

**АПРОБАЦИЯ МЕТОДА ГЕОМЕТРИЧЕСКОЙ МОРФОМЕТРИИ
НА ПРИМЕРЕ ЛИСТОВЫХ ПЛАСТИН ПШЕНИЦЫ****Баранов С.Г.***ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет им. А.Г. и Н.Г. Столетовых»,
Владимир, e-mail: bar.serg58@gmail.com;
Верхневолжский аграрный научный центр, п. Новый, Владимирская обл.*

Исследовано влияние на флуктуирующую асимметрию (ФА) и форму листовой пластины озимой и яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.1753) длины пластины и дозы удобрения. Флаговые листовые пластины собирались с растений, выращенных на серых лесных почвах Суздальского Ополя (Владимирская область, Россия). Использовались две дозы удобрения. Интенсивная доза (1-я) включала нитрофос в дозе $N_{60}P_{60}K_{60}$ для яровой и азот $N_{60} + 40$ т навоза/га для озимой пшеницы. Высокоинтенсивная доза (2-я) включала $N_{90}P_{90}K_{90}$ для яровой и $N_{60} + 40$ т навоза/га + $N_{40}P_{40}K_{40}$ для озимой пшеницы. На сканированное изображение листьев наносились метки (50 пар) и проводился морфогометрический (Прокрустов) дисперсионный анализ с построением усредненной конфигурации (центроида) и с последующим определением флуктуирующей асимметрии *F*-критерием Гудолла. Дополнительными показателями служили расстояния Прокрустова пространства между центрами множеств координат XY ковариационной матрицы, полученной при взаимодействии источников вариаций «лист» и «сторона». Длина пластин и величина центроида была меньше у яровой пшеницы. Доза удобрения влияла на форму листовых пластин только у яровой пшеницы ($p < 0,0003$). Направленная асимметрия встречалась как в контроле, так и в эксперименте, но была более характерна для яровой формы. Флуктуирующая асимметрия была высокой в листьях озимой пшеницы, полученной при повышенной дозе ($F = 4,8; p < 0,0001$), а яровая пшеница не показала различия в ФА. Прокрустовы расстояния подтвердили результаты Прокрустова анализа для озимой пшеницы ($p < 0,0001$). Таким образом, повышенная доза удобрения вызывала снижение стабильности развития у озимой пшеницы. Листья яровой пшеницы обладали высокой изменчивостью формы и асимметрии, включая связь между длиной, формой и асимметрией без признаков снижения стабильности развития.

Ключевые слова: флуктуирующая асимметрия, листовая пластина пшеницы, метод геометрической морфометрии, дозы удобрения

**PROBATION OF GEOMETRIC MORPHOMETRICS:
LEAF BLADES WHEAT CASE STUDY****Baranov S.G.***Vladimir State University named after A.G. and N.G. Stoletovs, Vladimir,
e-mail: bar.serg58@gmail.com;
The Upper Volga Federal Agricultural Research Centre, Novy, Vladimir region*

The influence of lamina length and fertilizer dose on the fluctuating asymmetry (FA) and the shape of the lamina of winter and spring wheat (*Triticum aestivum* L.1753) were studied. Flag leaf blades (laminae) were collected from plants grown on gray forest soils of the Suzdal Opole (Vladimir region, Russia). Two doses of fertilizer were used. Intensive dose (1st) included nitrophos at a dose of $N_{60}P_{60}K_{60}$ for spring, and nitrogen $N_{60} + 40$ t of manure kg/ha for winter wheat. The highly intensive dose (2nd) included $N_{90}P_{90}K_{90}$ for spring and $N_{60} + 40$ t manure/ha + $N_{40}P_{40}K_{40}$ for winter wheat. Landmarks (50 pairs) were applied to the scanned image of leaves and morphogeometric (Procrustes) analysis of variance was performed with the building of an averaged configuration (centroid) and followed by the testing of fluctuating asymmetry by the Goodall *F*-criterion. The auxiliary indicators were the distances of the Procrustes space between the centers of the XY coordinate sets obtained by the interaction of the "leaf" and "side" sources of variance. The length of the plates and the value of the centroid size were smaller and the dose of fertilizer affected the shape of leaf blades ($p < 0.0003$) in spring wheat. The directional asymmetry occurred both in the control and experiment but was more characteristic of the spring wheat. The fluctuating asymmetry ($F = 4.8; p < 0.0001$) was significantly higher in the sample corresponding to the second dose (in winter wheat). The last was confirmed by morphometric distances were the highest between the centers of the sets, corresponding to the 2nd dose and control. The spring wheat showed no difference in FA. Thus, an increased dose of fertilizer caused a decrease in developmental stability in winter wheat. The spring wheat showed the high variability in shape and asymmetry, including the relationship between length, shape, and asymmetry, with no signs of reduced developmental stability.

