

КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИКРОКЛОНОВ ВЕЙГЕЛЫ ЦВЕТУЩЕЙ «ВАРИЕГАТА» В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО И МЕДНОГО СТРЕССОВ

Владислав Николаевич Калаев¹
Ольга Александровна Землянухина¹
Вера Сергеевна Воронина¹
Галина Григорьевна Соколенко²

¹Воронежский государственный университет

²Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I

Проведено изучение корреляционных связей ядрышковых характеристик и биохимических показателей микроклонов вейгелы цветущей «вариегата», пассируемых на контрольной и селективных средах в течение 120 суток *in vitro*. Отмечается снижение количества корреляционных связей ядрышковых характеристик и центров корреляционных плеяд в условиях культивирования растений *in vitro* на средах, содержащих сублетальные концентрации соли и ионов меди, что обусловлено адаптацией растений к стрессовым условиям и формированием нового адаптированного фенотипа вейгелы. Установлена положительная корреляция содержания общего белка в клетке с показателем «площадь поверхности одиночных ядрышек» ($r = 0,8895$). Ядрышковые характеристики являются показателем синтетической активности клеток апикальной меристемы корней вейгелы при пассировании *in vitro* и могут быть использованы в качестве «репера» содержания белка в клетке. Показана отрицательная корреляционная связь активности изоцитратлиазы и малатдегидрогеназы с площадью поверхности вакуолизированных ядрышек. Выявлена корреляционная связь между долями различных типов ядрышек и площадью их поверхности. Увеличение доли высокоактивных компактных ядрышек сопровождается возрастанием площади поверхности ядрышек у растений вейгелы на контрольной среде. Отмечается положительная корреляция между долями компактных ядрышек и ядрышек типа «кора-сердцевина». В условиях солевого стресса прослеживается отрицательная корреляционная связь между долями умеренно активных ядрышек типа «кора-сердцевина с вакуолью» и площадью поверхности этого типа ядрышек: чем больше доля вакуолизированных ядрышек, тем больше площадь их поверхности на среде с добавлением NaCl. При действии медного стресса *in vitro* снижается и изменяется направленность корреляционных связей ядрышковых показателей регенерантов, исчезает корреляционная связь между долями ядрышек «кора-сердцевина с вакуолью» и их площадью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: корреляция, ядрышковые характеристики, биохимические показатели, вейгела цветущая «вариегата», *in vitro*.

CORRELATION RELATIONSHIPS BETWEEN CYTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF MICROCLONES OF WEIGELA FLORIDA VARIEGATA IN THE CONDITIONS OF SALT AND COPPER STRESSES

Vladislav N. Kalaev¹
Olga A. Zemlyanukhina¹
Vera S. Voronina¹
Galina G. Sokolenko²

¹Voronezh State University

²Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great

The authors have studied the correlation relationships between the nucleolar characteristics and biochemical parameters of Weigela florida Variegata microclones passaged *in vitro* on the control and selective media for 120 days. There was a decrease in the number of correlation relationships between the nucleolar characteristics and the centers of correlation pleiades in the conditions of *in vitro* plant cultivation on media containing sublethal concentrations of salt and copper ions, which is due to the adaptation of plants to stress conditions and the formation of a new adapted phenotype of Weigela. A positive correlation was established between the total

protein content in the cell and the surface area of isolated nucleoli ($r = 0.8895$). The nucleolar characteristics are indicative of synthetic activity of cells of the apical meristem of *Weigela* roots in *in vitro* passaging and can be used as «reference standard» of protein content in the cell. The authors have shown a negative correlation of the activity of isocitrate lyase and malate dehydrogenase with the surface area of vacuolated nucleoli. The authors have also revealed a correlation between the proportion of different types of nucleoli and their surface area. An increase in the proportion of highly active compact nucleoli is accompanied by an increase in the surface area of nucleoli in *Weigela* plants on the control medium. There is a positive correlation between the proportion of compact nucleoli and «cortex-core» type nucleoli. In the conditions of salt stress there is a negative correlation between the proportion of moderately active nucleoli of the «cortex-core with vacuole» type and the surface area of these nucleoli: the larger the proportion of vacuolated nucleoli, the larger their surface area on the medium supplemented with NaCl. Under the influence of *in vitro* copper stress the direction of correlation relationships of nucleolar characteristics of regenerants changes and decreases, and the correlation relationship between the proportions of nucleoli of the «cortex-core with vacuole» type and their surface area disappears.

KEY WORDS: correlation, nucleolar characteristics, biochemical parameters, *Weigela florida* Variegata, *in vitro*.

Введение

Проблема устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам имеет огромное практическое и теоретическое значение в связи с усиливающейся деградацией почв. Почвенный покров урбанизированных территорий подвержен влиянию неблагоприятных факторов, среди которых имеют место засоление и загрязнение тяжелыми металлами [4, 6, 12, 15]. В связи с этим возрастает потребность в селекции соле-толерантных форм растений и отборе генотипов, устойчивых к негативному действию поллютантов, с последующим их использованием в практике создания зеленых насаждений парковых зон урбоэкосистем городов. Для получения устойчивых форм растений применяются методы биотехнологии [5, 7, 17, 25].

Большинство исследований направлено на создание высокоурожайных соле-устойчивых сортов сельскохозяйственных растений (сахарная свекла, рис, твердая и мягкая пшеница, ячмень и др.) [1, 9, 21, 26, 27], однако вопросы селекции солето-лерантных и устойчивых к ионам тяжелых металлов сортов декоративных кустарников с использованием методов биотехнологии остаются недостаточно проработанными.

В настоящее время можно считать доказанным, что изменение корреляций между признаками – такой же реальный факт, как изменение значений самих признаков. Система взаимосвязей между элементами (признаками) биологических систем весьма пластична. Перестройки биологических систем под воздействием ряда факторов не ограничиваются изменением отдельных признаков, но и отражаются на взаимосвязи между ними [19]. Обосновано, что наиболее высокую стабильность в эволюционных процессах имеют именно взаимосвязи признаков по сравнению с их абсолютными показателями.

Корреляции между элементами живых систем очень важны для определения их адаптивности и оказывают значительное влияние на дальнейшую эволюцию (потенциал изменчивости, определение темпа и направления дальнейших преобразований). Опубликованы результаты большого количества работ, посвященных изучению изменения корреляционных связей у организмов на разных уровнях организации живой материи в норме и при воздействиях разного генеза [19]. Однако оценка корреляционных связей ядрышковых и биохимических характеристик у растений, культивируемых *in vitro*, при селекционных мероприятиях, направленных на получение солеустойчивых микроклонов, ранее не проводилась.

