

УДК 581.5

Д.Е. Гавриков<sup>1</sup>, С.Г. Баранов<sup>2</sup>

**МЕТОДИКА ОЦЕНКИ СТАБИЛЬНОСТИ РАЗВИТИЯ НА ПРИМЕРЕ БЕРЕЗЫ  
(*BETULA PENDULA*)**

<sup>1</sup> Иркутский государственный педагогический университет (Иркутск)

<sup>2</sup> Владимирский государственный педагогический университет (Владимир)

---

*Мы апробировали методику оценки стабильности развития растений через анализ уровней флуктуирующей асимметрии листа березы повислой, произрастающей в зоне аэровыбросов алюминиевого производства. Обнаружена вариация уровней флуктуирующей асимметрии листа между выборками, что может быть связано с влиянием различных причин, среди которых наиболее вероятным представляется антропогенный фактор.*

**Ключевые слова:** береза повислая, флуктуирующая асимметрия, стабильность развития, дисперсионный анализ

**THE DEVELOPMENTAL STABILITY ESTIMATION TECHNIQUE BY THE EXAMPLE  
OF BIRCH (*BETULA PENDULA*)**

**D.E. Gavrikov<sup>1</sup>, S.G. Baranov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Irkutsk State Pedagogical University, Irkutsk

<sup>2</sup> Vladimir State Pedagogical University, Vladimir

*We approved a technique of plant developmental stability estimation through the analysis of fluctuating asymmetry levels of a birch leaf, which are growing in contaminated areas of the aluminum plant. There is observed the variability of FA levels of morphological trait between samples that can be influenced by various reasons among which the most probable represents the anthropogenous factor.*

**Key words:** *Betula pendula*, fluctuating asymmetry, developmental stability, variance analysis

---

Стабильность развития живых организмов — показатель, который привлекает внимание исследователей в различных областях биологического знания от генетиков, эмбриологов до экологов [3, 6–9]. Подобный интерес связан с неоднозначностью определения причин, вызывающих нарушения данного процесса, основными из которых считаются генетические, эмбриологические и средовые [1, 13]. Было показано, что непосредственным отражением нестабильности развития является асимметрия билатеральных признаков животных и растений [12].

Собственно форм асимметрии в живой природе известно несколько: направленная и флуктуирующая асимметрия, антисимметрия [15]. На сегодняшний день только флуктуирующая асимметрия (ФА) показала свои возможности в экологическом мониторинге как чувствительный популяционный индикатор среднего стресса различной этиологии (антропогенное воздействие, пищевой, температурный стресс и другие) [13]. Так, в ряде исследований была показана взаимосвязь между морфологической асимметрией и расстоянием от стоков химических фабрик [8]. Нестабильность развития, оценить которую позволяет ФА-критерий, также включена в качестве непосредственного показателя потенциальных отрицательных влияний химических веществ. Примеры этого — положительная взаимосвязь между скелетной асимметрией и концентрацией ДДТ [11]. Было зарегистрировано увеличение уровней асимметрии листовых платин у двух видов березы *Betula pendula* и *B. pubescens* вдоль склонов недалеко от плавильных и бумажных фабрик в Финляндии и России [14]. Дополнение бензола в среду личинок *Drosophila melanogaster* приводит к увеличению флуктуирующей асимметрии с увеличением концентрации [5].

Приведенные примеры демонстрируют актуальность исследования проблемы нарушения стабильности развития через анализ флуктуирующей асимметрии. Необходимость таких работ очевидна как в теоретическом, так и прикладном отношении. Задачей настоящего исследования явилась апробация методики оценки стабильности развития на примере березы повислой, произрастающей в зоне действия алюминиевого производства.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор материала осуществлялся 29 и 30 июня 2004 г. в Шелеховском районе Иркутской области, в зоне действия Иркутского алюминиевого завода (ОАО ИркАЗ-СУАЛ) в пяти случайно выбранных точках:

T<sub>1</sub> — 2 км от ИркАЗ в северо-западном направлении;

T<sub>2</sub> — пос. Введенщина к северо-северо-западу от ИркАЗ;

T<sub>3</sub> — пос. Б. Луг к юго-западу от ИркАЗ;

T<sub>4</sub> — пруды-отстойники к юго-юго-востоку от ИркАЗ;

T<sub>5</sub> — точка прохода Московского тракта через границу Иркутского и Шелеховского районов к востоку от ИркАЗ.