Keywords: fluctuating asymmetry, wheat leaf blade, Geometric morphometrics, fertilizer doses

Популяция пшеницы, как и других растений, среди прочих характеристик обладает стабильностью развития, которая определяется по величине флуктуирующей асимметрии (ФА) листовой пластины, как разности в величине левого и правого билатерально-симметричных признаков.

Ранние работы в области стабильности развития и асимметрии проводились с использованием линейных или счетных признаков или сравнением площади половинок листа. При таком подходе обозначалась ось симметрии, строились перпендикулярные отрезки. Величина флуктуирующей асим-

метрии определялась по абсолютной разности, отнесенной к сумме значений признаков. Из-за продольного строения пластины злаковых, требуется достаточно большое количество измеряемых отрезков, а дальнейшие статистические процедуры включают проверку на нормальность распределения и статистическую оценку результатов. В последнее время созданы программы для автоматического сканирования и расчета асимметрии различных листьев, в том числе злаковых культур [1]. Морфологические характеристики, такие как форма, остаются за пределами такого подхода, который носит скорее описательный, но не аналитический характер.

Авторами был выбран метод геометрической морфометрии, который удобен тем, что позволяет сравнить асимметрию по форме края правой и левой половины листа. Согласно этому методу, метки с координатами ХУ расставляются равномерно по контуру изображения листовой пластины, способствуя увеличению числа степеней свободы *df*. Программа MorphoJ [2] регистрирует как общую изменчивость координат меток (компонент симметрии), так и билатерально-симметричную изменчивость координат парных меток (компонент асимметрии).

Исследование ФА в листьях древесных растений показало высокое содержание направленной асимметрии (НА), которое, как правило, искусственно увеличивает флуктуирующую асимметрию. В лесных ценопопуляциях ФА, как нормальная изменчивость листовых пластин, варьирует в широком диапазоне из-за неучтенных факторов, среди которых наиболее важный – освещение. Фактор урбанизации согласно недавним сообщениям оказывает серьезное влияние на снижение стабильности развития в популяциях березы повислой [3, 4].

Флуктуирующая асимметрия зависит от различных причин. Привлекают внимание генетические и эпигенетические факторы, хотя основное влияние оказывает среда, а саму ФА относят к фенотипической изменчивости, отдельно выделяя флуктуационную изменчивость [5]. В предыдущих работах была проведена оптимизация числа расставляемых меток и объема выборки [6, 7].

Длина листовых пластин заслуживает отдельного рассмотрения, так как изменчивость длины пластины ведет к возможному изменению как формы, так и асимметрии. Известно, что продолжительность вегетации озимых злаков длиннее, чем у яровых форм, отсюда ожидаемо большие размеры

пластин у озимой пшеницы и большая величина ФА, хотя линейная характеристика не всегда коррелирует с величиной ФА. Ранее исследования по сравнению стабильности развития пшеницы не проводились или выполнены недостаточно. Например, работы, проведенные О.А. Устюжаниновой с соавт., были направлены на определение коэффициента флуктуирующей асимметрии озимой и яровой пшеницы в зависимости от насыщенности севооборота бобовыми растениями на фоне внесения минеральных удобрений [8, 9]. Таким образом, рассматривалось не менее двух факторов, однако взаимодействие их, как и влияние года посева или метрические характеристики листовой пластины, не учитывались. Не учитывалось также возможное присутствие направленной асимметрии, как частого спутника ФА.

Пшеница, как и другие культурные сорта злаковых – удобные объекты для исследования, из-за равномерного освещения посевов и относительной генетической чистоты семенного материала.

В цель настоящей работы входило:

а) изучение влияния дозы удобрения на длину листовых пластин, их форму и величину ФА;

б) сравнение ФА и направленной асимметрии (НА) в листьях двух сортов пшеницы.

