

СТАТЬЯ

УДК 63:581.41:581.451:582.734.6
DOI 10.17513/use.38276

СРАВНИТЕЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДВУХ ВИДОВ РОДА *PRUNUS* L.

¹Зыков И.Е., ²Баранов С.Г., ³Федорова Л.В., ⁴Липпонен И.Н., ¹Прокопенко А.Д.

¹ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет»,
Орехово-Зуево, e-mail: zykov-oz@yandex.ru;

²ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени А.Г. и Н.Г. Столетовых»,
Владимир, e-mail: bar.serg58@gmail.com;

³ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова», Москва, e-mail: fedorova-oz@yandex.ru;

⁴Полярно-альпийский ботанический сад-институт имени Н.А. Аврорина,
Апатиты, e-mail: lipponen-in@yandex.ru

Проанализированы форма и асимметрия листовых пластин двух видов рода *Prunus* L.: черемухи обыкновенной (*P. padus* L.) и черемухи Маака (*P. maackii* Rupr.) в г. Москве. Особенности формы тестировались методом геометрической морфометрии. Флуктуирующая и направленная асимметрия определялись аналогом двухфакторного дисперсионного анализа в прокрустовом пространстве. Для сравнения использовалась формула нормирующей разности (ФА 2). Расчеты выполнялись в среде STATISTICA 10 (Stat.Ink) и включали: проверку на нормальность распределения (L–R) с помощью теста Колмогорова – Смирнова; оценку различия между размерами признаков и длиной листьев; корреляционный анализ Пирсона для оценки связи величины признака (L+R) и разности (L–R). По метрическому признаку ширине половины листа флуктуирующая асимметрия названных видов не отличалась. В морфо-геометрическом анализе общая асимметрия преимущественно содержала направленную асимметрию, превышавшую флуктуирующую асимметрию в 2,5–10,0 раза. Оба вида обладали высокой вариативностью формы листовых пластин ($p < 0,0001$). Морфо-геометрический метод выявил слабое проявление флуктуирующей асимметрии или ее отсутствие на фоне явственного различия в форме ($p < 0,001$), особенно листьев черемухи Маака. Метод геометрической морфометрии оказался эффективнее метода на основе метрических признаков и позволил установить, что в разные годы форма листовых пластин в большей степени зависела от условий среды, чем от генотипических особенностей исследованных видов.

Ключевые слова: *Prunus padus*, *Prunus maackii*, флуктуирующая асимметрия, двухфакторный дисперсионный анализ, морфо-геометрический анализ

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF TWO SPECIES OF THE GENUS *PRUNUS* L.

¹Zykov I.E., ²Baranov S.G., ³Fedorova L.V., ⁴Lipponen I.N., ¹Prokopenko A.D.

¹State University of Humanities and Technology, Orekhovo-Zuyevo, e-mail: zykov-oz@yandex.ru;

²Vladimir State University named after A.G. and N.G. Stoletovs, Vladimir,
e-mail: bar.serg58@gmail.com;

³The First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Moscow,
e-mail: fedorova-oz@yandex.ru;

⁴Polar-Alpine Botanical Garden-Institute named after N.A. Avrorin, Apatity,
e-mail: lipponen-in@yandex.ru

The shape and asymmetry of the leaf blades of two species of the genus *Prunus* L. it analyzed: the common bird cherry (*P. padus* L.) and the Maak bird cherry (*P. maackii* Rupr.) in Moscow. The shape features tested using geometric morphometrics. Fluctuating and directional asymmetry were determined by an analogue of two-factor analysis of variance in Procrustes space. For comparison, the normalizing difference formula (FA 2) used. The calculations were performed in the STATISTICA 10 environment (Stat.Ink) and included: checking for the normality of the distribution (L–R) using the Kolmogorov-Smirnov test; evaluating the difference between the size of the signs and the length of the leaves; Pearson correlation analysis to assess the relationship between the magnitude of the sign (L+R) and the difference (L–R). The fluctuating asymmetry of the named species did not differ according to the metric feature of the width of half of the leaf. In the morpho-geometric analysis, the general asymmetry mainly contained directional asymmetry, exceeding the fluctuating asymmetry by 2.5-10.0 times. Both species had high variability in the shape of leaf blades ($p < 0.0001$). The morpho-geometric method revealed a weak manifestation of fluctuating asymmetry or its absence, against the background of a clear difference in shape ($p < 0,001$), especially the leaves of the Maak cherry. The geometric morphometrics proved to be more effective than the method based on metric features and allowed us to establish that in different years the shape of leaf plates depended more on environmental conditions than on the genotypic features of the studied species.