Ядрышко является одним из локусов хромосомы, который активно функционирует в интерфазе клеточного цикла эукариот [24]. В некоторых хромосомах имеются участки, где тандемно повторены рибосомные гены. Кластеры рДНК занимают в хромосоме определенные районы, получившие название «ядрышкообразующие районы» или «ядрышковые организаторы». Сами хромосомы именуют «ядрышкообразующими хромосомами».

В процессах синтеза клеточных белков ядрышко – важнейшее звено, так как служит местом образования рибосомной РНК и сборки рибосом [13]. Функциональная активность ядрышка зависит от уровня экспрессии генов и служит показателем уровня метаболизма клетки в целом. Морфологические характеристики ядрышка (число, форма, размеры, микроскопическое строение) чрезвычайно лабильны, подвержены изменению в зависимости от состояния клетки [23].

Ранее было установлено, что ядрышковые показатели в тканях рыб объективно отражают различные метаболические процессы, в частности, выявлено наличие достоверной положительной корреляции между количеством ядрышек и содержанием белка в тканях яичника серебряного карася [10]. Однако связь ядрышковых характеристик и интенсивности белкового синтеза в клетках растений в культуре ткани недостаточно изучена, что обуславливает актуальность данной работы. Установление связей позволит говорить о том, что ядрышковые показатели являются «репером» биохимических характеристик растительных объектов.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований был выбран кустарник вейгела цветущая «вариегата» (*Weigela florida* «Variegata» Bunge A. DC.), произрастающий в ботаническом саду имени профессора Б.М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета.

Полученную методом микроклонального размножения линию растений [16] использовали для эксперимента по длительной адаптации микроклонов вейгелы цветущей «вариегата» к солевому и медному стрессу *in vitro* (рис. 1), описанному ранее [3].

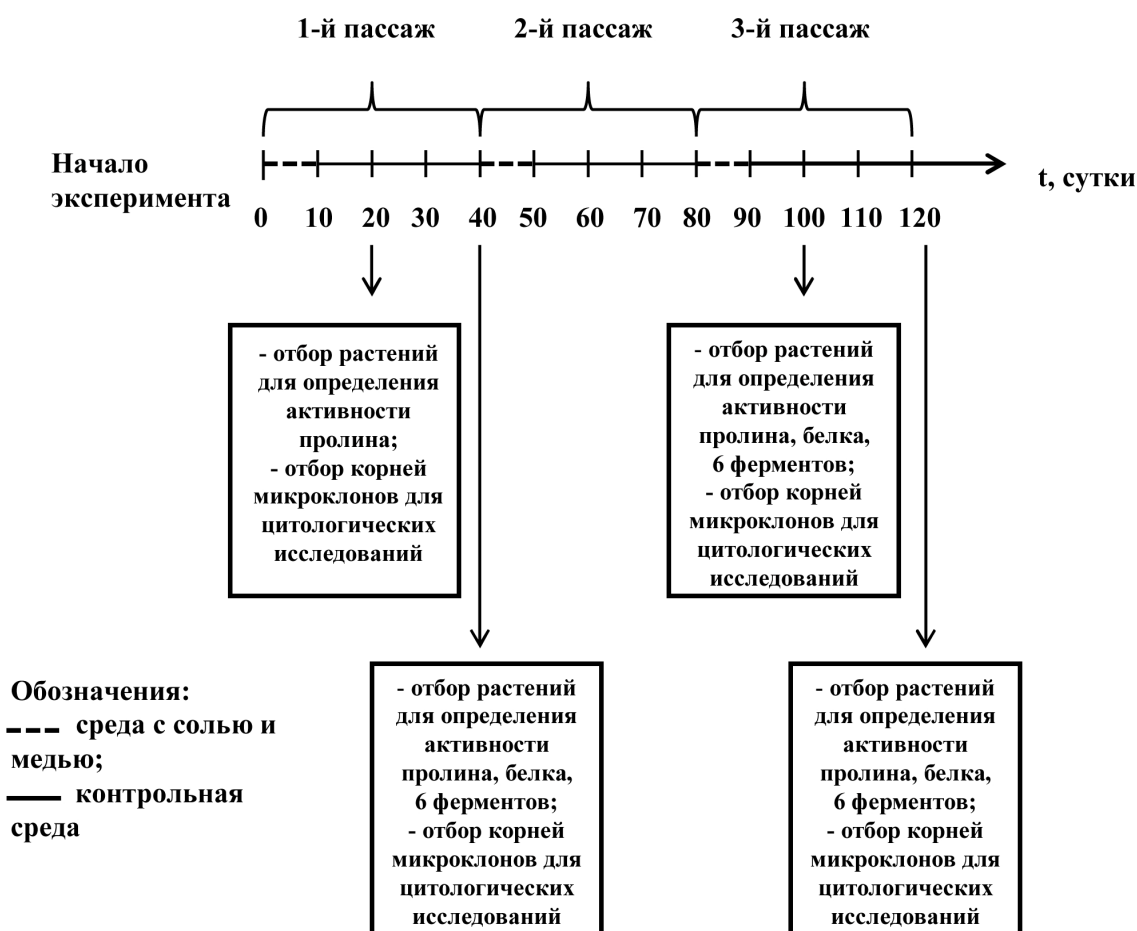


Рис. 1. Схема проведения эксперимента по адаптации микроклонов вейгелы цветущей «вариегата» к сублетальным концентрациям морской соли и ионов меди *in vitro*

Таблица 1. Ядрышковые характеристики клеток апикальной меристемы корней вейгелы цветущей «вариегата», культивируемой *in vitro*, в условиях солевого и медного стресса