Морфogeометрический (Прокрустов) дисперсионный анализ проводился с построением усредненной конфигурации (центроида) и расчетом дисперсии парных меток по обеим сторонам пластины в сравнении их для определения величины флуктуирующей асимметрии.

Материалы и методы исследования

Флаговые листовые пластины собирались во второй половине июля 2021 г. на территории Федерального аграрного научного центра (г. Суздаль, Владимирская обл.) с координатами 56,2157°N; 40,5166°E. Работа проводилась в рамках многолетнего адаптивно-ландшафтного эксперимента, проводимого на серых лесных почвах Суздальского Ополья с принятой системой севооборота с использованием пшеницы (*Triticum aestivum* L.1753). Использовались два сорта: сорт Грань (озимая) и сорт Поэма (яровая).

Интенсивная доза (1-я) имела следующий состав: N₆₀P₆₀K₆₀ для яровой и N₆₀ + 40 т навоза/га + для озимой пшеницы. Высокоинтенсивная (2-я): N₉₀P₉₀K₉₀ для яровой и N₆₀ + 40 т навоза/га + N₄₀P₄₀K₄₀ для озимой пшеницы (индексы указывают на объем в килограммах вещества, вносимого на 1 га).

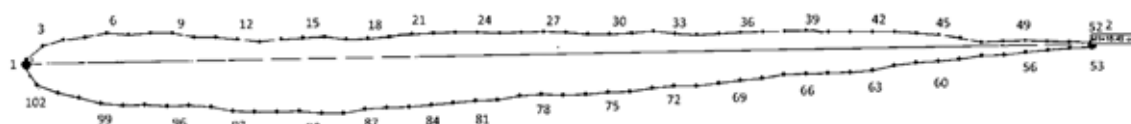


Рис. 1. Расположение основных (№ 1 и 2) и вспомогательных меток (№ 3–102)

Площадь делянки составляла $35 \text{ м}^2 (5 \times 7)$, а контролем служили полосы, разделявшие делянки с 1-й и 2-й дозами удобрения и полосы по краю поля. Обе дозы вносились непосредственно перед посевом.

Листовые пластины собирались случайно, избегая края делянки 1 м шириной. Выбирались сформированные симметричные пластины без изгибов и поражения микроорганизмами с длиной 16–18 см. С каждой делянки (всего четыре) собиралось 25–30 пластин, затем они вымачивались сутки в бытовом 5%-м детергенте, высушивались и наклеивались на бумагу абаксиальной стороной наверх и сканировались сканером Canon (300dpi) вместе с линейкой, градуированной по ГОСТ. Изображения сохранялись в формате JPG.

Нанесение первой и второй меток (пакет TPSDig2) проводилось в основании пластины, лишенной лигулы (язычка), и в верхушке пластины (апекс). Вспомогательные метки наносились по 50 по обоим краям – левому и правому. Эти метки считались полуметками, в отличие от первых – истинных меток, образующих ось симметрии (рис. 1).

Построение кривых проводилось первоначально нанесением 25–30 меток (outlines). Затем их число доводилось до 50 и проводилось выравнивание расстояний между ними. Такая процедура проводилась четыре раза: два раза по часовой и два раза – против часовой стрелки.

После определения координат всех меток и создания общего файла проводилась выбраковка выбросов, т.е. меток, визуальное выходящих за пределы доверительного интервала. Было удалено не более одного-двух выбросов из каждой выборки. После усреднения формы выборочная листовая пластина отображалась в виде усредненной симметричной формы – центроида. В результатах Прокрустова анализа (аналога двухфакторного дисперсионного анализа) индивидуальное различие («лист») указывало на различие в форме пластины. Статистически значимый эффект фактора «сторона» указывал на присутствие направ-

ленной асимметрии. Взаимодействие обоих факторов указывало на статистическую значимость флуктуирующей асимметрии.

Первый (главный) компонент вариации в матрице «лист×сторона» представлял наибольшую долю дисперсии меток и сравнивался для определения различия в асимметрии. Для нормализации выборок проводилось пермутационное размножение значений координат до 10 000 раз, статистическая значимость определялась на уровне 95%.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Длина и форма листовой пластины

Длина листовых пластин яровой пшеницы была меньше, чем у озимой пшеницы (соответственно $16,7 \pm 0,03$ и $17,0 \pm 0,03$ см; $df = 667$; $p < 0,05$). Выборки обладали нормальным распределением, так как значения эксцесса и асимметрии находились в пределах $\{-1 \div 1\}$, близкими были как значения коэффициентов вариации, соответственно $(3,11 \pm 0,03$ и $3,23 \pm 0,03)$, так и стандартных отклонений (0,52 и 0,55).