Keywords: *Prunus padus*, *Prunus maackii*, fluctuating asymmetry, two-way analysis of variance, morpho-geometric analysis

Черемуха обыкновенная (*Prunus padus* L.) – древовидное тетраплоидное растение, не образующее гибридов, обычное для большей части территории России, распространено на север до Кольского полуострова, на восток до Охотского моря. По современной классификации *P. padus* относится к секции *Laurocerasus* подрода Вишня (*Cerasus* (Mill.) A. Gray). Для листовых пластин характерно слабое дуговидное жилкование и удлиненная правая половина на абаксиальной поверхности, то есть ее листья нельзя назвать строго симметричными. Жилки листовых пластин *P. padus* не имеют четких окончаний, поэтому для определения величины флуктуирующей асимметрии используется признак ширины половинок листа [1].

Дальневосточный вид – черемуха Маака (*P. maackii* Rupr.), названная в честь исследователя Сибири Ричарда Карловича Маака, значительно отличается от обыкновенной черемухи по окраске ствола, форме кроны и соцветий. У этого дерева листья крупные, длиной до 12 см, опушенные, овальные или широколанцетные с оттянутой вершиной, клиновидным основанием и пильчато-реснитчатым краем. В природе встречается в Приморском крае и Амурской области, за пределами Российской Федерации – в КНР (северо-восточные провинции) и на Корейском полуострове.

Известно, что оба вида обладают значительной внутривидовой фенотипической изменчивостью [2], а черемуха обыкновенная, кроме того, проявляет высокий полиморфизм на генотипическом уровне [3, 4]. В предыдущих исследованиях установлено, что *P. padus* обладала большей изменчивостью формы листовых пластин в северных популяциях, например в Мурманске (68°58'00" с.ш., 33°05'00" в.д.). Эта изменчивость сопровождалась меньшей асимметричностью, по сравнению с подмосковной (Электросталь, 55°47'22" с.ш., 38°26'48" в.д.) и владимирской (56°08'11" с.ш., 40°23'47" в.д.) популяциями, где получены более высокие значения асимметрии [5].

Целью работы являлся ответ на вопрос: существуют ли различия между двумя видами в флуктуационной изменчивости листовых пластин.

В задачи входило определение и сравнение флуктуирующей асимметрии (ФА) метрическим способом и при помощи координат меток, наносимых по краям листовых пластин, а также сравнение их формы.

Материалы и методы исследования

Листья обоих видов черемухи, максимально близкие по размерам, были собраны в 2021–2023 гг. (август) с нижних частей крон деревьев в Москве: черемухи Маака – в районе Тропарево-Никулино (55°40'00" с.ш., 37°28'00" в.д.), черемухи обыкновенной – в парке Серебряный Бор (Хорошевский лесопарк) (55°46'49" с.ш., 37°24'58" в.д.), являющимся памятником природы регионального значения (рис. 1).



Рис. 1. Внешний вид листовой пластины. Слева – черемуха Маака (*Prunus maackii* Rupr.), справа – черемуха обыкновенная (*Prunus padus* L.)

Сбор листьев проведен в разных ценопопуляциях с деревьев высотой до 15 м, с тщательной выбраковкой крупных и мелких листовых пластин. В каждой точке отобрано по 10 листьев с 7 деревьев. Листья высушены под прессом и отсканированы с сантиметровой линейкой. Затем проведено двукратное измерение с помощью дигитайзера Dig2 из пакета серии TPS (Rholf, 2014). Базовые статистические анализы выполнены в таблицах Excel. Проверены свойства частотного распределения (L–R), где L и R – величина левого и правого признака.