Питательная среда														
Ядрышковые показатели		контроль				соль				медь				
		день эксперимента, сутки				день эксперимента, сутки				день эксперимента, сутки				
		10	40	90	120	10	40	90	120	10	40	90	120	
Доля клеток с разными ядрышками, %	K-C	38,5 ± 7,3	15,3 ± 3,1	3,6 ± 1,1	8,6 ± 2,0	31,9 ± 10,4 ^a	6,8 ± 1,6 ^a	1,5 ± 0,8	22,1 ± 4,9 ^a	52,2 ± 9,5	13,8 ± 2,3 ^b	0,3 ± 0,2 ^b	20,4 ± 7,6 ^a	
	K-C В	46,2 ± 9,9	82,9 ± 3,2	88,8 ± 2,9	91,2 ± 1,9	63,4 ± 9,7	75,4 ± 4,9 ^b	95,1 ± 1,7 ^a	74,8 ± 4,3 ^a	38,0 ± 12,2	84,9 ± 2,3 ^b	68,6 ± 7,8 ^a	78,6 ± 8,0 ^a	
	K	5,6 ± 2,2	0,4 ± 0,3			0,9 ± 0,6 ^a			1,4 ± 0,5	3,9 ± 1,4			0,4 ± 0,4	
	В	9,7 ± 2,0	1,4 ± 0,4	7,7 ± 3,1	0,2 ± 0,2	3,9 ± 3,2 ^a	17,8 ± 5,9 ^a	3,5 ± 1,1	1,8 ± 1,1	5,9 ± 2,7	1,4 ± 0,5	31,1 ± 8,0 ^a	0,6 ± 0,3	
Площадь поверхности ядрышек, мкм ²	K-C	84,5 ± 2,2	62,8 ± 2,7	56,8 ± 4,3	66,2 ± 3,1	47,1 ± 1,7 ^c	60,2 ± 3,0	40,0 ± 4,0 ^a	51,5 ± 1,5 ^c	44,6 ± 1,4 ^c	55,1 ± 2,1 ^a	37,1 ± 5,4 ^a	57,8 ± 1,6 ^a	
	K-C В	144,5 ± 2,9	91,1 ± 1,6	68,5 ± 1,0	77,8 ± 1,1	79,6 ± 1,5 ^c	85,7 ± 1,5 ^a	55,8 ± 0,9 ^c	71,5 ± 1,2 ^b	63,4 ± 1,4	78,1 ± 1,2 ^c	69,3 ± 7,0 ^c	77,1 ± 1,4	
	K	51,4 ± 4,2	10,7 ± 1,9			3,0 ± 1,1			29,0 ± 3,2	18,8 ± 2,0				
	В	127,9 ± 8,6	126,1 ± 23,5	76,4 ± 3,3	78,5 ± 0,1	34,0 ± 4,0 ^c	105,6 ± 2,7 ^c	45,1 ± 7,6 ^c	69,7 ± 7,7	39,1 ± 5,2	95,0 ± 7,9	48,6 ± 1,7 ^c	44,0 ± 8,2 ^a	
Гетероморфные парные ядрышки, %		78,2	81,3	66,7	100,0	80,0	81,0	100,0 ^a	72,2 ^a	76,4	93,8	50,0	94,0	
Гомоморфные парные ядрышки, %		21,8	18,7	33,3	0,00	20,0	19,0	0,00 ^a	27,8 ^a	23,6	6,2	50,0	6,0	

Обозначения: К-С – кора-сердцевина; К-С В – кора-сердцевина с вакуолью; К – компактные; В – вакуолизированные;
^a – различия с контролем достоверны при $P < 0,05$; ^b – различия с контролем достоверны при $P < 0,01$; ^c – различия с контролем достоверны при $P < 0,001$

Для анализа ядрышковых характеристик в разные сроки культивирования *in vitro* корешки растений вейгелы цветущей фиксировали в ацетоалкоголе. Их использовали для изготовления постоянных давленных препаратов. В качестве красителя использовали ацетогематоксилин [14].

Для мацерации корешки помещали в раствор 18% соляной кислоты и несколько секунд подогревали тигелек в пламени спиртовой горелки до температуры 60°. Далее корешки трижды промывали в растворе 45% уксусной кислоты и заливали ацетогематоксилином. В красителе материал выдерживали 30 минут при комнатной температуре. После окрашивания корешки промывали дистиллированной водой и готовили давленные микропрепараты. Для этого отделяли кончик корня, помещали на предметное стекло в каплю жидкости Гойера, накрывали покровным стеклом, легким постукиванием ручки препаровальной иглы распределяли клетки на микропрепарате в один слой.

Анализ полученных препаратов осуществляли на микроскопе Primo Star (Carl Zeiss, Jena) при увеличении $100 \times 1,5 \times 10$. На каждом препарате исследовали не менее 200 клеток. Измеряли диаметр ядрышек, определяли их морфофункциональный тип (компактные ядрышки, ядрышки типа «кора-сердцевина», вакуолизированные ядрышки, ядрышки типа «кора-сердцевина вакуолизированные»; два первых типа относятся к высокоактивным, остальные к умеренноактивным) согласно классификации Челидзе, Зацепиной [22]. Результаты исследования ядрышковых характеристик представлены в таблице 1.

Осуществляли анализ следующих ферментов:

- пероксидазы (ПО; КФ 1.11.1.7);
- глюкозо-6-Ф-дегидрогеназы (гл.-6-Ф-ДГ; КФ 1.1.1.49);
- NADH-дегидрогеназы (NADH-ДГ; КФ 1.6.99.1);
- изоцитратлиазы (ИЦЛ; КФ 4.1.3.1);
- малатдегидрогеназы (NAD-МДГ; КФ 1.1.1.37);
- малик энзима (NAD-МЭ; КФ 1.1.1.39) [9].

Для получения ферментативных препаратов растения вейгелы цветущей «вариегата» *in vitro* растирали со стеклянным песком в 0.1 М трис-НСl-буфере, pH 7.5 и центрифугировали в эппендорфах в течение 7 минут при 20000 g, +4°C, на центрифуге CM50 ELMi (Латвия). Надосадочные жидкости в процессе работы сохраняли в твердотельном термостате BIOSAN CH-100 (Латвия) при -3°C.

Таблица 2. Удельная активность ферментов в контрольных и опытных растениях вейгелы цветущей «вариегата» в первом и третьем пассажах [3]

Фермент	Пассаж	Контроль	Соль (NaCl)	Медь
Пероксидаза, ФЕ/мг	1	0,65 ± 0,13	0,94 ± 0,13 ^a	1,25 ± 0,13 ^{aq*}
	3	0,72 ± 0,04	0,97 ± 0,09 ^a	0,63 ± 0,17
Гл.-6-Ф-ДГ, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	14,56 ± 2,46 [*]	5,72 ± 1,06 ^a	3,92 ± 0,71 ^{a*}
	3	8,02 ± 3,11	8,56 ± 3,77	8,86 ± 2,48
NADH-ДГ, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	17,83 ± 2,01 [*]	24,62 ± 3,32 ^a	18,39 ± 3,63 ^q
	3	33,64 ± 5,56	27,38 ± 3,97	20,01 ± 5,14
Изоцитратлиаза, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	8,15 ± 0,90 [*]	9,09 ± 1,74 [*]	16,37 ± 1,81 ^{aq*}
	3	44,25 ± 8,64	40,87 ± 7,54	44,28 ± 11,43
МДГ, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	27,29 ± 2,95 [*]	24,18 ± 2,46 [*]	11,75 ± 2,50 ^{aq*}
	3	335,10 ± 39,47	237,10 ± 22,04 ^a	231,20 ± 21,69 ^a
Малик энзим, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	80,40 ± 11,48	81,09 ± 8,44 [*]	98,95 ± 7,01 [*]
	3	39,86 ± 3,13	15,25 ± 3,19 ^a	11,36 ± 2,61 ^a
Содержание общего белка, мг/мл	1	2,53 ± 0,35 [*]	2,09 ± 0,31 [*]	1,21 ± 0,25 ^{aq}
	3	1,01 ± 0,07	0,97 ± 0,09	0,93 ± 0,16
Изоцитратдегидрогеназа, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	0	0	0
	3	12,09 ± 6,12	9,17 ± 5,43	13,52 ± 6,02