При второй дозе заметно было статистически значимое ($p < 0,05$) снижение длины листовой пластины яровой пшеницы ($16,83 \pm 0,05$ – 1-я доза и $16,5 \pm 0,05$ – 2-я доза; рис. 2).

У озимой пшеницы различия в длине пластины не было или оно было слабым ($p \geq 0,05$). В контроле длина пластин обоих сортов была заметно больше, чем после внесения второй дозы удобрения ($p = 0,001$). Авторы связывают это с превышением синтетических процессов увеличения биомассы колоса над фотосинтетической активностью и митотической активностью в листовой пластине.

Величина центроидной фигуры была также меньше у яровой пшеницы (0,076 и 0,080 – озимая; $df = 667$; $p < 0,01$). Прямой корреляции или регрессионной зависимости между длиной пластины и величиной центроида (средний квадрат расстояния от координат до геометрического центра) получено не было ($p > 0,05$).

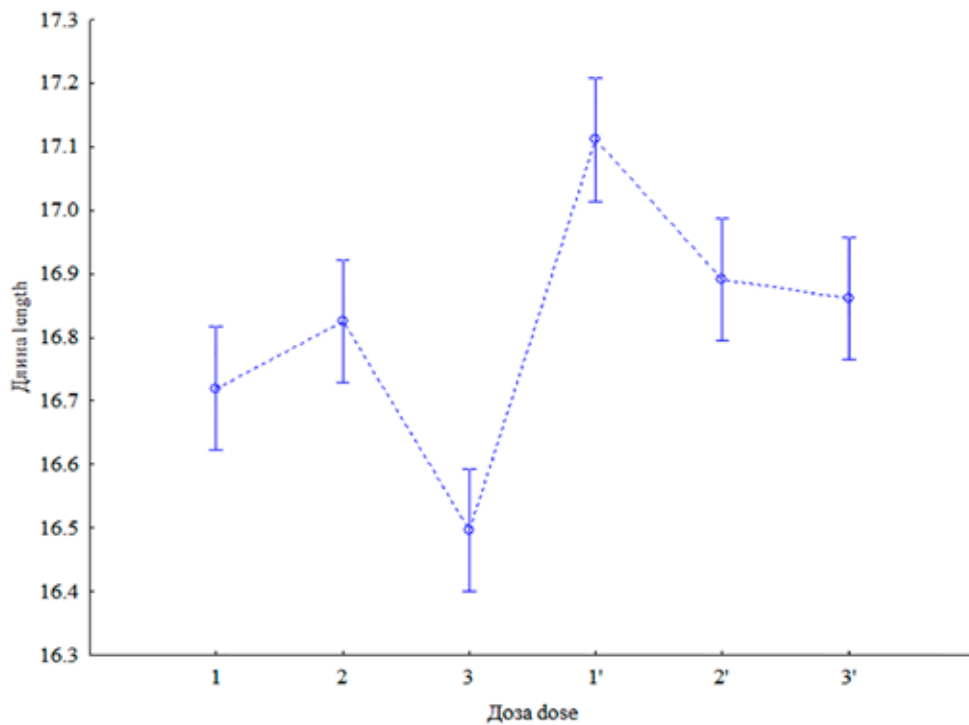


Рис. 2. Влияние двух доз удобрения на длину пластины (95 %-ный доверительный интервал). 1 – яровая контр.; 2 – яровая $N_{60}P_{60}K_{60}$; 3 – яровая $N_{90}P_{90}K_{90}$ ($p << 0,05$) и 1' – озимая контр. 2' – озимая $N_{60} + 40$ т навоза/га; 3' – озимая $N_{60} + 40$ т навоза/га + $N_{40}P_{40}K_{40}$ ($p \geq 0,05$)