Основные расчеты проведены в таблицах STATISTICA 10 (Stat.Ink) и включают:

- проверку на нормальность распределения (L–R) с помощью теста Колмогорова – Смирнова;
- оценку различия между размерами признаков и длиной листьев;
- корреляционный анализ Пирсона для оценки связи величины признака (L+R) и разности (L–R).

Каждому значению L и R присваивался код «левый» или «правый» и проводился двухфакторный дисперсионный анализ. Полученные данные средних квадратов (MS) и степеней свободы (df) переносились в Excel (FA_calc; Palmer, 2003). После этого проводился анализ смешанной модели с ранжировкой p -значения (коррекция Бонферони) и оценка уровня направленной асимметрии (НА) по t -критерию.

Обобщенный прокрустов анализ (GPA) и ковариационный анализ проведены в программе MorphoJ (Klingenberg, 2011). Для этого были нанесены две истинные (true landmark) метки в основании и вершине каждой листовой пластины. Затем наносилась ломаная кривая по всему контуру листа с 30–35 метками и автоматически равномерно выставлялось 100 полуметок (semilandmark), по 50 с левой и правой стороны (рис. 2).

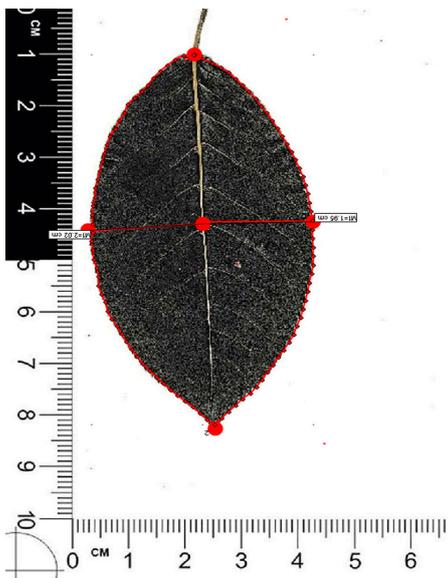


Рис. 2. Мерный признак ширины половины листа, две истинные метки в его основании и вершине и 100 полуметок по контуру листовой пластины (TPSDig2) [1]

Такая разметка выполнялась дважды, по направлению и против часовой стрелки. Координаты меток переводились из текстового формата в формат TPS. Таким образом, каждой листовой пластине соответствовали 2 файла с координатами XY для 102 меток (рис. 2). Файлы объединялись (TPSutil 1.78; опция append fail), создавался один файл, позволявший генерировать консенсусный файл со строгой симметрией для последующего дисперсионного анализа (определе-

ние ФА и НА) и ковариационного анализа (различие в форме и асимметрии) на основе прокрустовых дистанций.

Дисперсия координат включала компонент формы и компонент асимметричности. Асимметричность объединяла оба типа асимметрии: флуктуирующую и направленную. Двухфакторный дисперсионный анализ (случайный фактор «лист» и фиксированный – «сторона») позволял определять ФА и НА и констатировать различия в форме листовых пластинок изучаемой популяции (фактор «лист»). Величина флуктуирующей и направленной асимметрии определялись по F критерию Гудолла взаимодействия «лист × сторона» (ФА) и фактора «сторона» (НА).

Пермутационное размножение значений прокрустовых расстояний до 10000 раз использовалось для нормализации, во всех анализах принимался статистический уровень значимости 95 %.

Результаты исследования и их обсуждение

а) Мерные признаки

Как по длине, так и по ширине листья различались существенно. Среднее значение длины листа от основания до вершины у черемухи Маака было больше ($10,78 \pm 0,18$) ($p = 0,003$), чем у черемухи обыкновенной – ($10,02 \pm 0,21$), ширины листа – больше у черемухи обыкновенной ($2,7 \pm 0,024$) ($p < 0,001$), по сравнению с черемухой Маака ($2,4 \pm 0,018$).

