

УДК 582.931+504.064.3

Флуктуирующая асимметрия листьев: механизм формирования и применение в фитоиндикации

Fluctuating asymmetry of leaves: the mechanism of forming and using in phytoindication

В. И. Полонский, И. С. Полякова

V. I. Polonskiy, I. S. Polyakova

Красноярский государственный аграрный университет, 660049, Красноярск, пр. Мира, 90
E-mail: vadim.polonskiy@mail.ru, polyakovaira@bk.ru

Реферат. С целью анализа возможного механизма формирования величины флуктуирующей асимметрии листа проведено сравнительное исследование количественной анатомии эпидермиса различающихся по ширине половин листьев *Syringa josikaea* Jacq. В течение онтогенеза листа прослежено закономерное понижение плотности основных клеток эпидермы в меньшей части половине листа по сравнению с большей. Индекс устьиц имел равное значение у разновеликих частей листа. Заключается, что уровень флуктуирующей асимметрии листа сирени венгерской обусловлен главным образом меньшей скоростью деления клеток в меньшей части листа. С целью усовершенствования метода фитоиндикации загрязнения окружающей среды проведено сравнительное исследование величины индекса флуктуирующей асимметрии (ФА) отдельных листьев (ИФАП) и пар супротивных листьев (ИФАС) *Syringa josikaea* Jacq. Растения росли в различных по степени загрязнения районах г. Красноярск. Контрольный участок был представлен территорией, расположенной на окраине города вблизи лесного массива, – микрорайон Академгородок. В качестве опыта служили территории, находящиеся в центральной части Красноярск, загрязненные в основном выхлопными газами автотранспорта. В контроле ИФАС и ИФАП составили соответственно 0,030 и 0,024, а в опытах 0,044 и 0,032. Сделано заключение, что для оценки качества городской среды целесообразно проводить вычисления индекса ФА, основываясь на измерении морфологического признака целых супротивных листьев, а не половин отдельных листьев. Указанный подход к биоиндикации качества окружающей среды обладает более высокой чувствительностью и меньшей относительной погрешностью.

Summary. The comparative study of quantitative anatomy of the epidermis in *Syringa josikaea* Jacq. leaf parts of different width was conducted in order to analyze the possible mechanism of formation of the value of fluctuating leaf asymmetry. A regular decrease in the density of main epidermal cells in the smaller leaf part compared with the bigger one was traced during leaf ontogeny. Stomatal index was equal in different sized leaf parts. It was concluded that the level of fluctuating leaf asymmetry in lilac was mainly due to a lower rate of cell division in the smaller part of leaf. In order to improve the method of bioindication of environmental pollution the comparative study of the index fluctuating asymmetry (FA) of individual leaves (IFAH) and the pairs opposite leaves (IFAO) *Syringa josikaea* Jacq. was done. Plants were grown in various places of Krasnoyarsk differing on the degree of contamination. A control plot was located on the outskirts of city near the forest – Akademgorodok. The experimental territories were located in the center of Krasnoyarsk, mainly contaminated by exhaust gases of vehicles. In the control IFAO and IFAH were respectively 0.030 and 0.024, or 0.044 and 0.032 in the experiments. It was concluded that to assess the quality of the urban environment it was advisable to carry out calculations of the index FA based on the measurement of morphological sign of entire opposite leaves rather than separate halves of the leaves. This approach to bioindication of environmental quality has a higher sensitivity and lower relative error.

У растений билатеральная симметрия морфологических структур, например, листовых пластинок, как симметрия левого и правого существует в естественных условиях лишь в идеализированном фенотипе (Freeman et al., 1993). Это происходит потому, что в природе организм практически никогда не функционирует при оптимальном сочетании всех условий внешней среды. Стрессоры вызывают возмущения в течение развития организма, которые могут превысить способность последнего корректировать их проявление. В результате регистрируется нестабильность развития, о котором свидетельствуют отклонения в симметрии билатеральных морфологических структур, появление флуктуирующей асимметрии (ФА) (Захаров и др., 2000; Freeman et al., 2003).

Как известно вначале листовая зачаток увеличивается в размерах благодаря делению клеток, затем лист разворачивается и растет далее за счет деления и растяжения клеток (Медведев, 2004). Сведения о том, какие из указанных процессов способствуют появлению ФА листа, в литературе малочисленны (Freeman et al., 2003; Möller, Dongen, 2003; Graham et al., 2010).

Цель настоящего исследования состоит в анализе механизма формирования величины ФА листа в его онтогенезе и возможного применения индекса ФА супротивных листьев сирени венгерской в фитоиндикации загрязнения городской среды.