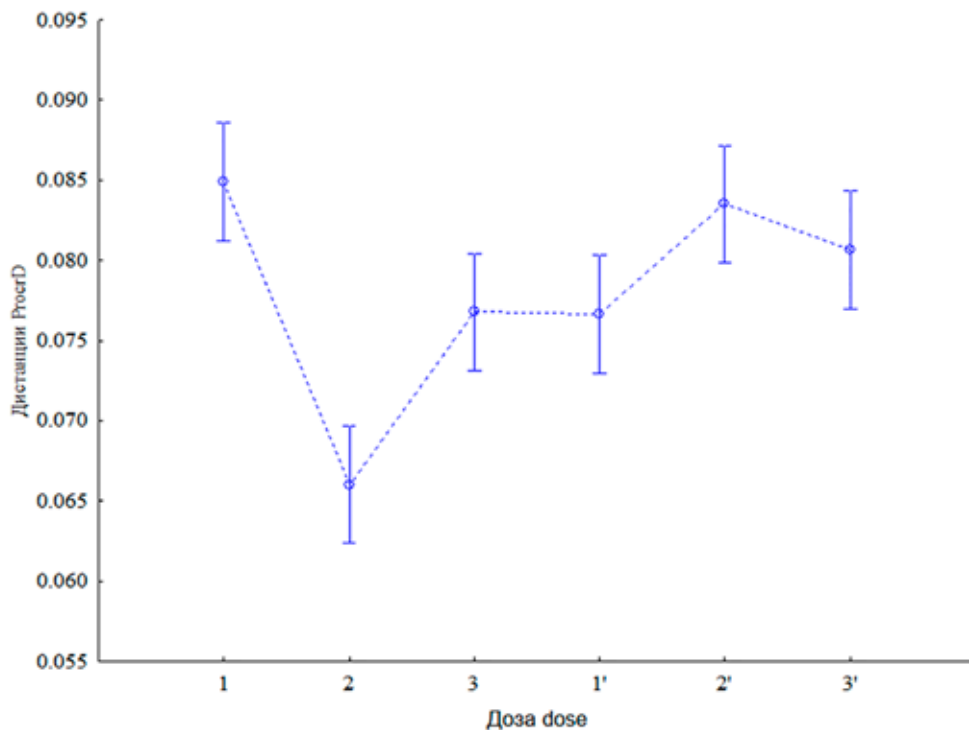


Рис. 3. Влияние двух доз удобрения на величину усредненной фигуры (95 %-ный доверительный интервал). 1 – яровая контр.; 2 – яровая $N_{60}P_{60}K_{60}$; 3 – яровая $N_{90}P_{90}K_{90}$ ($p << 0,05$) и: 1' – озимая контр. 2' – озимая $N_{60} + 40$ т навоза/га; 3' – озимая $N_{60} + 40$ т навоза/га + $N_{40}P_{40}K_{40}$ ($p \geq 0,05$)

Таблица 1

Различие в форме (лист), в направленной асимметрии (сторона)
и во флуктуирующей асимметрии (лист × сторона)

Источник вариации	Озимая					Яровая			
	<i>Effect</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>df</i>	<i>F</i>
Контроль	лист (1)	0,017	0,00001	2700	2,09***	0,013	0,000005	2700	2,72***
	сторона (2)	0,000	0,00000	100	0,56 ^{ns}	0,0003	0,000003	100	1,85***
	(1)×(2)	0,008	0,00000	2700	2,22***	0,005	0,000002	2700	1,63***
	ошибка (3)	0,023	0,00000	16800		0,018	0,000001	16400	
1-я доза	(1)	0,017	0,00001	2700	1,37***	0,015	0,00001	2700	1,49***
	(2)	0,001	0,00001	100	1,88***	0,002	0,00002	100	4,34***
	(1)×(2)	0,012	0,00000	2700	2,67***	0,010	0,00000	2700	4,04***
	(3)	0,028	0,00000	16600		0,016	0,00000	16800	
2-я доза	(1)	0,014	0,00001	2700	1,32***	0,017	0,00	2 700	1,64***
	(2)	0,000	0,00000	100	0,71 ^{ns}	0,001	0,00001	100	1,41*
	(1)×(2)	0,011	0,00000	2700	4,82***	0,010	0,00	2 700	3,77***
	(3)	0,014	0,00000	16800		0,017	0,00000	16 800	

Примечание. *SS* – сумма квадратов; *df* – степень свободы; *MS* – средний квадрат; *F* – критерий Гудолла; *** – $p < 0,0001$; * – $p < 0,01$.

