

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА ПРИ СЕЛЕКЦИИ ПЛОДОВЫХ РАСТЕНИЙ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ОБЕЗВОЖИВАНИЮ И ГИПЕРТЕРМИИ

А. Н. Юшков*, Н. В. Борзых, Н. Н. Савельева, А. С. Земисов

УДК 535.015+535.37:577.355

Селекционно-генетический центр ФГБНУ ФНЦ им. И. В. Мичурина,
393770, Мичуринск Тамбовской обл., Россия; e-mail: cglm@rambler.ru

(Поступила 23 июля 2020)

Рассмотрена возможность использования визуализации флуоресценции хлорофилла в практической селекции яблони и абрикоса. Установлено существенное влияние водного дефицита и теплового шока на фотосинтетическую активность листьев, оцениваемую по их флуоресцентным изображениям. Наиболее чувствительный индикатор для выявления степени угнетения плодовых растений, индуцированного засухой, — эффективный квантовый выход фотосистемы II.

Ключевые слова: индукция флуоресценции хлорофилла, эффективный квантовый выход, визуализация, засухоустойчивость, яблоня, абрикос, селекция.

The possibility of using chlorophyll fluorescence visualization in practical apple and apricot breeding is considered. A significant influence of water deficit and heat shock on the photosynthetic activity of leaves, estimated from their fluorescent images, is found. It is confirmed that the most sensitive indicator for detecting the degree of drought-induced depression of fruit plants is the effective quantum yield of photosystem II.

Keywords: chlorophyll fluorescence induction, effective quantum yield, visualization, drought tolerance, apple, apricot, breeding.

Введение. В настоящее время в биологических исследованиях широко используется неразрушающий метод оценки функционального состояния растений посредством регистрации флуоресценции хлорофилла фотосинтезирующих объектов [1—3]. Индукция флуоресценции хлорофилла (ИФХ) характеризуется как ценный инструмент для исследования стрессоустойчивости растений, отражающий эффективность утилизации световой энергии фотосистемы II (ФС II), в том числе до визуального появления симптомов угнетения. В [4] отмечается наличие более 400000 источников по флуоресценции хлорофилла, большинство из них имеют значение для сельского хозяйства или науки о растениях. Предложено большое количество параметров флуоресценции, коррелирующих с функциональным состоянием растения. Обычно при оценке стрессоустойчивости растений акцент смещен на комбинацию нескольких информативных и взаимно не зависимых показателей, таких как соотношение переменной и максимальной флуоресценции, фотохимическое тушение, нефотохимическое тушение, относительное изменение минимального уровня флуоресценции [1, 5—9].

Фотосинтез — один из наиболее чувствительных к действию засухи биохимических процессов, поэтому известно много примеров успешного использования методов ИФХ для диагностики стресса, вызванного влиянием гипертермии или обезвоживания. Как правило, эти исследования проводились на травянистых (чаще однолетних) растениях [9—13], гораздо реже на древесных [14, 15]. Несмотря на отмеченные преимущества, в практической селекции плодовых растений на засухоустойчивость классические методы ИФХ используются относительно редко, вероятно, из-за низкой производительности или недостаточной чувствительности на ранних этапах воздействия.

CHLOROPHYLL FLUORESCENCE IMAGING IN FRUIT PLANT BREEDING FOR RESISTANCE TO DEHYDRATION AND HYPERTHERMIA

A. N. Jushkov*, N. V. Borzykh, N. N. Savelieva, A. S. Zemisov (Selection Genetic Center of I. V. Michurin, Federal Research Center, Michurinsk, Tambov region, 393770, Russia; e-mail: cglm@rambler.ru)