Материалы и методы

В работе была использована сирень венгерская, *Syringa josikaea* Jacq. – широко распространенный в городских зеленых насаждениях вид растений. Сирень произрастала в двух контрастных по степени загрязненности условиях г. Красноярск: контроль и опыт. Контрольный участок был представлен относительно чистой территорией с отсутствием промышленных объектов, чрезвычайно низкой интенсивностью движения автотранспорта и расположенной на юго-западной окраине города вблизи лесного массива (микрорайон Академгородок). В качестве опыта служили территории, находящиеся в центральной части Красноярска, загрязненные в основном выхлопными газами автотранспорта (Шабалина, Демьяненко, 2011; Полонский, Полякова, 2014): Железнодорожный р-н (участок Красная площадь), Ленинский р-н (участок КрасТЭЦ), Октябрьский р-н (участок проспект Свободный).

Следуя известной методике (Захаров и др., 2000), при изучении реакции растений сирени в каждом исследуемом участке города отбирали не менее 200 шт. (100 пар) листьев (табл. 1). Эту операцию выполняли в нижней части кроны с 5–10 растений для каждой выбранной городской территории. В работе выполняли промеры ширины левой и правой половин молодых (май и июнь) и полностью сформированных листьев (сентябрь). Согласно стандартной методике (Захаров и др., 2000), на листовой пластинке ровно посередине делали сгиб и в этом месте измеряли ширину каждой половины листа. Кроме того, в работе измеряли ширину целых супротивных листьев. Измерения выполняли линейкой с точностью 0,5 мм. На основании полученных значений ширины половин листа или целых листьев вычисляли индекс ФА листа (Захаров и др., 2000; Полонский, Полякова, 2014). Индекс ФА отдельного листа, который характеризовал асимметричность собственно листовой пластинки (ИФАП), выражали как отношение разности значений ширины левой и правой половин листа к их сумме (Захаров и др., 2000). При определении индекса ФА пары супротивных листьев с учетом вклада асимметрии половин каждого листа (ИФАС), использовали частное от деления разности между шириной одного целого листа и шириной другого листа из пары супротивных листьев на их сумму.

Таблица 1

Количественная анатомия эпидермиса различающихся по ширине частей листьев разного возраста сирени венгерской

Сроки наблюдения	Часть листа	Средняя ширина части листа, мм	Индекс устьиц, %	Количество на 1 мм ² поверхности листа	
				устьиц	основных клеток эпидермы
Май	меньшая	13,0	4,0	126,7 ± 4,4 а	3067 ± 47 а
	большая	15,2	4,0	128,9 ± 3,3 г	3078 ± 50 г
Июнь	меньшая	13,6	7,8	151,1 ± 2,0 б	1774 ± 16 б
	большая	15,1	7,9	153,3 ± 3,2 д	1793 ± 15 д
Сентябрь	меньшая	27,9	9,4	112,2 ± 1,4 в	1078 ± 6 в*
	большая	31,7	9,2	114,4 ± 1,6 е	1128 ± 5 е*

Примечание. В таблице представлена средняя арифметическая величина и ошибка средней; значения в строках со знаком (*) различаются между большей и меньшей частями листа в пределах одного его возраста существенно при $p \leq 0,05$; значения в строках с разными буквами различаются между меньшими частями листьев разного возраста существенно при $p \leq 0,05$; значения в строках с разными буквами различаются между большими частями листьев разного возраста существенно при $p \leq 0,05$.

Исследование эпидермиса листа проводили модифицированным методом отпечатков по Полаччи, используя бесцветный лак для ногтей. Подсчет количества основных клеток эпидермы и устьиц в поле зре-

ния микроскопа известной площади производили на репликах в 20-кратной повторности. Всего на репликах было изучено 1600 полей зрения (по 40 на каждом из 10 листьев, взятых для измерений в мае, 10 листьев, проанализированных в июне и 20 листьев, использованных для анализа в сентябре). По результатам подсчета клеток эпидермиса определяли индекс устьиц (долю устьиц от общего числа основных клеток эпидермы плюс числа устьиц) в разных половинах листа.

Статистическую обработку полученных данных проводили методами дисперсионного и корреляционного анализов с помощью стандартных компьютерных программ Microsoft Excel. Достоверность результатов оценивали, используя t-критерий Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Результаты

Усредненные данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что с возрастом листа плотность эпидермальных клеток и устьиц (кроме июня) падала. Величина индекса устьиц с возрастом листа монотонно возрастала. У молодых листьев (май, июнь) между меньшей и большей частями листа не было отмечено достоверных различий в плотности основных клеток эпидермы, а у взрослых листьев (сентябрь) менее широкой части листа соответствовала меньшая плотность основных клеток эпидермы (различия существенны при $p \leq 0,05$). Плотность устьиц и величины индекса устьиц на обеих частях листа были практически равными независимо от его возраста. Следовательно, в меньшей по ширине части листа не была снижена доля основных клеток эпидермы, перешедших к третьей фазе роста – дифференцировке, оцениваемой по образованию устьиц.