Обозначения: * – различия с третьим пассажем достоверны при P < 0,05; ^a – различия с контролем достоверны при P < 0,05; ^q – различия с солью достоверны при P < 0,05

Расчет относительной общей активности проводили путем отнесения изменения оптической плотности к единице времени (мин) в 1 мл ферментативного препарата с учетом коэффициента молярной экстинкции.

Удельную активность рассчитывали, относя общую активность к содержанию белка в 1 мл ферментативной жидкости (ФЕ/мг).

Измерения проводили на спектрофотометре UNICO 2800 (США).

Результаты исследования удельной активности ферментов и содержания белка представлены в таблице 2.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ «Stadia». Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе Калаевой [11].

Корреляционные связи выявляли с использованием коэффициента корреляции Пирсона и рассчитывали критические значения коэффициента множественной корреляции при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Проведено исследование корреляционных связей ядрышковых характеристик микроклонов вейгелы цветущей «вариегата» при длительном культивировании *in vitro* в условиях солевого и медного стрессов с некоторыми биохимическими показателями регенерантов (табл. 3).

Таблица 3. Корреляционные связи ядрышковых характеристик растений вейгелы цветущей «вариегата», пассируемых *in vitro*, с биохимическими показателями

		Содержание белка в клетке	Активность малатдегидрогеназы	Активность изоцитратлиаза
Площадь поверхности ядрышек, мкм ²	Общая площадь поверхности ядрышек	0,8895		
	Площадь поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина с вакуолью»	0,9478		
	Площадь поверхности вакуолизированных ядрышек	0,8811	–0,8407	–0,8919
Активность изоцитратлиаза		–0,8678		
Активность малик энзима			–0,9055	
Критическое значение $r = 0,8116$				

Анализ приведенных в таблице результатов показал, что площадь поверхности одиночных ядрышек коррелирует с содержанием белка в клетке ($r = 0,8895$ при $P < 0,05$). Данный факт подтверждает ранее высказанное мнение о том, что ядрышковые характеристики являются показателем синтетической активности клетки [2, 10, 20, 23]. Следует также отметить сильные корреляционные связи содержания белка в ткани с такими ядрышковыми характеристиками, как площадь поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина с вакуолью» ($r = 0,9478$ при $P < 0,05$) и площадь поверхности вакуолизированных ядрышек ($r = 0,8811$ при $P < 0,05$).

Выявлена отрицательная корреляционная связь активности изоцитратлиаза и малатдегидрогеназы с площадью поверхности вакуолизированных ядрышек. Хотя данный тип ядрышек относится к слабо функционально активным [22], выявленные корреляции можно объяснить тем, что процесс формирования вакуолизированных ядрышек свидетельствует о накоплении в них гранулярного компонента (фактически готовых рибосом), участвующих непосредственно в биосинтезе белка, и обеспечивает высокое содержание белка в клетке. Таким образом, проведенные исследования еще раз подтверждают обоснованность использования показателя «площадь поверхности одиночных ядрышек» как «репера» содержания белка в клетке и возможность использования цитологических методов для оценки биохимических процессов в клетке.

Нами установлена отрицательная корреляция между активностью изоцитратлиазы и содержанием белка в изучаемых образцах ($r = -0,8678$ при $P < 0,05$). Данный факт можно объяснить тем, что в процессе онтогенеза растений в культуре ткани наблюдается снижение содержания растворимого белка клетки. Это может быть связано с интенсификацией ростовых процессов, приводящих к снижению как свободных аминокислот, так и общего белка. Цитоплазматическая форма изоцитратлиазы, функционирующая в цитозоле, а не в глиоксилатном цикле, возможно, участвует в реакции превращения глиоксилата в гликолат, что показано для гипоксических условий [8], а также в синтезе органических кислот, необходимых для роста и развития. Для более доказательного обнаружения активации изоцитратлиазы при одновременном снижении количества белка необходимо провести анализ на экспрессию соответствующих генов.

Отмечается отрицательная корреляционная связь активности малик энзима и малатдегидрогеназы ($r = -0,9055$ при $P < 0,05$). Для NAD-малик энзима существует, по-видимому, специфический механизм генной регуляции. Некоторые исследователи предполагают, что активность митохондриального малик энзима контролируется одновременно митохондриальным и ядерным геномами. При неблагоприятных условиях наблюдается активация синтеза белка в митохондриях с одновременным увеличением активности малатдегидрогеназы, находящейся в регуляторной связке с малик энзимом. По мере увеличения активности малатдегидрогеназы в суммарной активности малатдегидрогеназного комплекса доля активности малик энзима уменьшается.

Следует отметить, что корреляционные связи ядрышковых характеристик (площадь поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина», доля ядрышек типа «кора-сердцевина», доля ядрышек типа «кора-сердцевина с вакуолью», доля вакуолизированных ядрышек) с активностями изоцитратлиазы, NADH-дегидрогеназы, малатдегидрогеназы и малик энзима не выявлены.

Установлены корреляционные связи между долями различных типов ядрышек и площадью поверхности одиночных ядрышек, а также долями различных типов ядрышек друг с другом в контрольных и опытных образцах (табл. 4, 5, 6).

Таблица 4. Корреляционные связи ядрышковых характеристик растений вейгелы цветущей «вариегата», пассируемых *in vitro* на контрольной среде

Контроль		Доли клеток с разными типами ядрышек, %				Площадь ядрышек, мкм ²			
		К	К-С	К-С В	В	К	К-С	К-С В	В
Доли клеток с разными типами ядрышек, %	К-С	0,8292							
	К-С В	-0,8661	-0,9491						
	В			-0,5172					
Площадь ядрышек, мкм ²	К	0,6685	0,7306	-0,8023	0,5072				
	К-С		0,4808	-0,4294		0,6046			
	К-С В	0,4355	0,6932	-0,6701		0,7663	0,7397		
	В							0,4347	
	Общая		0,4632				0,6545	0,6900	0,7938
Критическое значение $r = 0,4003$									

Обозначения: К – компактные; К-С – кора-сердцевина; К-С В – кора-сердцевина с вакуолью; В – вакуолизированные

В частности, в клетках растений вейгелы цветущей «вариегата» на контрольной среде увеличение доли высокоактивных компактных ядрышек сопровождается возрастанием площади поверхности компактных ядрышек, ядрышек типа «кора-сердцевина с вакуолью» (соответственно $r = 0,6685$ и $r = 0,4355$ при $P < 0,05$).

