

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФЛУКТУИРУЮЩЕЙ АСИММЕТРИИ ЛИСТОВОЙ ПЛАСТИНКИ *BETULA PENDULA* ROTH ПРИ РАЗНЫХ МЕТОДАХ ФИКСАЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

© 2020

Жуйкова Т.В., Попова А.С., Мелинг Э.В.

Нижнетагильский государственный социально-педагогический институт (филиал)  
Российского государственного профессионально-педагогического университета  
(г. Нижний Тагил, Свердловская область, Российская Федерация)

**Аннотация.** Определено влияние методов фиксации растительного материала на показатель флуктуирующей асимметрии (ФА) листьев *Betula pendula* Roth. В качестве методов использованы гербаризация под прессом и фиксация листьев в растворе этилового спирта (45%). Биологический материал собран в естественных природных фитоценозах Притагильской зоны Среднего Урала и на техногенно трансформированных территориях, включая загрязнение почв тяжелыми металлами. Уровень ФА листовых пластинок *Betula pendula* Roth, полученный на свежесобранном материале, увеличивается в градиенте токсической нагрузки и отражает закономерное увеличение почвенного загрязнения тяжелыми металлами (Zn, Cu, Pb, Cd и др.). Наименьшее отклонение от реальных значений ФА, полученных на свежесобранном материале, дает метод гербаризации листьев. Коэффициенты корреляции 0,94–0,99. Фиксация растительного материала в спиртовом растворе приводит более чем к 10-кратному отклонению значений ФА от реальных. Корреляция между исследуемыми морфологическими показателями свежих и заспиртованных листовых пластинок – 0,17–0,70. В большей степени искажаются признаки «расстояние между основаниями первой и второй от основания листа жилок второго порядка» и «угол между главной жилкой и второй от основания листа жилкой второго порядка». Предложены поправочные коэффициенты, позволяющие нивелировать различия в уровне ФА между результатами, полученными на свежесобранном материале и на зафиксированном разными методами. Для метода гербаризации, независимо от мест сбора растительного материала, поправочный коэффициент, который необходимо ввести к значениям ФА зафиксированных листовых пластинок, равен (–) 0,0004. При методе фиксации листьев в спиртовом растворе для материала, собранного в ненарушенных сообществах, значение коэффициента равно (–) 0,00075, в техногенно нарушенных – (+) 0,0045.

**Ключевые слова:** флуктуирующая асимметрия; *Betula pendula* Roth; методы фиксации растительного материала; гербаризация; фиксация в растворе спирта; фоновые и техногенно нарушенные территории.

## A COMPARATIVE EVALUATION OF THE FLUCTUATING ASYMMETRY OF THE LEAF BLADE *BETULA PENDULA* ROTH FOR DIFFERENT METHODS OF PLANT MATERIAL FIXATION

© 2020

Zhuikova T.V., Popova A.S., Meling E.V.

Nizhny Tagil State Social and Pedagogical Institute (branch)  
of Russian State Vocational Pedagogical University (Nizhny Tagil, Sverdlovsk Region, Russian Federation)

**Abstract.** The influence of plant material fixation methods on the index of fluctuating asymmetry of *Betula pendula* Roth leaves is determined. The methods used were herbarization under pressure and leaves fixation in a solution of ethyl alcohol (45%). Biological material was collected in natural phytocenoses of the Pritalskaya zone of the Middle Urals and in technogenically formed territories, including soil contamination with heavy metals. The FA level of *Betula pendula* Roth leaf blades obtained on freshly harvested material increases in the gradient of toxic load and reflects a natural increase in soil contamination with heavy metals (Zn, Cu, Pb, Cd, etc.). The smallest deviation from the actual FA values obtained on freshly harvested material is given by a method of herbarization of leaves. The correlation coefficients are 0,94–0,99. Plant material fixation in an alcohol solution leads to more than 10-fold deviation of FA values from the real ones. The correlation between the studied morphological parameters of fresh and alcoholic leaf blades is 0,17–0,70. The signs «distance between the bases of the first and second veins of the second order from the base of the leaf» and «angle between the main vein and the second vein of the second order from the base of the leaf» are more distorted. Correction coefficients are proposed that allow to level out the differences in the FA level between the results obtained on freshly collected material and recorded by different methods. For the herbarization method, regardless of where the plant material is collected, the correction factor to be entered for the FA values of the fixed leaf blades is (–) 0,0004. For the method of leaves fixation in an alcohol solution, the coefficient value is (–) 0,00075 for material collected in undisturbed communities, and (+) 0,0045 for technogenically disturbed communities.

**Keywords:** fluctuating asymmetry; *Betula pendula* Roth; methods of plant material fixing; herbarization; fixation in alcohol solution; background and technogenic disturbed territories.

### Введение

Основной проблемой для экологов является разработка стандартных и надежных методов исследования. Нестандартная методология способствует несогласованности в использовании методов и двусмысленности представления результатов. Широкое применение при оценке качества окружающей среды находят химические, физические и биологические методы. Основное требование, которое к ним предъявляется, – высокая чувствительность, достоверность полученных в ходе исследования результатов, простота сбора материала и быстрота выполнения [1, с. 168]. Одним из методов, отвечающим этим требованиям и широко применяемым в биоиндикационных исследованиях, выступает определение флуктуирующей асимметрии (ФА) билатеральных органов растений и животных. Среди растений в качестве объектов используются многолетние травянистые и древесные жизненные формы, у которых оценивается стабильность развития ассимиляционного аппарата – листовой пластинки.