б) Нормальность распределения и другие виды асимметрии

Определение нормальности распределения разности L–R, взятой со знаком – важный этап работы по определению флуктуирующей асимметрии. Наиболее простым способом является постановка теста Колмогорова – Смирнова с проверкой нулевой гипотезы на соответствие имеющегося распределения теоретическому (нормальному). В нашем случае у обоих видов уровень p превышал 0,02, что свидетельствовало о правильности нулевой гипотезы. T -тест с разными дисперсиями (для большей точности) выборок L и R на направленную асимметрию дал следующие результаты: $P. padus$ – $df = 258$; $p = 0,6$; $P. maackii$ – $df = 130$; $p > 0,05$.

Антисимметрию определяли по корреляции между выборками L и R. При непараметрическом распределении принято использовать корреляцию Спирмена, а при параметрическом – корреляцию Пирсо-

на. Отрицательная связь свидетельствует о присутствии антисимметрии [6]. В нашем случае коэффициентом r Спирмена выявлена слабая отрицательная корреляция ($r = -0,17$; $p < 0,05$), указывающая скорее на обычную пластическую зависимость между билатеральными признаками, или слабое присутствие антисимметрии (эксцесс распределения (L–R) $\gamma = -0,45 \pm 0,4$).

в) Аллометрия

Для проверки аллометрической связи между величиной признака и разностью L–R (абсолютное значение) использована корреляция Пирсона. Получена слабо отрицательная связь, $r = -0,013$ (*P. taackii*) и $r = -0,022$ (*P. padus*), везде $-p > 0,05$. Эти результаты подтверждают отсутствие аллометрической связи и способствуют верифицированному определению флуктуирующей асимметрии.

г) Двухфакторный дисперсионный анализ

Для сравнения были использованы данные предыдущих лет [1, 5], полученные в популяциях черемухи обыкновенной в Московской области. В табл. 1 показаны результаты смешанной модели двухфакторного анализа, ошибка измерения, уровень значимости Бонферрони и значение индекса FA10 (FA_calc.Excel).

Такая модель смешанного двухфакторного анализа учитывает дисперсии значений L, R и размеров листовых пластин. Метод следует применять для отсеивания незначимой НА и учета ошибки измерения не только в исследованиях ФА листовых пластин, но и хвойных растений при тестировании отклика на индустриальный стресс [6, 7]. Несмотря на преимущества этого

анализа в получении «чистой» ФА, индекс ФА10 имеет тенденцию к завышению [8]. Практически уровень ФА10 был одинаков во всех популяциях, то есть оба вида черемухи не отличались по флуктуирующей асимметрии в разные годы.

д) Метод геометрической морфометрии

Метод геометрической морфометрии основан на преобразовании формы биологического объекта в билатерально-симметричную фигуру. Для этой цели выполняется алгоритм зеркального отражения билатеральных структур, поворот меток для усреднения формы и размера. Консенсусная фигура (центроид) служит своеобразным эталоном. Относительно центроида рассчитываются отклонения в дисперсии координат меток. Прокрустово расстояние (Procrustes distance) – квадратный корень отклонения меток от усредненного значения, используется для определения билатеральной асимметрии.

Антисимметрия – это редкое явление в листовых пластинах. Нормализация большим числом случайных повторений, как правило, сглаживает ее проявление.

Метод геометрической морфометрии целесообразно использовать при анализе популяций с листовыми пластинами разной величины, при тестировании изменчивости формы, пластической изменчивости и особенностей шума онтогенетического развития [1].

Морфо-геометрический анализ, основанный на координатах меток, расставляемых по контуру листовой пластины, показал изменчивость общей асимметрии и формы (табл. 2).