Существенному расширению возможностей исследователей по скринингу генотипов на стресс-толерантность способствовала разработка систем визуализации флуоресценции хлорофилла [16—18]. Флуоресцентная визуализация зарекомендовала себя как мощный инструмент фенотипирования растений, отображения физиологических явлений, влияющих на фотосинтетический аппарат и связанный с ним метаболизм [19—22]. Важнейшее преимущество этой платформы — учет пространственно-временных вариаций параметров флуоресценции, которые не могут быть обнаружены с помощью обычных точечных измерений [23—26]. В [27] сделан вывод, что измерения с использованием обычного хлорофилл-флуориметра могут привести к существенным ошибкам, поскольку интенсивность флуоресценции в частично поврежденных листьях сильно зависит от расположения точки измерения. Вероятно, этим объясняются сообщения о недостаточной чувствительности метода на ранних этапах водного стресса [28, 29].

Таким образом, использование систем флуоресцентной визуализации позволяет с принципиально новых позиций подойти к решению комплекса физиологических проблем по раннему выявлению стресс-индуцированных повреждений. Однако до настоящего времени отсутствует единое мнение о наиболее информативных параметрах для оценки засухоустойчивости и жаростойкости, а количество исследований, проведенных на многолетних древесных культурах, ограничено.

Цель настоящей работы — оценка возможности использования визуализации флуоресценции хлорофилла в практической селекции плодовых растений на засухоустойчивость и подбор оптимальных режимов и критериев, позволяющих надежно дифференцировать исходные генотипы в соответствии с их уровнем резистентности.

Эксперимент. Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте генетики и селекции плодовых растений Федерального научного центра им. И. В. Мичурина в 2017—2019 гг. В качестве растительного материала использованы листовые пластинки плодовых культур двух видов: абрикос обыкновенный (*Armeniaca vulgaris* Lam.) — сорта Ульянихинский, Круглый, элитная форма № 7, и яблоня домашняя (*Malus domestica* Borkh.) — сорта Антоновка обыкновенная, Былина, Гала, Бреберн. Опытные растения произрастали в условиях умеренно-континентального климата Тамбовской области. Возраст деревьев 14—16 лет. Агротехника — общепринятая для садов традиционного типа центральной зоны садоводства, полив не проводился. Схема посадки 6×3 м, сорта яблони привиты на полукарликовом подвое 54—118, абрикоса — на сеянцах дикорастущей алычи. Листья отделялись со средней части побегов центральной части кроны, помещались в пластиковые контейнеры и оперативно доставлялись в лабораторию (в течение ≤1 ч). Эксперименты проводились в июле и августе в условиях умеренного недостатка влаги, при этом видимое влияние других стрессовых факторов на растения в этот период отсутствовало.

Флуоресцентные исследования проводили с использованием хлорофилл-флуориметра IMAGING-PAM и программного обеспечения ImagingWin (Walz; Effeltrich, Германия) методом импульсной амплитудно-модулированной флуориметрии [29]. ИФХ регистрировалась в режиме “световой кривой”. На протяжении эксперимента объекты освещались модулированным с низкой частотой (1 Гц) измерительным светом низкой интенсивности (450 нм, 0,5 мкмоль/м²·с), не поддерживающим фотосинтез. Для оценки максимального квантового выхода ФС II (F_v/F_m) листья подвергали темновой адаптации в течение 30 мин. Адаптированные к темноте листовые пластинки первоначально подвергались воздействию насыщающего импульса (2700 мкмоль/м²·с) с последующим включением актиничного (фотохимически активного) света (450 нм, 185 мкмоль/м²·с). В дальнейшем на образцы периодически воздействовали насыщающими вспышками (2700 мкмоль/м²·с) с интервалом 20 с. Общее количество импульсов насыщения 12, общая длительность 720 мс (12 импульсов по 60 мс). Показатель F_v/F_m регистрировался после первой насыщающей вспышки. Параметры ИФХ визуализировались на экране и фиксировались в виде многоцветного изображения с условной цветовой шкалой. Для расчета параметров участки образца (AOI) выбирали визуально, предпочитая наиболее типичные области для общего изображения листа. Измерения флуоресценции проводили в трех повторениях для каждого варианта.