Метод флуктуирующей асимметрии сопровождается сбором больших объемов эмпирического материала в короткий срок, поэтому возникает проблема фиксации и хранения собранного материала. Согласно различным методическим рекомендациям, материал может быть собран и зафиксирован разными способами.

Для непродолжительного экспонирования собранный материал можно хранить в полиэтиленовом пакете на нижней полке холодильника [2, с. 1] либо зафиксировать в 60% растворе этилового спирта [2, с. 1; 3, с. 4; 4, с. 38], для более длительного хранения его можно гербаризировать [4, с. 38]. При разных методах фиксации растительного материала возникает вопрос о сходстве и сопоставимости полученных результатов. В связи с этим результаты настоящего исследования имеют важное практическое значение.

**Цель:** сравнение методов фиксации растительного материала, используемых для оценки флуктуирующей асимметрии листовых пластинок *Betula pendula* Roth.

Обсуждается следующая гипотеза: фиксация материала «жесткими» реагентами приводит к значительному отклонению значений флуктуирующей асимметрии от реальных, полученных на свежесобранном материале. На основании результатов исследования возможно введение поправочных коэффициентов, которые позволят нивелировать расхождения, получаемые при разных методах фиксации материала.

### Материалы и методика исследований

**Объект исследования:** береза повислая *Betula pendula* Roth, семейство березовые (Betulaceae S.F. Gray) [5, с. 158].

Сбор материала выполнен в июле 2017 г. в пяти фитоценозах, произрастающих в пределах Притагильской зоны Среднего Урала (60° в.д., 58° с.ш., таежная географическая зона, подзона южной тайги) на пяти участках. В соответствии с интегральным показателем загрязнения (Z) исследованные участки отнесены к фоновой (участок Фон: Z = 1 отн. ед.), буферной (Буфер-1: Z = 3,33 отн. ед.; Буфер-2: Z = 6,19 отн. ед.) и импактной (Импакт-1: Z = 22,78 отн. ед., Импакт-2: Z = 30,0 отн. ед.) зонам. Характеристика почв, растительных сообществ и почвенных микробиоценозов данных территорий подробно описаны в наших предыдущих исследованиях [6, с. 164–167; 7, с. 84–85].

Материал собран на опушках лесных сообществ, относящихся к следующим типам: Ф – березняк с примесью ели разнотравно-зеленомошный; Б-1 – березняк с примесью осины разнотравный; Б-2 – березняк разнотравный; И-1 – березняк с примесью ивы и осины мертвопокровный; И-2 – березняк мертвопокровный. Отметим, что фитоценозы участков Ф, Б-1 и Б-2 более зрелые по сравнению с И-1 и И-2, в которых еще не сформирован травяной покров.

Биологический материал собирали согласно методическим рекомендациям В.М. Захарова [4, с. 37–38]. Листья собирали с деревьев, находящихся в средневозрастном онтогенетическом состоянии, в пределах нижней части кроны дерева, на уровне поднятой руки, с веток максимально доступных, расположенных с четырех сторон света. Для анализа листья отбирают с укороченных побегов, расположенных на удлиненных предыдущего года. В каждом фитоценозе биологический материал собран с 20 деревьев *Betula pendula* Roth по 10 листьев с каждого для гербаризации и 10 шт. для фиксации в растворе спирта.

Непосредственно после сбора материала свежие листья сканировали. Каждый лист сопровождался указанием его порядкового номера, номера дерева и названия территории для метода гербаризации, а также номера дерева и названия территории для метода фиксации в спирте. Листья сканировали с адаксиальной (сторона, обращенная к оси побега, к которому орган прикреплен) стороны на одном многофункциональном устройстве Samsung SCX-3400 при разрешении 1275 × 1804 пикселей. Далее отсканированные листья фиксировали двумя методами: методом гербаризации (высушивание листьев в рубашках под прессом) и методом фиксации в спирте (45%) и хранили с течением 3-х месяцев. После этого фиксированный материал вновь сканировали с учетом порядкового номера листа. Такой подход к камеральной обработке материала позволил сопоставить значения ФА для каждого листа, полученные на свежесобранном и зафиксированном двумя методами материале. Для оценки уровня флуктуирующей асимметрии измерения выполняли в программе Bio в пикселях. В дальнейшем проводили перевод пикселей в мм: 6 пикселей равно 1 мм при разрешении сканирующего устройства 1275 × 1804. Для оценки уровня ФА использовали пять билатеральных морфологических признаков с левой и правой стороны листовой пластинки [4, с. 39; 8, с. 12]: угол между главной жилкой и второй от основания листа жилкой второго порядка (1), расстояние между основаниями первой и второй жилок второго порядка (2), расстояние между концами этих же жилок (3), длину второй от основания листа жилки второго порядка (4), ширину левой и правой половинок листовой пластинки – измерение проводилось посередине листовой пластинки (5).

При методе гербаризации свежесобранный материал нумеровали на адаксиальной стороне листовой пластинки маркером. После сканирования листья помещали между листами бумаги под пресс для высушивания. Далее монтировали в гербарные листы формата А4, на которых указывали номер выборки, место и дату сбора, номер дерева и номер листа. Далее проводили повторное сканирование и измерение морфометрических признаков листовой пластинки. Такой подход к фиксации материала позволяет сравнивать значения ФА, полученные на свежесобранном

и гербаризированном материале, на уровне конкретной листовой пластинки (счетная единица – лист).

Вторую выборку свежесобранных листьев после сканирования фиксировали в спиртовом растворе. Собранные с каждого отдельного дерева листья связывали ниткой за черешки, сопровождали этикеткой с указанием номером дерева. Данный метод не позволяет указать номер листа, так как маркер смывается в спиртовом растворе. Пучки листьев по 10 штук с 20 деревьев с конкретной территории помещали в стеклянную емкость с раствором спирта. На емкость прикрепляли этикетку с датой и местом сбора материала. По окончании срока хранения листья повторно сканировали. При этом методе фиксации материала в качестве счетной единицы наблюдения выступает конкретное дерево – среднее значение ФА из 10 листьев.