Возрастание доли высокоактивных ядрышек типа «кора-сердцевина» сопровождается возрастанием общей площади поверхности ядрышек, площади поверхности

компактных ядрышек, площади поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина», площади поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина с вакуолью» (соответственно $r = 0,4632$, $r = 0,7306$, $r = 0,4808$ и $r = 0,6932$ при $P < 0,05$). Возрастание доли умеренно активных ядрышек типа «кора-сердцевина с вакуолью» связано с уменьшением площади поверхности компактных ядрышек, уменьшением площади поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина», уменьшением площади поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина с вакуолью», о чем свидетельствуют отрицательные корреляции этих показателей (соответственно $r = -0,8023$, $r = -0,4294$ и $r = -0,6701$ при $P < 0,05$). Доля редко встречающихся вакуолизированных ядрышек коррелирует только с площадью поверхности также редко встречающихся компактных ядрышек ($r = 0,5072$ при $P < 0,05$). Возрастание доли высокоактивных ядрышек в контроле коррелирует с возрастанием площади поверхности ядрышек. Увеличение доли умеренно активных ядрышек происходит одновременно со снижением площади поверхности ядрышек.

Следует отметить положительную корреляцию доли высокоактивных компактных ядрышек и доли ядрышек типа «кора-сердцевина» ($r = 0,8292$ при $P < 0,05$): чем выше доля одного типа ядрышек, тем выше и другого. Показана также отрицательная корреляция доли высокоактивных ядрышек типа «кора-сердцевина» и доли ядрышек типа «кора-сердцевина с вакуолью» ($r = -0,9491$ при $P < 0,05$). Приведенные данные корреляционного анализа свидетельствуют о том, что изменение долей высокоактивных ядрышек связано с изменением долей умеренно активных ядрышек.

На контрольной среде отмечается 21 значимая корреляционная связь (61%), на среде с добавлением ионов морской соли – 13 (36%). Результаты корреляционного анализа ядрышковых характеристик растений вейгелы цветущей «вариегата», пассируемых *in vitro* при солевом стрессе, представлены в таблице 5.

Таблица 5. Корреляционные связи ядрышковых характеристик растений вейгелы цветущей «вариегата», пассируемых *in vitro* на среде с добавлением ионов морской соли

Соль		Доли клеток с разными типами ядрышек, %				Площадь ядрышек, мкм ²			
		К	К-С	К-С В	В	К	К-С	К-С В	В
Доли клеток с разными типами ядрышек, %	К-С	0,6048							
	К-С В	-0,4801	-0,7753						
	В								
Площадь ядрышек, мкм ²	К	0,9371	0,5492	-0,4529					
	К-С								
	К-С В			-0,4612	0,4409				
	В				0,7709			0,6969	
	Общая				0,5427			0,6838	0,7295
Критическое значение $r = 0,4287$									

Обозначения: К – компактные; К-С – кора-сердцевина; К-С В – кора-сердцевина с вакуолью; В – вакуолизированные

В условиях солевого стресса у растений сохраняется отрицательная корреляционная связь между долей ядрышек «кора-сердцевина с вакуолью» и площадью поверхности этого типа ядрышек ($r = -0,4612$ при $P < 0,05$). Высокий процент умеренноактивных ядрышек сопровождается снижением их площади поверхности. Обратная тенденция обнаружена у вакуолизированных ядрышек. Прослеживается положительная корреляция между долями вакуолизированных ядрышек и общей площадью поверхности ядрышек, площадью поверхности вакуолизированных ядрышек, площадью поверхности ядрышек

типа «кора-сердцевина с вакуолью» (соответственно $r = 0,5427$, $r = 0,7709$ и $r = 0,4409$ при $P < 0,05$). Значимых корреляций долей высокоактивных ядрышек с площадью поверхности не выявлено. Доля высокоактивных ядрышек «кора-сердцевина» отрицательно коррелирует с долей умеренноактивных ядрышек «кора-сердцевина с вакуолью» ($r = -0,7753$ при $P < 0,05$). При более сильном медном стрессе число корреляционных связей снижается до 10 (27%) (табл. 6).

Таблица 6. Корреляционные связи ядрышковых характеристик растений вейгелы цветущей «вариегата», пассируемых *in vitro* на среде с добавлением ионов меди

Медь		Доли клеток с разными типами ядрышек, %				Площадь ядрышек, мкм ²			
		К	К-С	К-С В	В	К	К-С	К-С В	В
Доли клеток с разными типами ядрышек, %	К-С	0,7992							
	К-С В	-0,7418	-0,7294						
	В								
Площадь ядрышек, мкм ²	К	0,6751	0,8195	-0,5896					
	К-С		0,5673		-0,6787				
	К-С В								
	В								
	Общая							0,6199	0,5626
Критическое значение $r = 0,4091$									

Обозначения: К – компактные; К-С – кора-сердцевина; К-С В – кора-сердцевина с вакуолью; В – вакуолизированные

Таким образом, можно говорить, что в условиях солевого и медного стресса количество корреляционных связей снижается, хотя ранее при стрессе Н.С. Ростовской [18] было показано на морфологическом уровне возрастание количества корреляционных связей.

Снижение количества корреляционных связей ядрышковых характеристик, с одной стороны, можно объяснить дискоординацией связей в организме на клеточном уровне в условиях стресса, в отличие от увеличения их координированности на морфологическом уровне. С другой стороны (что более вероятно), первоначальная реакция системы взаимосвязей на внешние воздействия состоит в более или менее пропорциональном изменении уровня большинства связей, т.е. при ухудшении условий – в повышении связей числа внутри корреляционной плеяды, усилению корреляций между признаками. Более существенные изменения среды, выходящие за пределы адаптивной нормы реакции, приводят к перегруппировке признаков в корреляционных плеядах, смене признаков-индикаторов, т.е. существенным изменениям структуры взаимосвязей [19].