Таблица 1

Индекс ФА10, рассчитанный по метрическому признаку ширины листовой пластины

Site, year	2 way ANOVA, p values						Measurement error % from variance difference L and R	Bonferroni α	FA10	df
	side		leaf		side \times leaf					
	F	p	F	p	F	p				
<i>P. padus</i> (2023)	1.53	0.221	21.50	0.00	7.62	0.00	13.12	0.01	0.01*	47.91
<i>P. taackii</i> (2023)	4.97	0.031	29.16	0.00	5.96	0.00	16.77	0.02	0.01*	29.38
<i>P. padus</i> (2021)	2.75	0.103	46.57	0.00	4.10	0.00	24.40	0.03	0.00*	33.23
<i>P. padus</i> (2022)	0.08	0.779	107.36	0.00	1.10	0.306	90.94	0.05	0.00 ^{ns}	0.40

Обозначения: site, year – место сбора, год; 2 way ANOVA, p values – p -уровень значимости смешанной модели двухфакторного дисперсионного анализа; side – сторона; leaf – лист; measurement error... – ошибка измерения дисперсии разности L – R, взятой со знаком (%); Bonferroni α – уровень значимости α по коррекции Бонферрони; * – статистически значимо; ns – статистически не значимо.

Таблица 2

Прокрустовы дистанции (множества координат двух видов рода *Prunus* L.)

	Асимметрия			Форма		
	<i>P. padus</i> (2023)	<i>P. maackii</i> (2023)	<i>P. padus</i> (2021)	<i>P. padus</i> (2023)	<i>P. maackii</i> (2023)	<i>P. padus</i> (2021)
<i>P. padus</i> (2023)	х			х		
<i>P. maackii</i> (2023)	0.004 ^{ns}	х		0.04 ^{**}	х	
<i>P. padus</i> (2021)	0.03 [*]	0.032 [*]	х	0.02 [*]	0.05 ^{**}	х

Обозначения: ns – $p > 0.05$; * – $p = 0.001$; ** – $p < 0.0001$.

По асимметрии листовых пластин *P. maackii* отличалась от *P. padus* на уровне $p = 0,001$, как и ранее изученные популяции черемухи обыкновенной различались между собой [5]. Форма листовых пластин также имела различия, но на более высоком статистическом уровне значимости ($p < 0,0001$).

Методом геометрической морфометрии установлено, что индивидуальное различие листовых пластин варьирует у черемухи обыкновенной от незначимого ($F = 0,1$; $p = 0,9$) до существенно значимого ($F = 2,79$; $p < 0,0001$). Черемуха Маака обладала более выраженной вариативностью формы ($F = 4,41$; $p < 0,0001$). В обеих популяциях выявлена направленная асимметрия $p < 0,0001$.

Для черемухи Маака статистически значимая флуктуирующая асимметрия не установлена («лист×сторона»; $F = 1,03$; $p = 0,19$). В популяции *P. padus* выявлена статистически значимая ФА. Коэффициент Гудолла F был в 2,5–10,0 раза выше в факторе «сторона» (направленная асимметрия), что свидетельствовало о превалировании направленной асимметрии над флуктуирующей в листьях черемухи обыкновенной.

Заключение

Форма листовых пластин *P. maackii* более вариабельна при низкой или незначимой флуктуирующей асимметрии. Вероятная причина этого – высокая доля фенотипической изменчивости. Проявление направленной асимметрии следует рассматривать как генотипическое свойство генетического полиморфизма. Возможно, что низкая флуктуирующая асимметрия листовых пластин связана с морозоустойчивостью обоих видов черемухи и, соответственно, с высокой стабильностью их развития в разных регионах. Метод геометрической морфометрии

может быть использован для оценки влияния шума развития, который, в свою очередь, имеет генотипическое и чисто средовое происхождение. По сравнению с мерными признаками, координаты ХУ меток скорее объясняют влияние среды. Остается открытым вопрос о корреляционных особенностях мерных признаков и их связи с формой листовых пластин.