Общее число измерений двумя методами фиксации составило: 5 участков  $\times$  20 деревьев  $\times$  10 листьев  $\times$  4 варианта (итого 4000 листьев)  $\times$  5 промеров  $\times$  2 стороны листовой пластинки = 40000 измерений. Все измерения выполнены одним счетчиком. Для занесения и хранения числовых измерений использовали компьютерное программное обеспечение Microsoft Excel.

Флуктуирующую асимметрию рассчитывали по формуле В.М. Захарова с соавт. [4, с. 31]:

– вычисляли дисперсию асимметрии – отношение разности в измерениях морфологических признаков с левой ( $L$ ) и правой ( $R$ ) сторон листовой пластинки к их сумме:

$$(L-R)/(L+R)$$

– рассчитывали интегральный показатель ( $Z$  – флуктуирующая асимметрия) – величину среднего относительного различия между сторонами на признак (средняя арифметическая величина отношения разности к сумме промеров слева ( $L$ ) и справа ( $R$ ), отнесенная к числу признаков):

$$Z = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(L_{ij} - R_{ij})}{L_{ij} + R_{ij}}$$

В ходе исследования результаты подвергали статистическому анализу с вычислением среднего арифметического ( $M$ ) и его ошибки ( $m$ ). Оценку взаимосвязи между значениями ФА, полученными при методе гербаризации, фиксации материала в спиртовом растворе и свежесобранном оценивали в ходе корреляционного анализа (вычисляли коэффициент корреляции –  $r$ ), уровень статистической значимости коэффициента при  $p < 0,05$ . Статистический анализ выполнен в ПСП Statistica v10.0 (StatSoft, Inc., 2012).

#### Результаты исследований

##### Зависимость ФА от методов фиксации растительного материала

Представляло интерес оценить не только влияние методов фиксации растительного материала на показатель флуктуирующей асимметрии листовой пластинки березы повислой, но и изменение этого показателя у растений, произрастающих в условиях различного загрязнения почв тяжелыми металлами. Априори максимальным отражением качества среды служат результаты, полученные на свежесобранном биологическом материале. Согласно пятибалльной шкале оценки отклонений состояния организма от условной нормы по величине интегрального показателя стабильности развития для *Betula pendula* Roth

[4, с. 40; 8, с. 22], качество окружающей среды на участках Фон – Импакт-1 характеризуется средним уровнем отклонения от нормы, на участке Импакт-2 – существенными (значительными) отклонениями от нормы. Уровень ФА листовых пластинок *Betula pendula* Roth, полученный на свежесобранном материале, увеличивается в градиенте токсической нагрузки (табл. 1), что в нашем случае отражает закономерное увеличение почвенного загрязнения тяжелыми металлами (Zn, Cu, Pb, Cd и др.) [7, с. 85].

Влияние метода гербаризации растительного материала проявилось в повышении значений ФА у листовых пластинок деревьев, произрастающих во всем градиенте загрязнения. Отметим, что с ростом уровня почвенного загрязнения на исследуемых территориях различия в средних значениях ФА закономерно нарастают. Различия в значении уровня ФА между свежими и гербаризированными листьями в пределах каждого участка незначительные. В среднем они варьируют от 0,0001 до 0,0008 отн. ед.