Анализировались следующие фотосинтетические параметры: максимальный квантовый выход фотохимических реакций ФС II (F_v/F_m); относительная скорость транспорта электронов ФС II (ETR); эффективный квантовый выход ФС II ($Y(II)$); квантовый выход регулируемой диссипации энергии ($Y(NPQ)$); квантовый выход нерегулируемой диссипации энергии ($Y(NO)$); нефотохимическое тушение, NPQ/4; коэффициент фотохимического тушения флуоресценции (qP); коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции (qN).

Параллельно определяли устойчивость генотипов к обезвоживанию и гипертермии с использованием стандартного весового метода, основанного на измерении массы листьев при моделировании увядания, насыщения, теплового шока (ТШ) [30]. Для этого использовали климатическую камеру Sanyo MLR-350 и биологический термостат ВТ 1200. Взвешивания проводили с точностью до 0.1 мг на аналитических весах A&D GH-200. Абсолютный сухой вес определяли путем высушивания в термостате при температуре +100 °С и взвешивания после достижения постоянной массы.

Оценка проводилась по компонентам водного режима: потеря воды (ПВ) при обезвоживании (2 ч при температуре +25 °С, освещение 135 мкмоль/м²·с); масса поглощенной воды после насыщения (листовые пластинки черешками помещались в воду на 0.5 ч при +25 °С, освещение 135 мкмоль/м²·с); ПВ после ТШ (0.5 ч при +50 °С; затем 1.5 ч при +25 °С, освещение 135 мкмоль/м²·с).

Полученные данные о параметрах ИФХ сравнивались со стандартной методикой оценки засухоустойчивости путем расчета коэффициентов корреляции. Измерения проводили в трех биологических и трех аналитических повторениях. Статистическую обработку данных осуществляли в программах Microsoft Excel 2010 с использованием стандартного пакета анализа данных и STATISTICA 6.0.

Ключевая задача исследования — распределение биологических объектов по степени устойчивости к недостатку влаги и высоким температурам на основе визуализации ИФХ и оценка соответствия данных результатам, полученным в стандартных тестах. При использовании стандартного (весового) метода установлено, что листовые пластинки изученных генотипов теряли при выветривании в течение 2 ч 8.4—27.1 % воды (табл. 1), в среднем по сортам 17.4 %. Максимальной водоудерживающей способностью обладали формы абрикоса Ульянихинский, Круглый (ПВ 8.4 и 14.7 %) и яблони Гала (ПВ 16.7 %). Более существенное снижение оводненности (17.5—27.1 %) наблюдалось у сортов яблони Антоновка обыкновенная, Былина, Бреберн, формы абрикоса № 7 (17.6 %). Проведена оценка способности листьев восстанавливать воду, потерянную во время моделирования высушивания. За исключением сортов яблони Бреберн и Былина, степень восстановления оводненности которых 72.2 и 95.3 %, изученные генотипы полностью восстанавливали утраченную в результате воздействия засухи воду. Моделирование ТШ позволило выявить существенные различия между изученными формами по устойчивости к гипертермии. Высокой водоудерживающей способностью характеризовался сорт абрикоса Ульянихинский (ПВ 21.7 %). Среди изученных сортов яблони максимальная устойчивость к ТШ отмечена у сорта Антоновка обыкновенная (ПВ 21.7 %). Формы абрикоса Круглый, № 7, сорта яблони Гала, Бреберн, Былина более чувствительны к гипертермии: ПВ листьями составила 34.9—45.6 %. В среднем по всем сортам ПВ 38.2 %. Таким образом, воздействие ТШ сильнее сказалось на растениях и вызывало более серьезную стрессовую нагрузку.

Оценка F_v/F_m показала отсутствие визуальных различий между контрольным и опытными образцами листьев изученных генотипов после моделирования обезвоживания (рис. 1, а, б). Исследованы четыре формы яблони и три формы абрикоса, различающиеся по эколого-географическому происхождению и полевой устойчивости к засухе. У всех изученных объектов низкая доступность воды не оказала на раннем этапе существенного воздействия на показатель F_v/F_m , наиболее практичный и часто используемый для диагностики стрессоров параметр.