Сбор материала проводился при стандартных погодных условиях (солнечно, безветренно, полдень).

Объект исследования — береза повислая *Betula pendula* Roth.

В каждой из указанных точек случайным образом выбирались три дерева, которые, по визуальным прикидкам, находились в сходных экологических условиях (на опушке, не сильно затененные другими деревьями и пр.). С каждого дерева собиралось по 6 листьев с ветки на уровне человеческого роста (как правило, первой ветки снизу). Собранные листья помещались в гербарий между листами фильтровальной бумаги [14].

Таким образом, каждая анализируемая выборка содержала по 18 листьев (всего 90 листьев в пяти выборках). В двух повторностях количество данных составило 180.

В лаборатории, каждый лист помещался на предметное стекло с нанесенной на него контрольной миллиметровой шкалой и накрывался другим стеклом.

Далее проводилась съемка расправленного между стеклами листа цифровой фотокамерой Panasonic, с настройкой макросъемки. Цифровые фотографии каждого листа переносились на компьютер для дальнейшей оценки.

В настоящей работе использовались 2 промера листа (рис. 1):

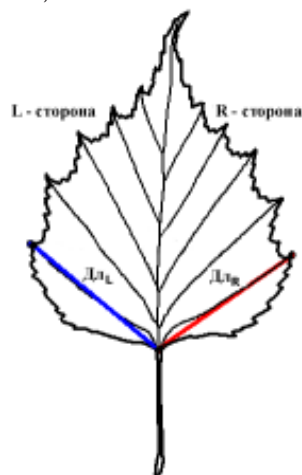


Рис. 1. Используемые промеры листа. Дл<sub>л</sub> — длина левой доли листа (расстояние от центральной жилки в середине листа до самой дальней крайней левой точки листа); Дл<sub>п</sub> — длина правой доли листа (расстояние от центральной жилки в середине листа до самой дальней крайней правой точки листа).

Измерения проводились при помощи стандартного программного средства «Линейка» в графической программе Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems Incorporated). Принятая точность измерения (0,5 мм).

Вначале на фотографии для нивелирования ошибки измерения дважды измерялась контрольная линейка в 1 см. Далее, дважды измерялись промеры листа. Если разница между первым и вторым измерениями была больше чем 15 мм, проводился дополнительный замер, чтобы уменьшить ошибку измерения [14].

Собранные данные анализировались при помощи пакета для статистической обработки данных Statistica 6.0 (StatSoft Inc. USA)

В работе использовались одно- и многофакторный дисперсионный анализ, Бокс-Кокс трансформация, тест Шапиро-Уилка, односторонний и двусторонний *t*-критерий Стьюдента, Критерий Фишера, критерий Левина, коэффициент корреляции Спирмена.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

Флуктуирующая асимметрия выражается в незначительных случайных отклонениях от идеальной симметрии в реализации морфологических признаков с двух сторон тела и определяется по разнице в значении признака справа и слева. В начале исследования была проведена оценка отсутствия направленной (НА) и антисимметрии (АНС), которые могут существенно помешать в выявлении флуктуирующей асимметрии. НА можно определить как явление, при котором признак на одной стороне тела развивается значительно сильнее, чем на другой. Антисимметрия, когда признак может преобладать то на левой стороне, то на правой. Для выяснения компонент изменчивости асимметрии листа был применен двухфакторный дисперсионный анализ с повторностями по значениям признака ( $\Delta L_R - \Delta L_L$ ). Рассматривалось влияние на изменчивость — генотипических особенностей особей (дерево), средовой составляющей (сторона), повторностей измерений и их взаимодействия (табл. 1).

Было показано влияние на изменчивость уровня асимметрии листа указанных факторов ( $P < 0,001$ ). Таким образом, можно предполагать значительные генотипические различия между исследуемыми деревьями в пяти точках, что выражается в величине (размере) признака ( $\Delta L_R - \Delta L_L$ ). Отсутствие значимого влияния фактора «Сторона» позволяет говорить об отсутствии влияния направленной асимметрии на общую изменчивость исследуемого признака [10].