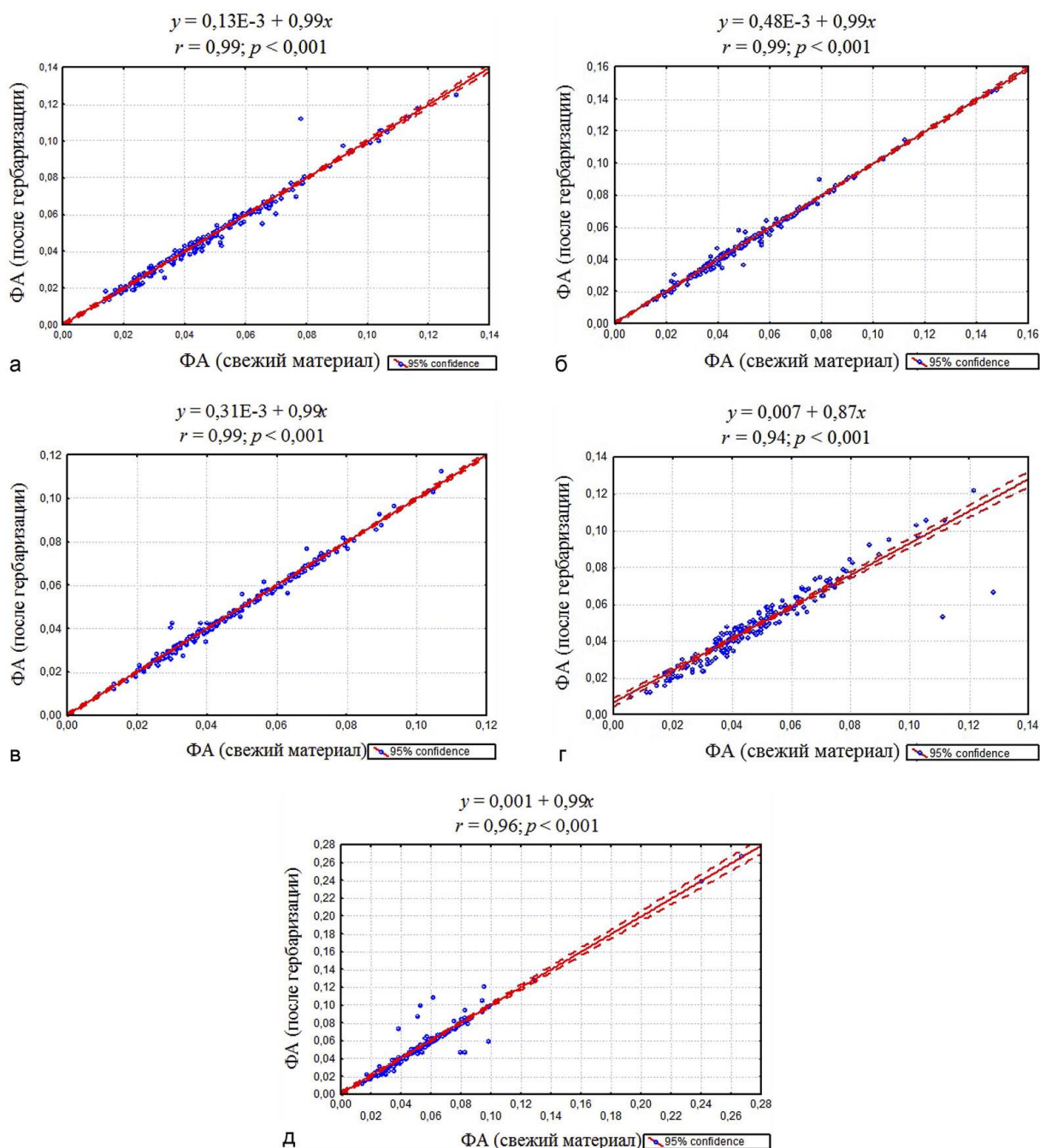
Использование в качестве фиксатора спиртового раствора приводит к значительным различиям между ФА листовых пластинок свежесобранных и зафиксированных в спирте. Не установлено четкой закономерности в отклонении ФА от такового, полученного на свежесобранном материале с деревьев, произрастающих на разных участках. Так, в фоновых условиях и на участке с минимальным уровнем загрязнения почвы (Буфер-1) уровень ФА после фиксации в спиртовом растворе незначительно выше реального (см. табл. 1). У растений, произрастающих в условиях сильного почвенного загрязнения поллютантами, значение ФА после фиксации в спирте снижаются по сравнению с таковыми, полученными на этих же листьях, но свежих. При этом отметим, что различия в методах фиксации биологического материала становятся существенными – от 0,0025 до 0,0059 отн. ед. и нарастают с ростом загрязнения почв на исследуемых территориях.

Для оценки взаимосвязи между уровнем ФА свежих и гербаризированных листьев проведен корреляционный анализ, при котором в качестве счетной единицы выступала листовая пластинка, т.к. выше было сказано, что в ходе применения метода гербаризации каждую листовую пластинку измеряли до и после гербаризации. Установлена высокая корреляционная связь между уровнем ФА свежесобранных и гербаризированных листьев ( $r = 0,99$ ,  $p < 0,001$ ) у деревьев, произрастающих в пределах одного участка независимо от места сбора биологического материала (рис. 1).

Использование второго метода позволило провести оценку корреляционной связи показателя ФА до и после фиксации материала в спиртовом растворе. Анализ проведен по средним значениям из 10 листьев у каждого из 20 деревьев. Коэффициент корреляции между уровнем ФА у свежесобранных и зафиксированных в спиртовом растворе листьев у деревьев, произрастающих на одном участке, в пределах 0,17–0,70. Статистически значимая корреляционная связь между показателем до и после фиксации материала в спирте установлена только у растений с участков Фон и Импакт-1 (рис. 2). В градиенте токсической нагрузки коэффициент корреляции не имеет закономерного изменения. Однако на участке фоновой зоны он выше, чем на остальных.