Т а б л и ц а 1. Показатели водного режима исходных форм абрикоса и яблони

Сорт, форма	ПВ после высушивания, %	Степень восстановления оводненности после высушивания, %	ПВ после ТШ, %
<i>Яблоня</i>			
Гала	16.7	>100	34.9
Антоновка обыкновенная	17.5	>100	31.1
Былина	20.1	72.2	44.7
Бреберн	27.1	95.3	42.0
<i>Абрикос</i>			
Ульянихинский	8.4	>100	27.1
Круглый	14.8	>100	41.7
№7	17.6	>100	45.6

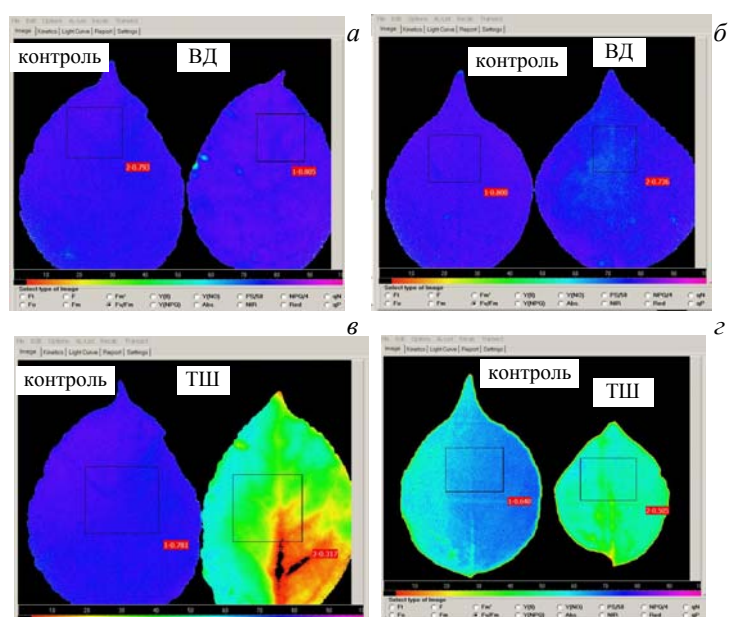


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции листьев сорта яблони Былина (а, в) и абрикоса Круглый (б, г) (F_v/F_m после моделирования водного дефицита (а, б) и теплового шока (в, г))

ТШ оказывает более существенное влияние на функционирование фотосинтетического аппарата растений, пострадавших от засухи. Видны различия между контрольными и опытными вариантами изображений (рис. 1, в, г). Следует отметить, что у яблони эти различия, как правило, выражены сильнее, чем у абрикоса — более засухоустойчивой культуры.

Для выявления параметров, наиболее пригодных для практического использования в качестве маркеров ранней реакции растений на обезвоживание и гипертермию, контрольные и опытные (моделирование водного дефицита (ВД) или ТШ) образцы попарно сравнивали в режиме “световой кривой”. Интересно, как коррелируют между собой показатели фотосинтетической активности (ФСА) для изучаемых объектов. Для выявления наиболее информативных переменных и исключения из дальнейшего анализа параметров с низкой факторной нагрузкой использован метод главных компонент (рис. 2). Наиболее значимы первые два фактора, которые описывали максимальную долю (93.34 %) вариативности данных (для факторизации матрицы использован критерий “каменистой осыпи”). Первый фактор положительно коррелировал с показателями ETR, $Y(NPQ)$, NPQ, qN , отрицательно — с $Y(II)$, qP , qL , и обуславливал 83.30 % дисперсии. Второй фактор (10.04 % дисперсии) положительно связан с квантовым выходом нерегулируемой диссипации энергии $Y(NO)$. В связи с этим в дальнейшем анализе рассматривали две переменных: $Y(II)$ как одну из наиболее коррелирующих с первым фактором и $Y(NO)$, определяющую вариативность второго фактора.