У яровой пшеницы зависимость величины центроида от дозы удобрения была высокой ($F = 22,9$; $p \ll 0,05$), у озимой – практически незначимой ($F = 3,8$; $p = 0,02$; рис. 3).

Таким образом, связь между длиной, формой пластины и дозой удобрения была характерна для яровой пшеницы. Для озимой пшеницы серьезной связи между дозой и формой пластины получено не было.

2. Асимметрия листовых пластин в Прокрустовом анализе

Результаты Прокрустова дисперсионного анализа представлены в табл. 1.

Величина ФА (лист × сторона) находилась на одном уровне статистической значимости ($p < 0,0001$), и была заметна тенденция к повышению во второй дозе удобрения по сравнению с контролем. У озимой формы критерий Гудолла повышался от $F = 2,22$ до $4,82$ и у яровой от $F = 1,63$ до $3,77$.

Направленная асимметрия (сторона) была более характерна для яровой пшеницы, что затрудняло определение величины ФА и стабильности развития.

Индивидуальное различие формы (лист) варьировало от больших значений в контроле ($F = 2,09$ – озимая и $F = 2,72$ – яровая) до более низких значений F во второй дозе, соответственно $F = 1,32$ – озимая и $F = 1,64$ – яровая. Авторы относят это явление к рав-

номерному распределению питательных элементов и выравниванию формы пластины в процессе получения важных минералов – азота, фосфора и калия.

У озимой пшеницы сила связи *RV* между величиной ФА и центроидным размером была незначимой: $RV = 0,02 - 0,03$ ($p > 0,05$). Проверка связи ФА – форма у яровой пшеницы показала высокую связь: $RV = 0,06 - 0,15$ ($p < 0,001$), то есть отчетливее прослеживалась связь между дозой, формой и ФА, что авторами данной статьи было отнесено к генетическим и морфологическим особенностям яровой пшеницы.

3. Определение различия в асимметрии с помощью морфogeометрических расстояний

Канонический вариационный анализ выполнялся на основе ковариационных матриц координат ХУ меток взаимодействия «лист × сторона». Использовались первые наиболее важные компоненты, занимавшие более 70%. Между центрами значений в Прокрустовом усредненном пространстве рассчитывались расстояния, указывавшие на их различие (табл. 2).

Статистически значимое различие в асимметрии получено только у озимой пшеницы: 1-я доза – контроль ($0,009$; $p < 0,001$) и 2-я доза – контроль ($0,006$; $p < 0,001$).

Таблица 2

Прокрустовы расстояния между центрами множеств

Озимая			Яровая		
	1 доза	2 доза		1 доза	2 доза
1 доза	х	х	1 доза	х	х
2 доза	0,003 ($p \leq 0,05$)	х	2 доза	0,003 ($p > 0,05$)	х
контр.	0,009 ($p < 0,0001$)	0,006 ($p < 0,0001$)	контр.	0,003 ($p > 0,05$)	0,002 ($p > 0,05$)



Рис. 4. Связь между дозой и морфогометрическими характеристиками листовой пластины. Сплошная стрелка показывает значимую связь ($p < 0,05$), пунктирная стрелка – отсутствие или слабую связь ($p \geq 0,05$)

Различие в ФА в морфогометрическом пространстве с помощью канонических переменных между центрами множеств координат было больше выражено у озимой пшеницы.

Таким образом, озимая пшеница показала статистически значимое разделение множеств, т.е. анализ главных компонент подтверждал влияние дозы удобрения на величину ФА пластин. Различие между контролем и экспериментом в дистанциях Махаланобиса, с учетом эллипсоидного распределения, было у озимой – 3,2, у яровой – 2,0 ($p < 0,0001$). Пластины озимого сорта различались по асимметричности, как и по результатам Прокрустова анализа (низкие значения НА и высокие ФА), так и в вариационном анализе. В противоположность, листья яровой пшеницы имели меньшую длину, варьировали по форме и обладали высокой направленной асимметрией.