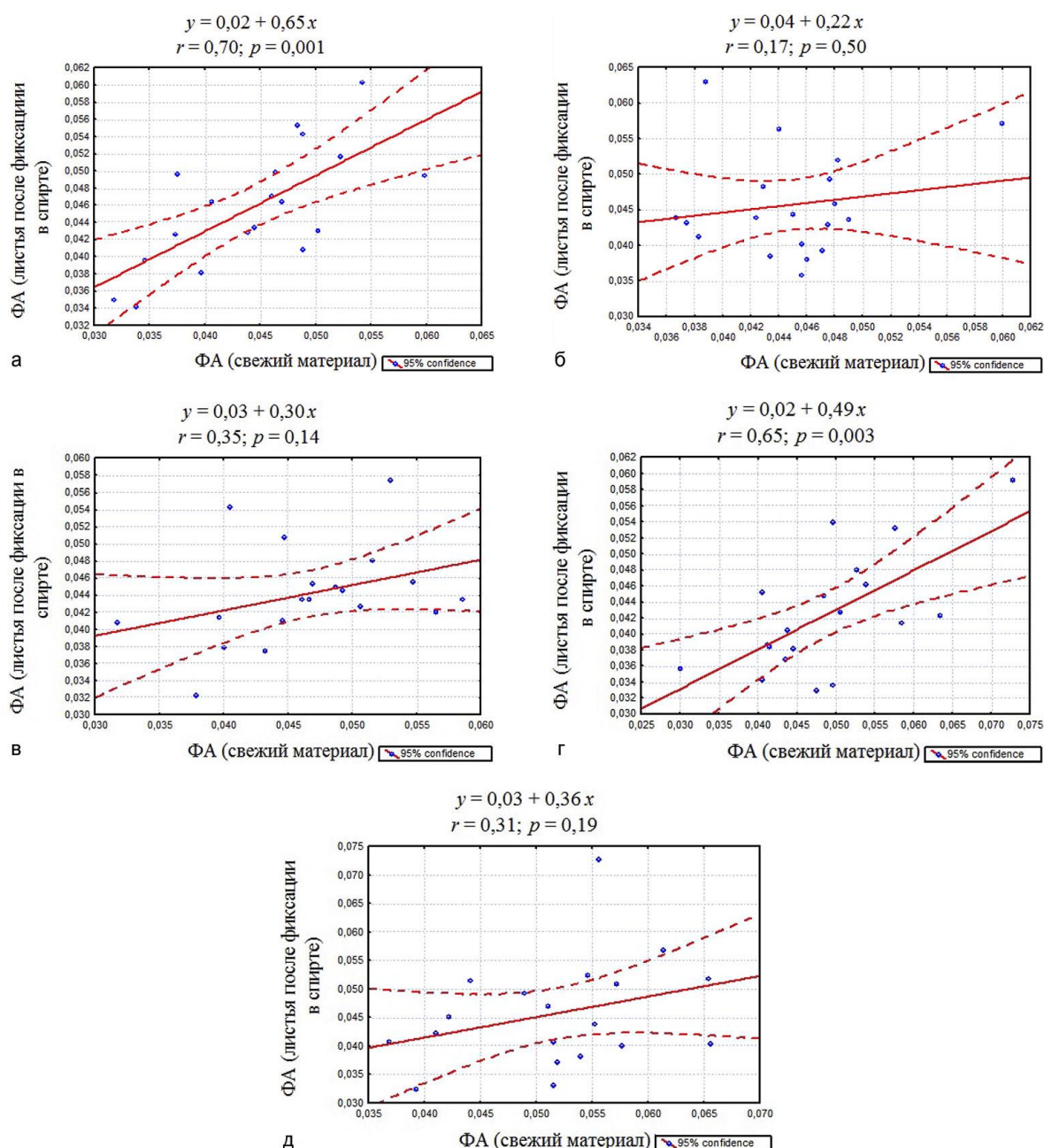
**Таблица 1** – Уровень флуктуирующей асимметрии листовых пластинок *Betula pendula* Roth при различных методах фиксации растительного материала

Участок	Уровень ФА					
	Свежие листья (до гербаризации)	Загербаризиро- ванные	Раз- ность	Свежие листья (до спиртования)	После фикса- ции в спирто- вом растворе	Разность
Фон	$0,0476 \pm 0,0021$	$0,0477 \pm 0,0022$	$< 0,0001$	$0,0444 \pm 0,0016$	$0,0453 \pm 0,0016$	$< 0,0009$
Буфер-1	$0,0491 \pm 0,0016$	$0,0493 \pm 0,0015$	$< 0,0002$	$0,0451 \pm 0,0012$	$0,0457 \pm 0,0016$	$< 0,0006$
Буфер-2	$0,0469 \pm 0,0016$	$0,0472 \pm 0,0016$	$< 0,0003$	$0,0466 \pm 0,0018$	$0,0441 \pm 0,0013$	$> 0,0025$
Импакт-1	$0,0476 \pm 0,0019$	$0,0481 \pm 0,0020$	$< 0,0005$	$0,0482 \pm 0,0022$	$0,0430 \pm 0,0017$	$> 0,0052$
Импакт-2	$0,0535 \pm 0,0023$	$0,0543 \pm 0,0023$	$< 0,0008$	$0,0517 \pm 0,0018$	$0,0458 \pm 0,0021$	$> 0,0059$
Среднее значение			(–) 0,0004			Для Ф–Б-1 (–) 0,0008. Для Б-2–И-2 (+) 0,0045

**Рисунок 1** – Взаимосвязь между уровнем ФА свежих и гербаризованных листовых пластинок на разных участках ( $n = 200$ ):

а – Фон; б – Буфер-1; в – Буфер-2; г – Импакт-1; д – Импакт-2





**Рисунок 2** – Взаимосвязь в пределах дерева между уровнем ФА свежих и зафиксированных в растворе спирта листьев ( $n = 20$ ) участки: а – Фон; б – Буфер-1; в – Буфер-2; г – Импакт-1; д – Импакт-2

Таким образом, корреляционная связь между значением ФА свежесобранных и гербаризированных листьев – в пределах 0,99 ( $p < 0,001$ ). Этот показатель в 1,5–5,8 раз выше, чем таковой между свежесобранными и зафиксированными в спиртовом растворе листьями. Установлено, что при методе гербаризации значение ФА незначительно увеличивается по сравнению со свежими листьями, в среднем на 0,0004 отн. ед.

При фиксации материала в спиртовом растворе значение ФА увеличивается на участках Фон и Буфер-1 и уменьшается на участках Буфер-2, Импакт-1 и Импакт-2. Различия в уровне ФА между свежесобранными и зафиксированными в спирте листьями в 11 раз больше, чем между свежесобранными и гербаризированными листьями. В среднем расхождение значений ФА между свежесобранным материалом и гербаризированным – 0,0004 отн. ед., а между свежесобранным и зафиксированным в спиртовом растворе на порядок выше – 0,0045 отн. ед.).