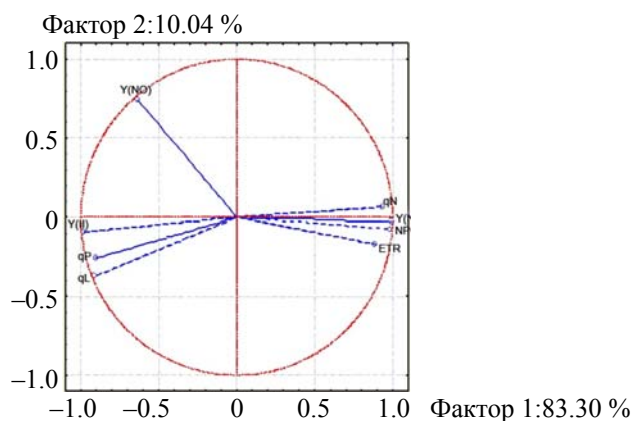


Рис. 2. Проекция изученных переменных с положительной (qN , ETR, $Y(NPQ)$, NPQ/4) и отрицательной корреляцией ($Y(II)$, $Y(NO)$, qP , qL) на факторную плоскость

В отличие от показателя F_v/F_m между флуоресцентными изображениями контрольных и опытных образцов листьев, сформированных на основе оценки эффективного квантового выхода ФС II ($Y(II)$), после моделирования обезвоживания наблюдались четкие визуальные различия (рис. 3, *а, б*). Более показательны различались флуоресцентные изображения листьев после ТШ, при этом различия хорошо заметны уже в начале эксперимента, после 3—4 насыщающих вспышек, а к его окончанию (после 12 импульсов) анализируемый показатель в опытном варианте близок к нулю. Как видно, яблоня сильнее пострадала от гипертермии, что закономерно с учетом различий в засухоустойчивости рассматриваемых культур. Аналогичные закономерности отмечены и по другим анализируемым образцам.

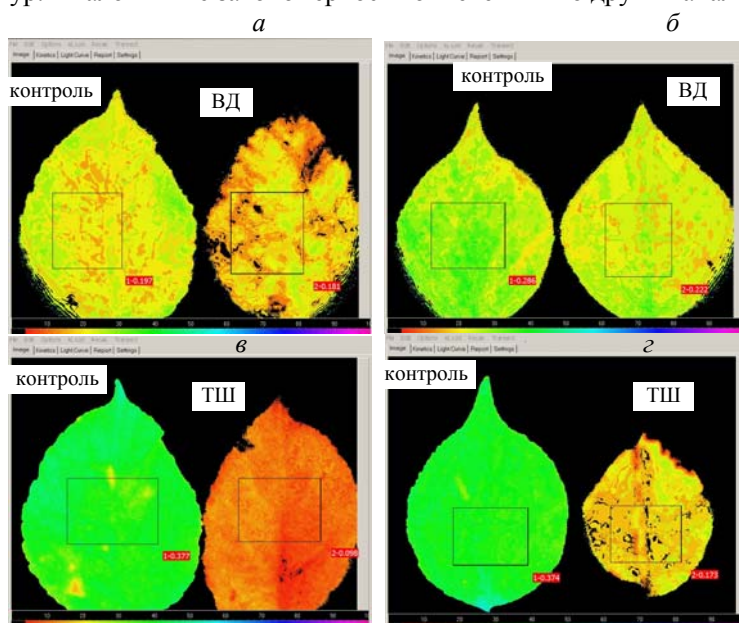


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции листьев сорта яблони Былина (*а, в*) и абрикоса Круглый (*б, з*) ($Y(II)$) после моделирования водного дефицита (*а, б*) и теплового шока (*в, з*)