В табл. 2 приведены результаты вычисления значений индекса ФА у сирени венгерской, определенных с помощью измерения целых листьев, а также их половин в зависимости от места произрастания растений. Можно видеть, что величины ИФАП и ИФАС листьев, вычисленные для растений, произрастающих в Академгородке (контроль), существенно отличались в меньшую сторону от таковых значений для растений, взятых из загрязненных городских территорий (опыт). Последнее в сочетании с данными о ширине листьев свидетельствует об ухудшении условий для роста растений в опытных вариантах. Величины ИФАС листьев для всех вариантов существенно (на 25–47 %) превышали значения ИФАП независимо от условий произрастания растений в г. Красноярске. Наибольшие абсолютные величины индекса ФА и максимальные различия в отношении ИФАС/ИФАП отмечались для опытного варианта (район проспекта Свободный).

Таблица 2

Величины индекса ФА листа (ИФАП), индекса ФА пары целых супротивных листьев (ИФАС) и их отношений растений сирени венгерской, произрастающих в различных по уровню загрязнения районах г. Красноярска

Показатель	Место произрастания растений				Среднее в опыте
	Академгородок (контроль)	Красная площадь (опыт)	КрасТЭЦ (опыт)	Проспект Свободный (опыт)	
Объем выборки листьев, шт.	324	256	206	282	248
Ширина листа, мм	73,2 ± 1,2 а	51,6 ± 0,8б	59,2 ± 1,1в	59,8 ± 1,2 в	56,9
Ширина листа, опыт/контроль, %	100	70,5	80,9	81,7	77,7
ИФАП	0,024 ± 0,001а*	0,030 ± 0,001 б*	0,031 ± 0,002 б*	0,035 ± 0,003 б*	0,032
ИФАС	0,030 ± 0,002 а*	0,044 ± 0,004 б*	0,040 ± 0,003 б*	0,047 ± 0,004 б*	0,044
ИФАС/ИФАП, %	125,0	146,7	129,0	134,3	136,7
Опыт/контроль, %	ИФАП	100	125	146	133,3
	ИФАС	100	147	133	145,7

Примечание. В таблице представлена средняя арифметическая величина и ошибка средней; значения в колонках с разными буквами различаются существенно между собой в пределах каждой строки по t-критерию при $p \leq 0,05$; значения со знаком (*) в строках различаются существенно между собой в пределах каждой колонки при $p \leq 0,05$.

Обсуждение

Если объективно регистрируется результат угнетения роста одной из частей листа, логично предположить, что механизм данного явления состоит или в замедлении скорости процессов деления клеток в этой стороне листа и/или уменьшении степени растяжения клеток. Согласно полученным результатам (табл. 1), плотность основных клеток эпидермы, измеренная в меньшей части листа, по сравнению с большей частью практически всегда была ниже, при этом различия у молодых (май, июнь) листьев были несущественными, а у полностью развитых (сентябрь) статистически доказанными. Значит, линейные размеры этих клеток у менее развитой части листа по сравнению с большей частью не могут быть меньше. Следовательно, причиной появления асимметричных половин листа в любом его возрасте не является угнетение фазы растяжения клеток в меньшей части листовой пластинки. В качестве таковой причины, скорее всего, выступает процесс неодинакового клеточного деления в обеих частях листа.

Как известно, на двух сторонах примордия начинает функционировать краевая меристема, дающая начало всем клеткам листовой пластинки (Медведев, 2004). По-видимому, процесс неодинакового клеточного деления в разных половинах асимметричного листа, является следствием того, что на различных сторонах примордия одна краевая меристема более активна, чем другая. Под влиянием неблагоприятных экологических факторов деление клеток в меристемах, принадлежащих двум половинам листовой пластинки, вероятно рассинхронизируется. Предполагается, что природа этого явления является гормональной. Как показали результаты, механизм появления асимметрии листа не связан ни с фазой растяжения клеток, ни с фазой их дифференциации (Polonskiy, Polyakova, 2015).

Различия между загрязненными территориями и относительно чистым контролем по показателю ИФАС были заметно выше, чем по ИФАП, что может говорить в пользу большей чувствительности подхода к биомониторингу среды при использовании целых листьев, вместо их половин. Подчеркнем, что поскольку для вычисления индекса ФА использовался показатель ширины целых листьев, а не их половин, то при одинаковой абсолютной ошибке измерения ширины с помощью линейки относительная ошибка измерения в первом случае была вдвое ниже.