Учитывая все вышесказанное, мы предлагаем использовать поправочные коэффициенты, позволяющие исключать различия в уровне ФА между разными методами фиксации материала. Если измерение ФА листовых пластинок проводить на гербаризованном материале, то для экстраполяции полученных данных на уровень ФА свежесобранного материала необходимо из значения уровня ФА гербаризованных листьев вычитать 0,0004. Среднее значение поправочного коэффициента вычислено по материалу, полученному на пяти исследуемых территориях. Если для хранения биологического материала использовать фиксацию в спиртовом растворе, то на антропогенно нарушенных территориях к значению ФА, полученному на заспиртованном материале, необходимо прибавить 0,0045. Среднее значение поправочного коэффициента вычислено по трем участкам Буфер-2, Импакт-1, Импакт-2, так как именно на этих территориях уменьшается уровень ФА при фиксации в спирте по сравнению с реальны-

ми значениями. Если же растительный материал собирается в ненарушенных сообществах или на территориях, не затронутых техногенезом, и фиксируется в спиртовом растворе, то из значения ФА, полученного на заспиртованном материале, необходимо вычесть 0,00075.

*Сравнение изменчивости дисперсии  
отдельных признаков ФА  
при разных методах фиксации*

Представляло интерес установить, какие из исследуемых билатеральных признаков ФА в большей степени «искажаются» при разных методах фиксации растительного материала. В данном случае речь пойдет о дисперсии признаков, под которой понимают относительную величину различия в промерах слева и справа, отнесенную к их сумме  $(L-R)/(L+R)$  [4, с. 31].

В таблице 2 представлены коэффициенты корреляции дисперсии признаков между свежесобранном материалом и подвергнутым фиксации. Видно, что в случае фиксации растительного материала методом гербаризации коэффициенты корреляции в пределах 0,87–0,99, статистически высоко значимые во всех случаях. Несколько ниже (в среднем 0,95) коэффициенты корреляции в случае признака «расстояние между основаниями первой и второй жилок второго порядка» и «длина второй от основания листа жилки второго порядка».

При фиксации материала в спиртовом растворе коэффициенты корреляции значительно ниже по сравнению с первым методом (0,07–0,95), в некоторых случаях даже отрицательные. В среднем самый низкий коэффициент корреляции у признака «угол между главной жилкой и второй от основания листа жилкой второго порядка» (0,15), высокий (0,60) – у признака «расстояние между концами первой и второй жилок второго порядка». Выделяется признак «расстояние между основаниями первой и второй жилок второго порядка», в случае которого все ко-

эффициенты корреляции, полученные на материале со всех участков, статистически незначимы.

Таким образом, при фиксации растительного материала в спиртовом растворе наблюдаются значительные отклонения от результатов, полученных на свежесобранном материале, дисперсии всех анализируемых при оценке ФА признаков листовой пластинки. Как в случае гербаризации, так и в случае фиксации в спиртовом растворе отклонение от дисперсии признака, полученной на свежесобранном материале, в большей степени касаются «расстояния между основаниями первой и второй жилок второго порядка», а в случае фиксации в спирте еще и «угла между главной жилкой и жилкой второго порядка».

*Обсуждение результатов*

При исследовании флуктуирующей асимметрии билатеральных органов растений важное значение имеет не только технология сбора полевого материала, которая подробно описана в [8, с. 8], но и методы его фиксации. В силу определенных обстоятельств исследователю не всегда удастся сразу в полевых условиях выполнить измерения морфологических признаков листовой пластинки или отсканировать свежесобранный материал. С целью фиксации биологического материала исследователи используют разные методы, в том числе гербаризацию листьев под прессом или фиксацию в растворе этилового спирта.

Наши исследования показали, что результаты ФА листовой пластинки, полученные на свежем, гербаризованном и заспиртованном материале, различаются. Метод гербаризации приводит к незначительным отклонениям значений ФА от таковых, полученных на свежесобранном материале, которыми можно пренебречь. Фиксация же листьев в растворе этилового спирта в 11 раз по сравнению с методом гербаризации изменяет значение ФА.

**Таблица 2** – Коэффициенты корреляции ( $r$ ) дисперсии признаков ФА листовой пластинки между свежесобранном и зафиксированным растительным материалом

Участок	Признаки									
	1		2		3		4		5	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>метод гербаризации</i>										
Фон	0,98	<b>0,001</b>	0,99	<b>0,001</b>	0,95	<b>0,001</b>	0,95	<b>0,001</b>	0,99	<b>0,001</b>
Буфер-1	0,97	<b>0,001</b>	0,99	<b>0,001</b>	0,99	<b>0,001</b>	0,98	<b>0,001</b>	0,99	<b>0,001</b>
Буфер-2	0,99	<b>0,001</b>	0,99	<b>0,001</b>	0,99	<b>0,001</b>	0,99	<b>0,001</b>	0,99	<b>0,001</b>
Импакт-1	0,95	<b>0,001</b>	0,92	<b>0,001</b>	0,97	<b>0,001</b>	0,87	<b>0,001</b>	0,99	<b>0,001</b>
Импакт-2	0,99	<b>0,001</b>	0,87	<b>0,001</b>	0,99	<b>0,001</b>	0,99	<b>0,001</b>	0,95	<b>0,001</b>
Среднее	0,98		0,95		0,98		0,96		0,98	
<i>метод фиксации в спирте</i>										
Фон	−0,65	<b>0,002</b>	0,36	0,116	−0,10	0,690	−0,16	0,500	−0,23	0,319
Буфер-1	0,59	<b>0,006</b>	0,42	0,064	0,55	<b>0,012</b>	0,22	0,340	0,85	<b>0,001</b>
Буфер-2	0,12	0,610	0,07	0,780	0,95	<b>0,001</b>	0,52	<b>0,019</b>	0,04	0,940
Импакт-1	0,57	<b>0,009</b>	0,01	0,970	0,86	<b>0,001</b>	0,81	<b>0,001</b>	0,45	<b>0,050</b>
Импакт-2	0,10	0,670	0,37	0,106	0,76	<b>0,001</b>	−0,08	0,740	0,12	0,650
Среднее	0,15		0,25		0,60		0,26		0,25	

*Примечание.*  $p$  – уровень статистической значимости коэффициента: при  $p < 0,05$ – $0,001$  (выделено жирным) коэффициенты корреляции статистически значимы. Признаки: 1 – угол между главной жилкой и второй от основания листа жилкой второго порядка, 2 – расстояние между основаниями первой и второй жилок второго порядка, 3 – расстояние между концами этих же жилок, 4 – длина второй от основания листа жилки второго порядка, 5 – ширина половинки листа.