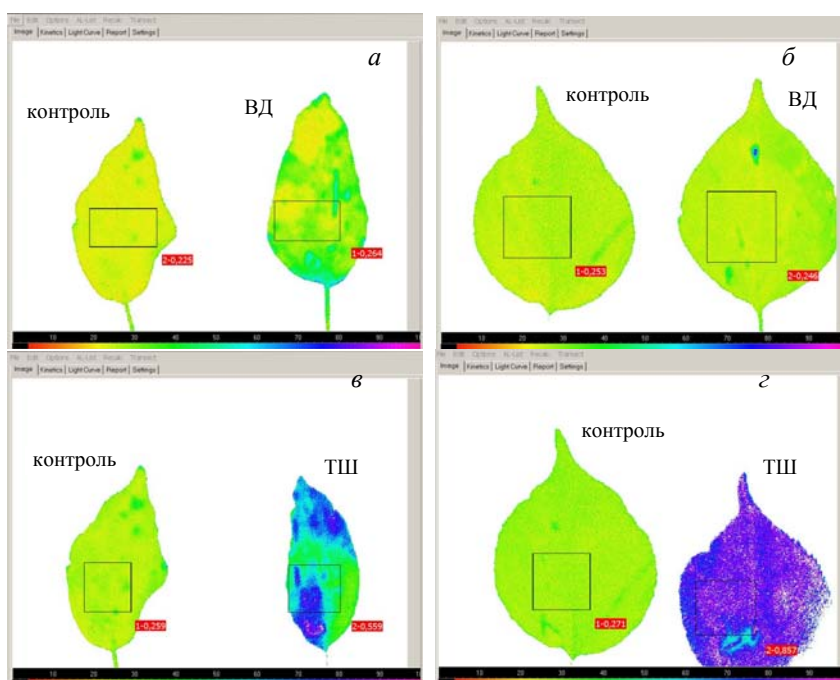


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции листьев сорта яблони Былина (*а, в*) и абрикоса Круглый (*б, з*) ($Y(NO)$) после моделирования водного дефицита (*а, б*) и теплового шока (*в, з*)

Менее наглядные результаты получены при рассмотрении динамики квантового выхода нерегулируемой диссипации энергии $Y(NO)$, отражающего эффективность защитных механизмов регулирования при избыточном излучении. Его повышение свидетельствует о нарушениях в функционировании фотосинтетического аппарата при его повреждении. Обезвоживание, как правило, не приводит к значительному повышению $Y(NO)$ у яблони и абрикоса (рис. 4, а, б). К окончанию измерений этот показатель существенно не отличался от контроля. Однако воздействие ТШ вызывало более серьезные отклонения $Y(NO)$ от контрольных значений как на начальном этапе опыта, так и в дальнейшем. Результаты флуоресцентной визуализации в этом варианте позволяли без труда различить контрольные и опытные листья.

Результаты и их обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о том, что флуоресцентная визуализация с успехом может использоваться в селекции плодовых растений для отбора более засухоустойчивых генотипов. В качестве индикатора толерантности генотипа после моделирования ВД или ТШ наиболее целесообразно использовать показатель $Y(II)$, чувствительность которого вполне достаточна для дифференциации контрольных и опытных вариантов в условиях, смоделированных по стандартной методике испытания сортов. Схожие результаты могут быть получены и при анализе других параметров, тесно коррелирующих с указанными в проведенных исследованиях (ETR, $Y(NPQ)$, NPQ и др.).

Оценка показателя F_v/F_m может быть проведена с использованием одного насыщающего импульса, что важно при необходимости оперативного скрининга большого числа генотипов. Однако визуализация этого параметра позволила выявить явные изменения в ФСА объектов только при воздействии ТШ. ВД как менее вредоносный стрессор оказывал на ФСА листьев меньшее влияние, поэтому флуоресцентные изображения до и после воздействия трудноразличимы. Меньшими информационными возможностями характеризовались изображения, сформированные методом “световой кривой” на основе анализа $Y(NO)$. Воздействие гипертермии приводило к существенному повышению этого показателя, что отражено на изображениях, обезвоживание не вызывало такие наглядные результаты.