Анализ плеяд (рис. 2, 3, 4) показал, что в контроле отмечается 7 центров (% доли клеток с ядрышками типа «кора-сердцевина», «кора-сердцевина вакуолизированные», компактные и площади поверхности ядрышек «кора-сердцевина вакуолизированные», компактные, общей площадью поверхности ядрышек). При воздействии стресс-факторов количество центров может как увеличиваться до 8 (% доли клеток с ядрышками типа «кора-сердцевина», «кора-сердцевина вакуолизированные», компактные, вакуолизированные и площади поверхности ядрышек «кора-сердцевина вакуолизированные», вакуолизированные, компактные, общей площадью поверхности ядрышек) (при солевом стрессе), так и сокращаться до 4 (% доли клеток с ядрышками типа «кора-сердцевина», «кора-сердцевина вакуолизированные», компактные и площади поверхности компактных ядрышек) (при медном стрессе).

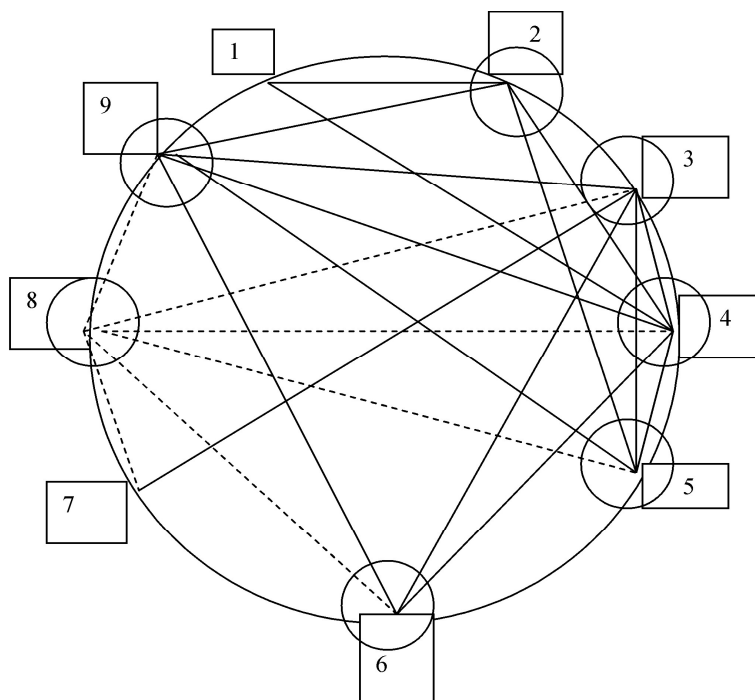


Рис. 2. Корреляционная плеяда ядрышковых характеристик клеток апикальной меристемы корней микроклонов вейгелы цветущей «вариегата», пассируемой на контрольной питательной среде. Обозначения: сплошной линией – положительные корреляции; пунктирной линией – отрицательные корреляции; маленькими кружками – центры плеяд; 1 – площадь поверхности вакуолизированных ядрышек, мкм^2 ; 2 – общая площадь поверхности ядрышек, мкм^2 ; 3 – площадь поверхности компактных ядрышек, мкм^2 ; 4 – площадь поверхности ядрышек «кора-сердцевина вакуолизированные», мкм^2 ; 5 – площадь поверхности ядрышек «кора-сердцевина», мкм^2 ; 6 – доля клеток с компактными ядрышками, %; 7 – доля клеток с вакуолизированными ядрышками, %; 8 – доля клеток с ядрышками «кора-сердцевина вакуолизированные», %; 9 – доля клеток с ядрышками «кора-сердцевина», %

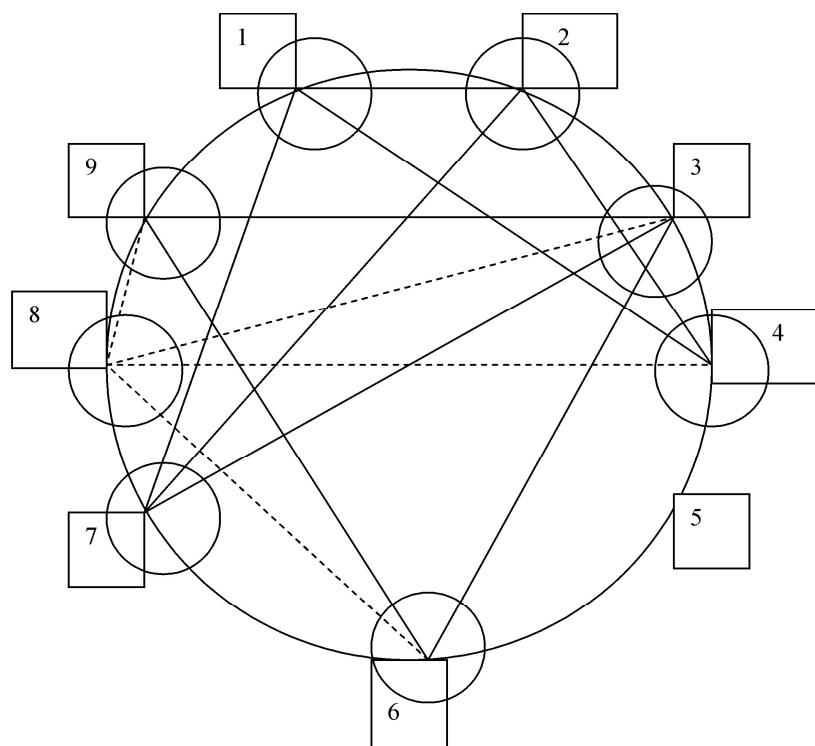


Рис. 3. Корреляционная плеяда ядрышковых характеристик клеток апикальной меристемы корней микроклонов вейгелы цветущей «вариегата», пассируемой на питательной среде с ионами морской соли. Обозначения те же, что и на рисунке 2