Возможно как независимое, так и взаимозависимое проявление пластической и флуктуационной изменчивости. Для растений освещение и температура – важнейшие экофакторы, влияющие на индуцирование и моделирование как детерминистских, так и стохастических процессов шума онтогенетического развития [9], который нейтрализует возмущения в биологической системе и, вероятно, обладает высокой вариативностью [10].

С одной стороны, флуктуирующая асимметрия – случайный сигнал, отражающий индуцированный всплеск внутреннего генетического шума развития, с другой стороны – сигнал, детерминированный внешним воздействием среды. Черемуха обыкновенная имеет отклонение в стабильности развития, что отражает внутривидовую специфическую ответную реакцию. Обоснованием может служить высокая термофильность этого вида и суженная норма температурной реакции.

Несмотря на значительную вариабельность листьев черемухи Маака флуктуационная изменчивость для нее не установлена. Такая зависимость характеризует высокую пластичность вида в совокупности с низкой ФА или ее отсутствием.

Математическое моделирование широко используется для изучения пластической изменчивости как адаптивного фенотипического свойства. Связь пластичности и нестабильности определяется и на основе

молекулярно-генетической базы разных локусов генов с выводом о негативной корреляции между ФА и пластической изменчивостью. Такие работы имеют значение для определения локализации генов.

Список литературы

1. Зыков И.Е., Баранов С.Г., Полоскова Е.Ю., Липпонен И.Н., Гончарова О.А., Прокопенко А.Д. Популяционная изменчивость листовых пластин *Prunus adus* L. // Успехи современного естествознания, 2022. № 4. С. 29–34. DOI: 10.17513/use37805.
2. Локтева А.В., Симагин В.С. Изменчивость признаков листа вишни Маака (*Prunus maackkii* Rupr.). Региональные геосистемы. 2013. № 24 (167). С. 25–31.
3. Бурлаков Ю.А. Генетическая изменчивость *Padus avium* Mill. в Евразии. М., 2018. 18 с.
4. Баранов С.Г. Соотношение генотип-фенотип, определяемое геометрической морфометрией // Journal of bioinformatics and genomics. 2023. № 2 (20). DOI: 10.18454/jbg2023.20.2.003.
5. Baranov S., Zykov I., Prokopenko A., Fedorova L., Lipponen I. Data distribution and asymmetry in leaf blade *Prunus padus* L. E3S Web of Conferences // EDP Sciences. 2023. Vol. 420. P. 01001. DOI: 10.1051/e3sconf/202342001001.
6. Kozlov G., Pushkarev M., Trubnikova A., Goreva A., Ivanova M., Fedorova N., Sovestnov A. Fluctuating asymmetry of silver birch *Betula pendula* Roth in industrial and recreational zones of the South-West of St. Petersburg. E3S Web of Conferences // EDP Sciences. 2020. Vol. 215. P. 03002. DOI: 10.1051/e3sconf/202021503002.
7. Kozlov G., Pushkarev M., Belyaeva I., Maksimova A., Shvidkoy S., Belyaev D. Fluctuating asymmetry of the needles of *Pinus brutia* var. *pityusa* (STEVEN) SILBA, 1985, growing in industrial and recreational areas in Tuapse. E3S Web of Conferences // EDP Sciences. 2020. Vol. 224. P. 04044. DOI: 10.1051/e3sconf/202022404044.
8. Graham J.H., Emlen J.M., Freeman D.C., Leamy L.J., Kieser J.A. Directional asymmetry and the measurement of developmental instability // Biological Journal of the Linnean Society. 1998. Vol. 64. № 1. P. 1–16. DOI: 10.1006/bijl1998.0217.
9. Graham J.H. Nature, nurture, and noise: Developmental instability, fluctuating asymmetry, and the causes of phenotypic variation. *Symmetry*. 2021. Vol. 13. № 7. P. 1–14. DOI: 10.3390/sym13071204.
10. Salazar-Ciudad I., Jernvall J., Newman S.A. Mechanisms of pattern formation in development and evolution // *Development*. 2003. Vol. 130. P. 2027–2037. DOI: 10.1242/dev.00425.