Важно учитывать место сбора растительного материала. Как правило, ФА используют для оценки качества среды, с этой целью листья собирают с деревьев, произрастающих в сообществах естественных ненарушенных и техногенно трансформированных местообитаний. Как показали наши исследования, фиксация в растворе этилового спирта материала, собранного на ненарушенных территориях, приводит к незначительному повышению ФА по сравнению со свежесобранными листьями, аналогично методу гербаризации, а материала, собранного на техногенно нарушенных территориях, наоборот, приводит к уменьшению. То, что сушка под прессом не влияет на значение ФА, а фиксация в спирте уменьшает этот показатель, отмечено в работе М.В. Козлова [9, с. 7]. Причем фиксация в спирте приводит к отклонению от реальных (свежесобранный материал) значений всех исследуемых морфологических признаков листовой пластинки. В большей степени это затрагивает признак «расстояние между основаниями первой и второй жилок второго порядка», а в случае фиксации в спирте еще и «угол между главной жилкой и второй от основания листа жилкой второго порядка».

Чем же могут быть вызваны подобные изменения в структуре тканей листа, которые происходят при действии этилового спирта? В начале XX века изучались методы фиксации растительных тканей [10, с. 107–178; 11, с. 19–155]. Установлено, что фиксаторы могут приводить к изменению структуры живых клеток и тканей. Однако разные фиксаторы приводили к различным нарушениям. Например, фиксация тканей в формалине не приводит к серьезным отклонениям от нормы. Поэтому он широко используется в анатомической практике для фиксации животных и растительных тканей и органов. Спирт и формалин уменьшает объемы клеток и тканей [12, с. 19–155]. На примере трихом черешков *Lycopersicon esculentum* показано, что использование в качестве фиксатора этанола приводит к вспениванию цитоплазмы живых клеток [12, с. 49–76]. У элодеи при действии спирт-формалинового фиксатора уменьшается площадь клеток на 75–90% от исходной и деформируется клеточная стенка [13, с. 139].

Более жесткими фиксаторами являются тринитрофенол (пикриновая кислота) и сулема. Они приводят к появлению более сильных морфологических нарушений. В чистом виде для фиксации материала они используются редко. Обычно в технике фиксации применяют соединения тринитрофенола с другими веществами, такими как формалин, ледяная уксусная кислота, азотная кислота [10, с. 107–178; 11, с. 19–155].

Таким образом, при сушке растений в прессе происходит постепенное обезвоживание клеток. Сушка под прессом предохраняет клетки от деформации, а следовательно, не приводит к серьезным изменениям морфологических структур листовой пластинки. Спирт в этом отношении является более агрессивным фиксатором. При действии спирта происходит мгновенное отнятие воды как коллоидно-связанной, так и свободной. Такое резкое отнятие воды сопровождается механическим воздействием. Высокая скорость воздействия спирта приводит к деформации клеток. Кроме того, спирт приводит к

денатурации белковых клеточных структур. В первую очередь повреждаются мембраны, имеющие белково-липидное строение, в том числе плазмолемма. Повреждение последней опять же приводит к выходу воды из клеток мягких тканей, в которые погружены проводящие пучки (жилки). Именно расстояние между жилками, которое зависит в том числе и от объема клеток мезофилла, оценивается при методе ФА. Размеры живых клеток мезофилла могут различаться. При потере воды они становятся одинаковыми. Резкое равномерное обезвоживание всех клеток мезофилла приводит в целом к снижению показателя ФА по сравнению с живыми листьями, но к значительному его отклонению от реальных значений, полученных на свежем материале.

#### Выводы

1. Метод гербаризации, в отличие от метода фиксации листьев березы в спиртовом растворе, дает наименьшее расхождение значений ФА листовой пластинки, по сравнению со свежесобраным материалом. Коэффициент корреляции между уровнем ФА свежих и гербаризированных листьев составляет 0,94–0,99, между свежими и заспиртованными листьями 0,17–0,70. Различия в уровне ФА между свежесобраным и зафиксированным в спирте материалом в 11 раз больше, чем между свежесобраным и гербаризированным.

2. Предложены поправочные коэффициенты, позволяющие нивелировать различия в уровне ФА между результатами, полученными на свежесобранном материале и зафиксированном разными методами. Для метода гербаризации, независимо от мест сбора растительного материала, поправочный коэффициент, который необходимо ввести к значениям ФА зафиксированных листовых пластинок, равен (–) 0,0004. При методе фиксации листьев в спиртовом растворе для материала, собранного в ненарушенных сообществах, значение коэффициента равно (–) 0,00075, в техногенно нарушенных – (+) 0,0045.

3. При фиксации растительного материала в спиртовом растворе наблюдаются значительные отклонения от результатов, полученных на свежесобранном материале, дисперсии всех анализируемых признаков при оценке ФА признаков листовой пластинки. Как в случае гербаризации, так и в случае фиксации в спиртовом растворе отклонение от дисперсии признака, полученной на свежесобранном материале, в большей степени касаются «расстояния между основаниями первой и второй жилок второго порядка (второй по счету от основания листа)», а в случае фиксации в спирте – «угла между главной жилкой и второй от основания листа жилкой второго порядка».