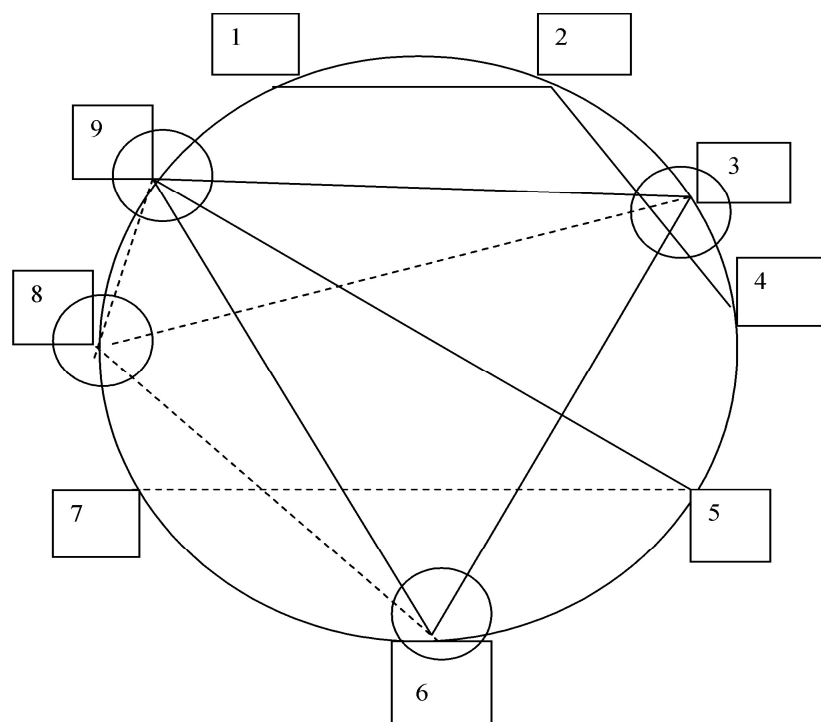


Рис. 4. Корреляционная плеяда ядрышковых характеристик клеток апикальной меристемы корней микроклонов ветгелы цветущей «вариегата», пассируемой на питательной среде с ионами меди. Обозначения те же, что и на рисунке 2

На основании сохранения 4 индикаторных показателей при изучении микроклонов, культивируемых на среде с ионами меди, можно сделать вывод о том, что наиболее жесткие связи между ядрышковыми характеристиками связаны с изменением типов ядрышек, а не их площади поверхности. Данный факт можно интерпретировать как доказательство того, что большая стабильность синтетических процессов в культуре *in vitro* у растений при селекции на устойчивость к стресс-факторам достигается не за счет простого увеличения функциональной активности ядрышка, а за счет их перехода на новый уровень, обусловленный сменой типа ядрышка.

Считается, что при эволюционных преобразованиях онтогенеза наиболее вероятно ослабление первоначально сильных связей, что позволяет освободившемуся признаку стать самостоятельным субъектом естественного отбора [28]. Повышение силы связей приводит не только к общему возрастанию интегрированности системы, но и к объединению всех частей (плеяд). Обратное направление – дезинтеграция системы, ослабление связей только у части элементов может быть результатом стабилизирующего отбора [19].

На основании анализа корреляционных связей между ядрышковыми характеристиками клеток апикальной меристемы корней микроклонов ветгелы возможно говорить о процессе адаптации растений к стрессовым условиям, вызванным повышенным содержанием солей и ионов меди в питательной среде, и формировании нового адаптированного фенотипа ветгелы. Судя по изменению формирования корреляционных плеяд возможно говорить о разных механизмах адаптации к воздействию повышенных концентраций соли и ионов меди у микроклонов ветгелы. Данный вывод подтверждает результаты ранее выполненных исследований биохимических характеристик, также показавших адаптацию микроклонов ветгелы при длительном пассировании к повышенному содержанию солей и ионов меди в питательной среде [3]. В отличие от условий солевого стресса, при медь-индуцированном стрессе отмечается положительная корреляция доли высокоактивных ядрышек типа «кора-сердцевина» и площади поверхности данного типа ядрышек ($r = 0,5673$ при $P < 0,05$), и исчезает корреляция доли

ядрышек типа «кора-сердцевина с вакуолью» с их площадью, отмечается отрицательная корреляционная связь доли вакуолизированных ядрышек и площади поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина» ($r = -0,6787$ при $P < 0,05$).

Выводы

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают, что число и направленность корреляционных связей ядрышковых характеристик вейгелы цветущей «вариегата» в условиях солевого и медного стрессов *in vitro* изменяются.

Снижение количества корреляционных связей ядрышковых характеристик и центров корреляционных плеяд в условиях культивирования растений *in vitro* на средах, содержащих сублетальные концентрации солей и ионов меди, можно объяснить адаптацией растений к стрессовым условиям и формированием нового адаптированного фенотипа вейгелы, причем механизмы адаптации на субклеточном уровне будут различными.

Данный вывод подтверждает результаты ранее выполненных исследований биохимических характеристик [3], также показавших адаптацию микроклонов вейгелы при длительном пассировании к повышенному содержанию солей и ионов меди в питательной среде. При воздействии стрессовых факторов число взаимосвязей ядрышковых характеристик снижается в 2 раза.

Прослеживается корреляционная связь доли высокоактивных ядрышек с их площадью поверхности (чем больше высокоактивных ядрышек, тем больше их площадь поверхности). Для умеренноактивных имеется 2 разные тенденции: возрастание доли ядрышек типа «кора-сердцевина с вакуолью» приводит к уменьшению их площади поверхности, для вакуолизированных ядрышек отмечается противоположная тенденция. Изменчивость ядрышковых характеристик (размер, морфофункциональный тип ядрышек) клеток апикальной меристемы корней микроклонов вейгелы цветущей «вариегата» при культивировании *in vitro* можно использовать для оценки процессов, происходящих на биохимическом уровне.

Библиографический список

1. Андреева Ю.А. Солеустойчивость сортов яровой мягкой пшеницы в степной зоне Северного Казахстана : дис. ... канд. биол. наук : 06.01.05 / Ю.А. Андреева. – Тюмень, 2015. – 127 с.
2. Архипчук В.В. Использование ядрышковых характеристик в биотестировании / В.В. Архипчук // Цитология и генетика. – 1995. – Т. 29, № 3. – С. 6–12.
3. Биохимическая адаптация микроклонов вейгелы цветущей «вариегата» *Weigela florida* «Variegata» Bunge A.D.C. к соле- и медьиндуцированным стрессам / О.А. Землянухина [и др.] // Сибирский лесной журнал. – 2017. – № 6. – С. 89–101.
4. Васильев П.А. Экспериментальное исследование засоления и осоленцевания урбаноземов при использовании противогололедных реагентов на примере Северного административного округа г. Москвы / П.А. Васильев // Проблемы и перспективы современного эффективного землепользования: сб. науч. трудов. – Москва : ГУЗ, 2013. – С. 141–147.
5. Вечернина М.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений: монография / М.А. Вечернина. – Барнаул: Изд-во Алтайского государственного университета, 2004. – 202 с.
6. Воронеж: среда обитания и зоны экологического риска / С.А. Куропат, С.А. Епринцев, О.В. Клепиков [и др.]. – Воронеж : Истоки, 2010. – 207 с.
7. Гладков Е.А. Получение растений полевицы побегоносной с комплексной устойчивостью к тяжелым металлам и засолению методами клеточной селекции / Е.А. Гладков // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – № 6. – С. 85–88.
8. Дьяченко Е.В. Физико-химические свойства и регуляция экспрессии изоферментов изоцитратлиазы в разных органах кукурузы: дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04 / Е.В. Дьяченко. – Воронеж, 2009. – 151 с.
9. Землянухин А.А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений: учебное пособие / А.А. Землянухин, Л.А. Землянухин. – Воронеж : Изд-во ВГУ, 1996. – 188 с.
10. Использование морфологических характеристик ядрышек для оценки метаболических процессов в организме рыб / В.Д. Романенко [и др.] // Доклады Академии наук. – 1992. – Т. 326, № 3. – С. 562–565.
11. Калаева Е.А. Теоретические основы и практическое применение математической статистики в биологических исследованиях и образовании : учебник / Е.А. Калаева, В.Г. Артюхов, В.Н. Калаев; Воронежский государственный университет. – Воронеж : Издательский дом ВГУ, 2016. – 284 с.
12. Капралова О.А. Влияние урбанизации на эколого-биологические свойства почв г. Ростова-на-Дону / О.А. Капралова // Инженерный вестник Дона. – 2011. – Т. 18, № 4. – С. 326–331.
13. Кикнадзе И.И. Функциональная организация хромосом / И.И. Кикнадзе. – Ленинград : Наука, Ленинг. отд., 1972. – 211 с.