Мы также рассмотрели асимметрию вариационного ряда [ $\gamma_1$ ] и его эксцесс [ $\gamma_2$ ] чтобы оценить отклонения от нормальности [4]. Значимость эксцесса оценивалась *t*-тестом с нулевой гипотезой  $\gamma_2 = 0$ . Было показано, что антисимметрия в исследуемых выборках отсутствует.

Наличие различий между деревьями в сравниваемых точках по величине признака не позволяет вычлнить ФА. Кроме того, значения эксцесса в нескольких выборках были значительно выше 0, что может говорить о ненормальном распределении признаков.

Для того чтобы нивелировать влияние размера признака и нормализовать распределение, мы ввели преобразование Бокса — Кокса по абсолютным значениям разниц длин листа справа и слева  $|\Delta L_R - \Delta L_L|$  [2]. Нормализация проводилась по формуле:

$$d^* = (|d| + 0,00005)^{0,33}, \text{ где } |d| = \log_{10} \Delta L_R - \log_{10} \Delta L_L$$

После указанного преобразования тестом Шапиро — Уилка была показана нормальность распределения по всем пяти точкам ( $P < 0,05$ ), что наглядно продемонстрировано на графике распределения значений ФА после трансформации (рис. 2).

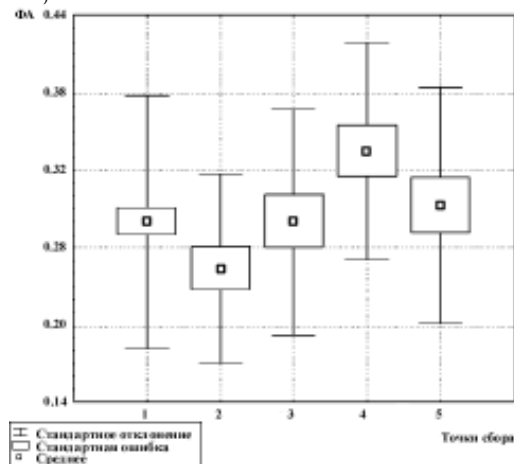


Рис. 2. Распределение значений ФА, полученных после трансформации.

С использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена не обнаружено корреляционной связи между величиной признака и нормализованными значениями ФА, что свидетельствует об отсутствии влияния размера признака [4].

Далее для выяснения различий между пятью выборками по нормализованным значениям асимметрии мы использовали тест Левина. Показанная неоднородность выборок позволяет предполагать наличие различий в уровнях асимметрии, а, следовательно, в стабильности развития, между пятью точками ( $P < 0,05$ ).

**Таблица 1**  
**Двухфакторный дисперсионный анализ (с повторностями) изменчивости уровня асимметрии ( $\Delta L_R - \Delta L_L$ ) листа (*Betula pendula*)**

Источник изменчивости	df	MS	F
Сторона (среда)	1	0,03	0,13
Дерево (генотип)	107	0,55	2,20***
Повторность	1	598,81	2399,73***
Взаимодействие	107	0,55	2,20***

Примечание: \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$ .

Продолжая исследование, следуя рекомендациям Палмера [10], мы провели дисперсионный анализ для выявления компонент изменчивости асимметрии листа  $|D_{LR} - D_{LL}|$ . При этом рассматривалось влияние факторов: «Точка сбора», отражающая вариацию средовых условий, «Дерево» — вариация генетических особенностей.

Обнаруженное достоверное влияние указанных факторов ( $P < 0,001$ ) позволяет говорить о наличии вариации стабильности развития между точками, которая может быть связана с влиянием генотипических различий между сравниваемыми деревьями, а также влиянием средовой компоненты. Данное предположение было еще раз подтверждено при сравнении средних значений ФА пяти выборок  $t$ -критерием ( $P < 0,05$ ). Проведенная тестом Левина проверка гомогенности дисперсий данных выборок также показала их различия, особенно ярко между первой и четвертой точками.