#### Список литературы:

1. Калаев В.Н., Игнатова И.В., Третьякова В.В., Артюхов В.Г., Савко А.Д. Биоиндикация загрязнения районов г. Воронежа по величине флуктуирующей асимметрии листовой пластинки березы повислой // Вестник воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011. № 2. С. 168–175.
2. Оценка качества среды по состоянию листьев на примере берёзы (оценка стабильности развития живых организмов по уровню асимметрии морфологических структур): метод. указания к лабораторной работе / сост. А.Р. Дадаева. Великий Новгород: НовГУ, 2006. 7 с.

3. Способ индикации загрязненности воздуха по флуктуирующей асимметрии листьев березы [Электронный ресурс] / П.М. Мазуркин, Д.В. Семенова; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «Поволжский государственный технологический университет». РИД. № охранного документа 0002580647 Российская Федерация; Дата охранного документа: 10.04.2016. – <https://edrid.ru/rid/216.015.317c.html>.

4. Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И., Валецкий А.В., Кряжева Н.Г., Чистякова Е.К., Чубинишвили А.Т. Здоровье среды: методика оценки. М.: Центр экологической политики России, 2000. 68 с.

5. Определитель сосудистых растений Среднего Урала / П.Л. Горчаковский и др. М.: Наука, 1994. 525 с.

6. Жуйкова Т.В., Мелинг Э.В., Кайгородова С.Ю., Безель В.С., Гордеева В.А. Особенности почв и травянистых растительных сообществ в условиях техногенеза на Среднем Урале // Экология. 2015. № 3. С. 163–172.

7. Ившина И.Б., Костина Л.В., Каменских Т.Н., Жуйкова В.А., Жуйкова Т.В., Безель В.С. Почвенный микробиоценоз как показатель стабильности луговых сообществ при химическом загрязнении среды тяжелыми металлами // Экология. 2014. № 2. С. 83–90.

8. Методические рекомендации по выполнению оценки качества среды по состоянию живых существ (оценка стабильности развития живых организмов по уровню асимметрии морфологических структур). Распоряжение МПР № 460-р от 16.10.2003. М., 2003. 24 с.

9. Козлов М.В. Исследование флуктуирующей асимметрии растений в России: мифология и методология // Экология. 2017. № 1. С. 3–12.

10. Барер Р. Фазово-контрастная, интерференционно-контрастная и поляризационная микроскопия // Методы цитологического анализа / под ред. А.Л. Шабадш. М.: ИИЛ, 1957. С. 107–178.

11. Baker J.R. Principles of Biological Microtechnique. London: Methuen, 1958. P. 19–155.

12. Mersey B., McCully M.E. Monitoring of the course of fixation of plant cells // Journal of Microscopy. 1978. Vol. 114, pt. 1. P. 49–76.

13. Буданцев А.Ю. Изменение морфологии растительных клеток при действии спирт-формалинового фиксатора // Фундаментальные исследования. 2011. № 9–1. С. 130–134.

Информация об авторе(-ах):	Information about the author(-s):
<p><b>Жуйкова Татьяна Валерьевна</b>, доктор биологических наук, доцент, декан факультета естествознания, математики и информатики; Нижнетагильский государственный социально-педагогический институт (филиал) Российского государственного профессионально-педагогического университета (г. Нижний Тагил, Свердловская область, Российская Федерация). E-mail: hbfnt@rambler.ru.</p> <p><b>Попова Анастасия Сергеевна</b>, младший научный сотрудник экологической лаборатории; Нижнетагильский государственный социально-педагогический институт (филиал) Российского государственного профессионально-педагогического университета (г. Нижний Тагил, Свердловская область, Российская Федерация). E-mail: stassy.popova@yandex.ru.</p> <p><b>Мелинг Элеонора Васильевна</b>, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник экологической лаборатории; Нижнетагильский государственный социально-педагогический институт (филиал) Российского государственного профессионально-педагогического университета (г. Нижний Тагил, Свердловская область, Российская Федерация). E-mail: meling-e@mail.ru.</p>	<p><b>Zhuikova Tatyana Valerievna</b>, doctor of biological sciences, associate professor, head of Natural Sciences, Mathematics and Computer Science Faculty; Nizhny Tagil State Social and Pedagogical Institute (branch) of Russian State Vocational Pedagogical University (Nizhny Tagil, Sverdlovsk Region, Russian Federation). E-mail: hbfnt@rambler.ru.</p> <p><b>Popova Anastasia Sergeevna</b>, junior researcher of Ecological Laboratory; Nizhny Tagil State Social and Pedagogical Institute (branch) of Russian State Vocational Pedagogical University (Nizhny Tagil, Sverdlovsk Region, Russian Federation). E-mail: stassy.popova@yandex.ru.</p> <p><b>Meling Eleonora Vasilievna</b>, candidate of biological sciences, senior researcher of Ecological Laboratory; Nizhny Tagil State Social and Pedagogical Institute (branch) of Russian State Vocational Pedagogical University (Nizhny Tagil, Sverdlovsk Region, Russian Federation). E-mail: meling-e@mail.ru.</p>

**Для цитирования:**

Жуйкова Т.В., Попова А.С., Мелинг Э.В. Сравнительная оценка флуктуирующей асимметрии листовой пластинки *Betula pendula* Roth при разных методах фиксации растительного материала // Самарский научный вестник. 2020. Т. 9, № 4. С. 58–65. DOI: 10.17816/snv202094109.