Сопоставление динамики флуоресцентных параметров $Y(II)$ и $Y(NO)$ с показателями водного режима исследуемых растений при моделировании ВД и ТШ позволяет получить схожие результаты в реакциях конкретных генотипов на стрессоры. В качестве количественной меры различий ФСА до и после воздействия использовано евклидово расстояние между “световыми кривыми” контроля и опыта $Y(II)$ и $Y(NO)$. Выявлена достоверная корреляционная зависимость между показателем расстояния и ПВ при моделировании ВД и ТШ (табл. 2)

Т а б л и ц а 2. Корреляции между показателем евклидова расстояния контрольных и экспериментальных “световых кривых” (для $Y(II)$ и $Y(NO)$) и ПВ

Показатель	$Y(II)$	$Y(NO)$	ПВ
$Y(II)$	1		
$Y(NO)$	0.84	1	
ПВ	0.88	0.67	1

П р и м е ч а н и е. Критическое значение $p_{0.01} = 0.48$.

Результаты флуоресцентной визуализации хлорофилла хорошо соответствуют стандартной методике тестирования засухоустойчивости, наиболее чувствительным параметром является $Y(II)$, тесно коррелирующий с ПВ (коэффициент корреляции 0.86). Ранжирование сортов по убыванию вододерживающей способности и по евклидову расстоянию между контрольными и экспериментальными “световыми кривыми”, рассчитанному для $Y(II)$ и $Y(NO)$, как правило, совпадает.

Заключение. Визуализация флуоресценции хлорофилла может служить удобным инструментом для выявления степени угнетения плодовых растений, индуцированного засухой, на ранних этапах и для отбора наиболее выносливых генотипов. Важное преимущество этого метода — возможность одновременно сравнивать несколько растительных объектов с учетом их вероятной пространственной неоднородности. Моделирование водного дефицита по стандартной методике не оказывает существенного воздействия на показатель F_v/F_m , оцениваемый по флуоресцентным изображениям листьев. Использование для диагностики водного дефицита показателя $Y(NO)$ в режиме “световой кривой” недостаточно эффективно. Вместе с тем эти параметры позволяют различить контрольные и

экспериментальные образцы при моделировании теплового шока. Наиболее чувствительным индикатором для скрининга устойчивых к тепловому шоку и водному дефициту генотипов является показатель $Y(II)$, анализ которого проведен на основе оценки флуоресцентных изображений листьев, полученных в режиме “световой кривой”. Для количественной оценки уровня стресс-индуцированных изменений фотосинтетической активности ранжирования генотипов по степени устойчивости можно использовать показатель евклидова расстояния между “световыми кривыми” $Y(II)$ контроля и эксперимента, коррелирующий с потерей воды при моделировании водного дефицита и теплового шока.