Таким образом, можно говорить о различиях в стабильности развития растений березы, произрастающих в точках один и четыре в зоне действия Иркутского алюминиевого завода, что может быть обусловлено рядом причин, среди которых наиболее вероятной представляется средовая компонента.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Говоря об асимметрии, как отклонении от строгой симметрии, можно предположить, что величину этого отклонения отражает баланс между, как минимум, двумя противоположными процессами. Первый — это случайные факторы, «шумы развития», причиной которых являются нарушения в процессе клеточных делений, дифференциации и роста; факторы среды и факторы наследственной природы. Второй процесс — реализация механизмов стабильности развития, которые ослабляют указанные шумы и снижают асимметрию, гарантируя, что развитие признака будет проходить в направлении его генетической траектории. Другими словами, стабильность развития ограничивает уровень потенциальной асимметрии особи в данных условиях среды. Таким образом, очевидно, просматривается связь между стабильностью развития и асимметрией и, в частности, с флуктуирующей асимметрией [2, 14].

При исследовании ФА исследователю приходится сталкиваться с тем, что данное явление характеризуется незначительным проявлением. В этой ситуации принципиальным является методическая чистота проведения эксперимента, начиная со сбора материала и заканчивая его обработкой. Нами были введены рандомизирующие процедуры: случайный выбор точек сбора, деревьев для исследования, отбор листьев. При этом собственно сбор и анализ осуществлялись с использованием стандартизированных процедур. Только после этого мы приступили к оценке асимметрии и причин, ее вызывающих.

Как уже отмечалось, флуктуирующая асимметрия многогранное явление. Влияние стресс-факторов различной этиологии на уровень ФА было продемонстрировано во многих работах [11]. Генотипические основания данного явления так-

же были показаны в ряде исследований [3]. При этом вопрос оценки флуктуирующей асимметрии все еще остается актуальным.

Проблема заключается в том, что ФА является одним из компонентов системы, которую мы привыкли называть «асимметрия». В этой системе можно выделить как минимум три составляющих: флуктуирующая, направленная асимметрии и антисимметрия.

Наличие последних двух существенно мешает выделению ФА. Именно поэтому в нашей работе мы провели оценку указанных двух типов асимметрии при помощи дисперсионного анализа. Отсутствие  $H_a$  и  $A_nC$  позволило продолжить исследование.

Следующей методической трудностью, с которой пришлось столкнуться, явилось влияние величины (размера) признака на флуктуирующую асимметрию. Иными словами было обнаружено, что чем больше размер листа березы, тем более он асимметричен. Кроме того, оказалось, что распределение значений ФА в ряде выборок далеко от нормального. В подобной ситуации невозможно проводить сравнение уровней асимметрии между различными особями и выборками, а также использовать необходимые статистические критерии для их оценки [10]. Данная задача была решена с использованием нормализующего преобразования Бокса — Кокса.

Проведенные статистические процедуры нивелировали влияние сопутствующих флуктуирующей асимметрии явлений и позволили продолжить исследование в направлении оценки ФА листьев березы, произрастающей в зоне действия алюминиевого производства.

Наибольшие различия между средними значениями ФА были продемонстрированы для 1-й и 4-й точек, для которых также отмечается гетерогенность в распределении дисперсий (тест Левина). Следует отметить, что критерий Левина неоднократно показал свои возможности при анализе трансформированных данных [9]. В этой связи, можно предполагать, что обнаруженные между выборками различия дисперсий, свидетельствуют об отличиях в стабильности развития растений указанных территорий. Причин наблюдаемой нестабильности, по крайней мере, несколько: это фенотипическая изменчивость, генотипические различия, не исключено и влияние прямого или косвенного антропогенного фактора.

Если говорить о средовой составляющей изменчивости ФА, то объяснение наблюдаемых отличий между выборками состоит в следующем. Точки 1 и 4 являются местами, где экосистемы, очевидно находятся в зоне действия рассеяния облака аэровыбросов ИркаЗа ( $T_1$  — 2 км от ИркаЗ в северо-западном направлении;  $T_4$  — пруды-отстойники к юго-юго-востоку от ИркаЗ). Однако, учитывая преобладающий региональный и локальный северо-западный и юго-восточный перенос, можно предполагать, что растительность в точке 4 будет испытывать больший стресс от загрязнения воздушного бассейна, поскольку именно в этом направлении происходит пе-

ремещение воздушных масс. Плюс к этому, пруды-отстойники в отличие от точки 1 находятся на достаточном расстоянии от предприятия, т.е. в зоне, где возможно выпадение загрязняющих веществ, которое не может быть нивелировано высотой трубы.