Опыт использования подобных целым супротивным листьям структур у хвойных растений *Pinus sylvestris* L. для оценки стабильности их развития описан в литературе (Kozlov et al., 2002). Авторы на основе измерений длины и массы каждой из двух хвоинок, расположенных в одной мутовке, продемонстрировали наличие ФА, усиливающейся в неблагоприятных условиях внешней среды, что совпадает с полученными нами результатами.

Заключение

На основании полученных экспериментальных данных можно констатировать, что плотность основных клеток эпидермы, измеренная в меньшей части листа сирени венгерской по сравнению с большей частью, у молодых листьев была практически равной, но имела существенно низкую величину у полностью развитых листьев. Это предполагает, что причиной возникновения асимметричных половин листа является процесс неодинакового клеточного деления в обеих половинах листа, а не угнетение фазы растяжения клеток в меньшей части листовой пластинки.

Величина индекса ФА, вычисленная для пары целых простых супротивных листьев (ИФАС) сирени венгерской по сравнению с величиной индекса ФА, определенной на основе измерений двух разных половин одного и того же листа (ИФАП), имела более высокое значение. При этом указанные различия усиливались под воздействием неблагоприятных внешних факторов по сравнению с фоновыми условиями. Полученные в работе результаты позволяют говорить о том, что пространственно друг от друга более отдаленные билатеральные морфологические структуры листьев способны заметнее проявлять их ФА. Причина этого, по-видимому, может заключаться в более высокой вероятности ошибки в реализации наследственной информации у формирующихся пар супротивных листьев по сравнению с половинами одного листа.

Прикладное значение выполненного исследования состоит в том, что подход к определению индекса флуктуирующей асимметрии на основе измерения ширины целых супротивно расположенных листьев (ИФАС) вместо их половин (ИФАП) повышает чувствительность метода сравнительной оценки степени загрязнения городской среды, проводимого на основе фитоиндикации с использованием сирени венгерской, а также снижает относительную ошибку измерения.

ЛИТЕРАТУРА

- Захаров В. М., Баранов А. С., Борисов В. И.** Здоровье среды: методика оценки. Оценка состояния природных популяций по стабильности развития: методологическое руководство для заповедников. – М.: Центр экологической политики России, 2000. – 66 с.
- Медведев С. С.** Физиология растений. – СПб.: Санкт-Петербургский ун-т, 2004. – 336 с.
- Полонский В. И., Полякова И. С.** Сирень венгерская – перспективный биоиндикатор для сравнительной оценки степени загрязнения городской среды // Вестник Красноярского государственного аграрного университета, 2014. – № 2. – С. 89–92.
- Шабалина О. М., Демьяненко Т. Н.** Оценка влияния загрязнения среды и почвенных факторов на показатели флуктуирующей асимметрии листа березы повислой (*Betula pendula* Roth.) в г. Красноярске // Вестник Красноярского государственного аграрного университета, 2011. – № 12. – С. 134–139.
- Freeman D. C., Graham J. H., Emlen J. M.** Developmental stability in plants: symmetries, stress and epigenesis // *Genetica*, 1993. – Vol. 89, No. 1. – P. 97–119.
- Freeman D. C., Graham J. H., Emlen J. M. et al.** Plant Developmental instability: New Measures, Applications, and Regulation // *Developmental instability. Causes and Consequences*. – Oxford.: Oxford University Press, 2003. – P. 367–386.
- Graham J. H., Raz S., Hel-Or H. et al.** Fluctuating Asymmetry: Methods, Theory, and Applications // *Symmetry*, 2010. – Vol. 2, No. 3. – P. 466–540.
- Kozlov M. V., Niemela P., Junttila J.** Needle fluctuating asymmetry is a sensitive indicator of pollution impact on Scots pine (*Pinus sylvestris*) // *Ecological Indicators*, 2002. – Vol. 1, No. 4. – P. 271–277.
- Moller A. P., Dongen S. V.** Ontogeny of asymmetry and compensational growth in elm *Ulmus glabra* leaves under different environmental conditions // *International Journal of Plant Sciences*, 2003. – Vol. 164, No. 4. – P. 519–526.
- Polonskiy V. I., Polyakova I. S.** Increased Size of Epidermal Cells in *Syringa josikaea* Jacq. Smaller Leaf Side as an Adaptive Mechanism for Reducing Its Asymmetry // *Russian Journal of Developmental Biology*, 2015. – Vol. 46, No. 6. – P. 356–361.