14. Муратова Е.Н. Методики окрашивания ядрышек для кариологического анализа хвойных / Е.Н. Муратова // Ботанический журнал. – 1995. – Т. 80, № 2. – С. 82–86.
15. Никифорова Е.М. Экологические последствия применения противогололедных реагентов для почв Восточного округа Москвы / Е.М. Никифорова, Н.Е. Кошелева, Т.С. Хайбрахманов // Вестник Московского университета. Серия 5. География. – 2016. – № 3. – С. 40–49.
16. Пат. 2 634 431 Российская Федерация, МПК A01H 4/00; A01G 7/00 (2006.01). Способ микроклонального размножения и получения посадочного материала вейгелы приятной (*Weigela suavis* (Kom.) L.H. Bailey) и вейгелы цветущей «Вариегата» (*Weigela florida* «Variegata» Bunge A.D.C.) / Землянухина О.А., Калаев В.Н., Воронина В.С.; заявитель и патентообладатель Воронежский государственный университет. – № 2016117643; заявл. 04.05.16, опубл. 30.10.17, Бюл. № 31. – 10 с.
17. Россеев В.М. Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы и ячменя на устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам среды / В.М. Россеев, И.А. Белан, Л.П. Россеева // Доклады Российской Академии сельскохозяйственных наук. – 2010. – № 3. – С. 14–16.
18. Ростова Н.С. Изменчивость системы корреляций морфологических признаков. 1. Естественные популяции *Leucanthemum vulgare* (Asteraceae) / Н.С. Ростова // Ботанический журнал. – 1999. – Т. 84, № 11. – С. 50–66.
19. Ростова Н.С. Корреляция: структура и изменчивость / Н.С. Ростова. – Санкт-Петербург : Изд-во Санкт-Петербургского гос. университета, 2002. – 308 с.
20. Соболев М.А. Роль ядрышка в реакциях растительных клеток на действие физических факторов окружающей среды / М.А. Соболев // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35, № 3. – С. 72–84.
21. Ткачева М.С. К вопросу солеустойчивости риса / М.С. Ткачева, О.А. Досеева // Научный журнал КубГАУ. – 2015. – № 105 (01). – С. 933–948.
22. Челидзе П.В. Многофункциональная классификация ядрышек / П.В. Челидзе, О.В. Зацепина // Успехи современной биологии. – 1988. – Т. 105. – Вып. 2. – С. 252–258.
23. Челидзе П.В. Ультраструктура и функции ядрышка интерфазной клетки / П.В. Челидзе. – Тбилиси : Мецниереба, 1985. – 119 с.
24. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – Москва : Академкнига, 2004. – 495 с.
25. Черкасова Н.Н. Получение осмоустойчивых растений сахарной свеклы в культуре *in vitro* / Н.Н. Черкасова, Т.П. Жужжалова // Сахарная свекла. – 2001. – № 7. – С. 22–24.
26. Черкасова Н.Н. Создание в условиях *in vitro* форм сахарной свеклы с устойчивостью к засолению / Н.Н. Черкасова, Т.П. Жужжалова // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2013. – Вып. 2 (37). – С. 117–120.
27. Шихмурадов А.З. Устойчивость образцов твердой пшеницы *Triticum durum* L. к засолению почвы хлоридом натрия / А.З. Шихмурадов // Сельскохозяйственная биология. Серия: Биология растений. – 2009. – № 1. – С. 34–37.
28. Riska B. Some model for development, growth, and morphometric correlation / B. Riska // Evolution. – 1986. – Vol. 43, No. 1. – Pp. 223–225.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ Принадлежность к организации

Владислав Николаевич Калаев – доктор биологических наук, профессор кафедры генетики, цитологии и биоинженерии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Российская Федерация, г. Воронеж, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru.

Ольга Александровна Землянухина – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ботанического сада им. профессора Б.М. Козо-Полянского ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Российская Федерация, г. Воронеж, e-mail: oz54@mail.ru.

Вера Сергеевна Воронина – лаборант ботанического сада им. профессора Б.М. Козо-Полянского ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Российская Федерация, г. Воронеж, e-mail: vs_voronina86@mail.ru.

Галина Григорьевна Соколенко – доктор технических наук, профессор кафедры биологии и защиты растений ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Российская Федерация, г. Воронеж, e-mail: galigri@mail.ru.

Дата поступления в редакцию 16.01.2018

Дата принятия к печати 16.02.2018

AUTHOR CREDENTIALS Affiliations

Vladislav N. Kalaev – Doctor of Biological Sciences, Professor, the Dept. of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Russian Federation, Voronezh, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru.

Olga A. Zemlyanukhina – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher of the Botanical Garden named after prof. B.M. Kozo-Polyansky, Voronezh State University, Russian Federation, Voronezh, e-mail: oz54@mail.ru.

Vera S. Voronina – Laboratory Assistant of the Botanical Garden named after prof. B.M. Kozo-Polyansky, Voronezh State University, Russian Federation, Voronezh, e-mail: vs_voronina86@mail.ru.

Galina G. Sokolenko – Doctor of Engineering Sciences, Professor, the Dept. of Biology and Plant Protection, Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Russian Federation, Voronezh, e-mail: galigri@mail.ru.

Received January 16, 2018

Accepted February 16, 2018