Точки 3 – пос. Б. Луг к юго-западу от ИркаЗ и 5 – Точка прохода Московского тракта через границу Иркутского и Шелеховского районов к востоку от ИркаЗ находятся вне зоны регионального переноса воздушных масс, что приводит к уменьшению стрессового воздействия загрязнителей на растительные сообщества, и этим может объясняться отличие показателей ФА в данных точках.

Таким образом, нами проведена апробация методики оценки стабильности развития на примере березы повислой, произрастающей в зоне действия алюминиевого производства. Была показана ее пригодность для подобного рода исследований. Следует отметить, что ряд авторов предлагает простые методики для оценки стабильности развития через анализ ФА. Мы считаем, что использованный в данной работе сложный статистический анализ асимметрии абсолютно оправдан, потому что только так, можно объективно оценить рассматриваемое явление и вычленил причины его вызывающие.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Alexander R.McN. Symmetry and precision of control of strength in limb bones of birds / R.McN. Alexander, A. Brandwood, J.D. Currey // *J. Zool.* – 1984. – Vol. 203. – P. 135–143.
2. Aparicio J.M. Patterns of growth and fluctuating asymmetry: the effects of asymmetrical investment in traits with determinate growth / *Behav. Ecol. Sociobiol.* – 2001. – Vol. 49. – P. 273–282.
3. Chippindale A. Persistence of subtle departures from symmetry over multiple molts in individual brachyuran crabs: relevance to developmental stability / A. Chippindale, A.R. Palmer // *Genetica.* – 1993. – Vol. 89, N 1–3. – P. 185–199.
4. Cowart N.M. Within- and among-individual variation in fluctuating asymmetry of leaves in the fig (*ficus carica* l.) / N.M. Cowart, J.H. Graham // *Int. J. Plant Sci.* – 1999. – Vol. 160 (1). – P. 116–121.
5. Graham J. Antisymmetry, directional asymmetry and dynamic morphogenesis / J. Graham, D.C. Freeman, J. Emlen // *Genetica.* – 1993. – Vol. 89, N 1–3. – P. 121–137.
6. Klingenberg C.P. Integration and modularity of quantitative trait locus effects on geometric shape in the mouse mandible / C.P. Klingenberg, L.J. Leamy, J.M. Cheverud // *Genetics.* – 2004. – Vol. 166. – P. 1909–1921.
7. Möller A.P. Leaf-mining insects and fluctuating asymmetry in elm *Ulmus glabra* leaves / A.P. Möller // *Journal of Animal Ecology.* – 1995. – Vol. 64. – P. 697–707.
8. Möller A.P. Asymmetry, Developmental Stability and Evolution / A.P. Möller, J.P. Swaddle // Oxford University Press. – 1997. – 162 p.
9. Palmer A.R. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns / A.R. Palmer, C. Strobeck // *Ann. rev. ecol. syst.* – 1986. – Vol. 17. – P. 391–421.
10. Palmer A.R. Fluctuating asymmetry analyses revisited / A.R. Palmer, C. Strobeck // In *Developmental Instability (DI): Causes and Consequences* / Ed. M. Polak. – Oxford: Oxford University Press, 2003. – P. 279–319.
11. Parsons P.A. Fluctuating asymmetry: an epigenetic measure of stress / P.A. Parsons // *Biol. Rev.* – 1990. – Vol. 65. – P. 131–145.
12. Öxnevad S.A. Is there a relationship between fluctuating asymmetry and reproductive investment in perch (*Perca fluviatilis*) / S.A. Öxnevad, E. Heibo, L.A. Vollestad // *Can. J. Zool.* – 2002. – Vol. 80. – P. 120–125.
13. Thoday J.M. Balance, heterozygosity and developmental stability / J.M. Thoday // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* – 1955. – Vol. 20. – P. 318–326.
14. Valkama J. Impact of climatic factors on the developmental stability of mountain birch growing in a contaminated area / J. Valkama, M.V. Kozlov // *J. of Appl. Ecol.* – 2001. – Vol. 38. – P. 665–673.
15. Van Valen L. Study of fluctuating asymmetry / L. Van Valen // *Evolution.* – 1962. – Vol. 16, N 2. – P. 125–146.