Заключение

Влияние длины на форму не ограничивается лишь одной длиной, а может зависеть и от других неисследованных факторов. Антибатное влияние дозы на длину пластины было получено только у яровой пшеницы. Автор объясняет это коротким вегетативным периодом яровой пшеницы с формированием анатомических структур с широким диапазоном изменчивости, в том числе флуктуационной изменчивости, с вы-

соким стандартным отклонением величины ФА. Таким образом, высокая гетерогенность формы влияла на флуктуирующую асимметрию пластин яровой пшеницы.

В работе, выполненной в Калужской области, было получено увеличение ФА при повышенной дозе минеральных удобрений. В предлагаемой работе результаты анализа главных компонент подтвердили такую тенденцию.

Отличие в величине ФА озимой пшеницы, полученной при разных дозах удобрения, означало влияние высокоинтенсивного органоминерального удобрения на асимметричность листовых пластин. Морфологическое различие пластин двух форм пшеницы отражало генетическое содержание асимметрии. На это указывало и различное соотношение ФА/НА у исследованных сортов. Связь длина – форма – ФА сильнее проявлялась у яровой пшеницы (рис. 4).

Генетические особенности и разные сроки посева не позволяли четко сопоставлять обе формы пшеницы по стабильности развития. Высокоинтенсивная доза могла способствовать неравномерному росту клеток в пластинах яровой пшеницы, что объясняет высокое присутствие направленной асимметрии, включая и контрольную выборку.

Ранее на примере древесных растений продемонстрировано, что пластическая и флуктуационная изменчивость находились в обратной связи. Напротив, изучение

мерных признаков пшеницы не показало такой зависимости. В сравнении с озимой пшеницей пластическая изменчивость представляется скорее свойством яровой пшеницы, которое сопряжено с флуктуационной изменчивостью. Последующее изучение будет направлено на определение асимметрии при воздействии других доз удобрения и влияния климатических факторов.

Список литературы

1. Graham J.H., Whitesell M., Fleming M., Or H.H., Nevo T., Raz S. Fluctuating asymmetry of plant leaves: batch processing with LAMINA and continuous symmetry measures // *Symmetry*. 2015. Vol. 7, Is. 1. P. 255–268. DOI: 10.3390/sym7010255.
2. Klingenberg C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics // *Mol. Ecol. Res.* 2011. Is. 11. P. 353–357. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x.
3. Baranov S.G., Bibik T.S., Ilin L.I. Precision of measurement and directed asymmetry in leaf plates *Betula pendula* Roth // *Vestnik of the Kazan State Agrarian University*. 2017. № 2 (44). P. 14–21.
4. Shadrina E., Turmukhametova N., Soldatova V., Volpert Y., Korotchenko I., Pervyshina G. Fluctuating Asymmetry in Morphological Characteristics of *Betula Pendula* Roth Leaf under Conditions of Urban Ecosystems: Evaluation of the Multi-Factor Negative Impact // *Symmetry* 2020. № 12. 1317. DOI: 10.3390/sym12081317.
5. Тиходеев О.Н. Классификация изменчивости по факторам, определяющим фенотип: традиционные взгляды и их современная ревизия // *Экологическая генетика*. 2013. 11 (3). С. 79–92. DOI: 10.17816/ecogen11379-92.
6. Baranov S.G., Vinokurov I.Yu., Schukin M.V., Schukina I.V., Maltsev I.E., Zikov A.A., Ananieff V., Fedorova L.V. Does Fertilizer Influence Shape and Asymmetry in Wheat Leaf? // *Computer Science On-line Conference*. Springer. Cham. 2020. P. 153–160. DOI: 10.1007/978-3-030-51971-1_12.
7. Baranov S.G., Vinokurov I.Yu., Zikov I.E., Fedorova L.V., Antsyshkina A.M. Two kinds of asymmetry in spring wheat leaf blade // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* // IOP Publishing. 2021. Vol. 839. 032037. DOI: 10.1088/1755-1315/839/3/03203770.
8. Устюжанина О.А., Соколова Л.А. Коэффициент флуктуирующей асимметрии для пшениц озимой и яровой в севооборотах с насыщенностью элементами питания в разной форме // *Проблемы региональной экологии*. 2014. № 6. С. 59–62.
9. Устюжанина О.А., Соколова Л.А., Голофтеева А.С., Бурлуцкий В.А. Влияние разных минеральных фонов на урожайность и коэффициент флуктуирующей асимметрии для озимой и яровой пшениц // *Проблемы региональной экологии*. 2017. № 3. С. 99–102.