. M., Endress A.G. Active oxygen- scavenging enzymes activities in developing apple flowers and fruits // Sci. Hort. 1998. V.74. P.183-194. DOI: 10.1016/S0304-4238(98)00077-6.
15. Braybrook S.A., Harada J.J. LECs go crazy in embryo development // Trends in Plant Science. 2008. Vol.13. P.624-630. DOI:10.1016/j.tplants.2008.09.008.
16. Du. Z. Bramlage, W.J., Superoxide dismutase activities in senescing apple fruit (*Malus domestica* Borkh.) // Food Sci. 1994. V.59. P.581-584. DOI:10.1111/j.1365-2621.1994.tb05567.x.
17. Foyer C.H., Noctor G. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses // Plant Cell. 2005. V.17. P.1866-1875. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.033589>.
18. Mittler R. Oxidative Stress, Antioxidants, and Stress Tolerance // Trends Plant Sci. 2002. V.7. P.405-409. DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9.
19. Scalabrelli, G., Viti, R., Cinelli, F., Changes in catalase activity and dormancy of apricot buds in response to chilling. // Acta Hort. 1991. V.50. P.267-274.
20. Wang, S. Y., Jiao, H.J., Faust, M., Changes in the activities of catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase in apple buds during bud break induced by thidiazuron. // J. Plant Growth Regul. 1991. V.10. P.33-39. DOI: 10.1007/BF02279308

References

1. Britikov E.A. (1975): Biological Importance of Proline. Moscow, Nauka: 41-66. (In Russian).
2. Golyshkina L.V., Galasheva A.M., Krasova N.G., Golyshkin L.V. (2012): Functional Characteristic of Apple Pollen under Lower Temperatures of Spring. *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii (Pomiculture and small fruits culture in Russia)*, **34**(1): 162-169. (In Russian).
3. Golyshkina L.V., Krasova N.G., Galasheva A.M. (2010): Activity and Polymorphism of Some Ferment Systems of Tissues of Apple Cultivars with Different Winter Hardiness. In: Proc. Intern. Conf. Biological basis of fruit and vegetable growing. Michurinsk-Naukograd: 101-106. (In Russian).

4. Grinblat A.I. (2007): A Method of Ferment Activity Determining. RF Patent 22939695, 20. February 2007. (In Russian).
5. Gudkovskiy V.A., Kashirskaya N.Ya., Tzukanova E.M. (2005): Stress of Fruit Plants. Voronezh, Kvarta. (In Russian).
6. Ermakov A.I. et al. (1987): Methods of Biochemical Investigation of Plants. Lenindrad, Agropromizdat. (In Russian).
7. Kolupaev Yu.E., Karpetz Yu.E. (2010): Formation of the Adaptive Responses of Plants on the Abiotic Stressors Effect. Kiev, Osnova. (In Russian).
8. Koshkin E.I. (2010): Physiology of the Resistance of Agricultural Crops: course. Moscow, Drofa. (In Russian).
9. Krasova N.G., Ozherelieva Z.E., Golyshkina L.V., Makarkina M.A., Galasheva A.M. (2014): Winter Hardiness of Apple Varieties. Orel, VNIISPK. (In Russian).
10. Leonchenko V.G., Evseyeva R.P., Zhbanova E.V., Cherenkova T.A. (2007): The Preliminary Selection of Promising Genotypes of Fruit Plants for Ecological Resistance and Biochemical Value of Fruit. Methodical recommendations. Michurinsk-Naukograd. (In Russian).
11. Molecular-Genetic and Biochemical Methods in the Contemporary Biology of Plants. (2011). Moscow, Binom. (In Russian).
12. Stal'naya I.D., Garishvili T.G. (1977): A Method of Malonodialdehyde Determining with the Help of Thiobarbituric Acid. In: Orekhovich V.I. (ed.): Contemporary methods in biochemistry. Moscow, Meditsina: 66-67. (In Russian).
13. Titov A.V., Akimova T.V., Ulanova V.V., Topchneva L.V. (2006): Plant Resistance at the Beginning of Unfavorable Temperature Effect. Moscow, Nauka. (In Russian).
14. Abassi N.A., Kushad M.M., Endress A.G. (1998): Active oxygen- scavenging enzymes activities in developing apple flowers and fruits. *Scientia Horticulturae*, **74**(3): 183-194. DOI: 10.1016/S0304-4238(98)00077-6.
15. Braybrook S.A., Harada J.J. (1994): LECs go crazy in embryo development. *Trends in Plant Science*, **13**: 624-630. DOI:10.1016/j.tplants.2008.09.008.
16. Du Z., Bramlage W.J. (1994). Superoxide dismutase activities in senescing apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of food science*, **59**(3): 581-584. DOI:10.1111/j.1365-2621.1994.tb05567.x.
17. Foyer C.H., Noctor G. (2005): Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, **17**(7): 1866-1875. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.033589>.
18. Mittler R. (2002): Oxidative Stress, Antioxidants, and Stress Tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**: 405-409. DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9.
19. Scalabrelli G., Viti R., Cinelli F. (1991): Changes in catalase activity and dormancy of apricot buds in response to chilling. *Acta Horticulturae*, **293**: 267-274. DOI: 10.17660/ActaHortic.1991.293.31
20. Wang S.Y., Jiao H.J., Faust M. (1991): Changes in the activities of catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase in apple buds during bud break induced by thidiazuron. *Journal of Plant Growth Regulation*, **10**(1-4): 33-39. DOI: 10.1007/BF02279308