- [1] **K. Maxwell, G. N. Johnson.** *J. Exp. Botany*, **51** (2000) 659—668
- [2] **N. R. Baker, E. Rosenqvist.** *J. Exp. Botany*, **55** (2004) 1607—1621
- [3] **M. H. Kalaji, V. N. Goltsev, K. Żuk-Golaszewska, M. Zivcak, M. Brestic.** Chlorophyll Fluorescence Understanding Crop Performance – Basics and Applications Edition 1st Edition First Published 2017 eBook Published 23 May 2017 Pub. location Boca Raton Imprint CRC Press, doi: <https://doi.org/10.1201/9781315153605>
- [4] **L. Guidi, M. Landi, C. Penella, A. Calatayud.** *Ann. Bot. (Roma)*, N 6 (2016) 5—22
- [5] **M. Kitajima, W. L. Butler.** *Biochim. Biophys. Acta*, **376** (1975) 105—115
- [6] **O. Bjorkman, B. Demmig.** *Planta*, N 170 (1987) 489—504
- [7] **B. Genty, J.-M. Briantais, N. R. Baker.** *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – General Subjects*, **990** (1989) 87—92
- [8] **K. Roháček.** *Photosynthetica*, **40**, N 1 (2002) 13—29
- [9] **J. Burke.** *Plant Physiology*, **143** (2007) 108—121
- [10] **A. Oukarroum, S. E. Madidi, G. Schansker.** *J. Exp. Botany*, **60** (2007) 438—446
- [11] **Y. Tang, X. Wen, Q. Lu, Z. Yang, Z. Cheng, C. Lu.** *Plant Physiology*, **143** (2007) 629—638
- [12] **E. Janka, O. Körner, E. Rosenqvist, C.-O. Ottosen.** *Plant Physiol. Biochem.*, **67** (2013) 87—94
- [13] **D. Sharma, S. Andersen, C. Ottosen, E. Rosenqvist.** *Plant Physiology*, **153** (2014) 298—298
- [14] **D. Epron.** *J. Exp. Botany*, **48** (1997) 1835—1841
- [15] **J. Flexas, M. J. Briantais, Z. Cerovic, H. Medrano, I. Moya.** *Remote Sens. Environ.*, **73** (2000) 283—270
- [16] **K. Oxborough.** *J. Exp. Botany*, **55** (2004) 1195—1205
- [17] **E. Gorbe, A. Calatayud.** *Scientia Horticulturae*, **138** (2012) 24—35
- [18] **J. M. Da Silva.** *Applied Photosynthesis, New Progress* (2016), doi: 10.5772/62391
- [19] **R. P. Barbagallo, K. Oxborough, K. E. Pallett, N. R. Baker.** *Plant Physiology*, **132** (2003) 485—493
- [20] **N. S. Woo, M. R. Badger, B. J. Pogson.** *Plant Methods*, **27**, N 4 (2008) 1746—1811
- [21] **D. J. Chen, K. Neumann, S. Friedel, B. Kilian, M. Chen, T. Altmann.** *Plant Sci.*, **26** (2014) 4636—4655, doi: 10.1105/tpc.114.129601
- [22] **J. Yao, D. Sun, H. Cen, H. Xu, H. Weng, F. Yuan, Y. He.** *Plant Sci.*, **9** (2018) 603, doi: 10.3389/fpls.2018.00603
- [23] **K. Omasa, K. L. Shimazaki, I. Aiga, W. Larcher, M. Onoe.** *Plant Physiology*, **84** (1987) 748—752
- [24] **P. A. Calatayud, E. Llovera, J. F. Bois, T. Lamaze.** *Photosynthetica*, **38** (2000) 97—104
- [25] **J. Bresson, F. Vasseur, M. Dautat, G. Koch, C. Granier, D. Vile.** *Plant Methods*, **11** (2015) 23, doi: 10.1186/s13007-015-0067-5
- [26] **B. Ehlert, D. K. Hinch.** *Plant Methods*, **4** (2008) 12
- [27] **M. Živčák, M. Brestič, K. Olšovská, P. Slamka.** *Plant Soil Environ.*, **54**, N 4 (2008) 133—139
- [28] **A. Н. Юшков, Н. В. Борзых, А. И. Бутенко.** *Журн. прикл. спектр.*, **83**, № 2 (2016) 323—328
- [29] **A. N. Yushkov, N. V. Borzykh, A. I. Butenko.** *J. Appl. Spectr.*, **83**, N 2 (2016) 302—306
- [30] **U. Schreiber.** In: *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Ed. G. C. Papageorgiou, Govindjee, Springer, Dordrecht (2004) 279—319
- [30] **В. Г. Леонченко, Р. П. Евсеева, Е. В. Жбанова, Т. А. Черенкова.** Предварительный отбор перспективных генотипов плодовых растений на экологическую устойчивость и биохимическую ценность плодов, Мичуринск (2007)