

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

# Методы изучения ценопопуляций цветковых растений

*Учебно-методическое пособие для магистров биологического  
факультета*

Саратов  
2015

С о с т а в и т е л и:

*А.С. Кашин, Т.А. Крицкая, Н.А. Петрова, И.В. Шилова*

**Методы изучения ценопопуляций цветковых растений**  
[Электронный ресурс]: учебно-методическое пособие для магистров  
биологического факультета. / Сост. А.С. Кашин, Т.А. Крицкая, Н.А.  
Петрова, И.В. Шилова. – Саратов, 2015. - 127 с.

*Рекомендовано к изданию*

**УМК биологического факультета СГУ им. Н.Г.Чернышевского;  
кафедрой методики преподавания биологии и экологии,  
доктором биологических наук, профессором М.А. Березуцким,  
доктором биологических наук, доцентом Н.А. Дурновой**

**Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки  
России в рамках базовой части государственного задания в сфере  
научной деятельности по Заданию № 2014/203, код проекта 1287.**

© Кашин А.С., Крицкая Т.А.,  
Петрова Н.А., Шилова И.В., 2015

## Содержание

Введение .....	5
1. Методики изучения фитоценозов и характеристики местообитания .....	6
1.1. Изучение фитоценозов.....	6
1.2. Характеристика местообитания .....	10
2. Изучение морфологических особенностей растений .....	26
2.1. Морфометрическая характеристика растений .....	27
2.1.1. Порядок проведения анализа отдельного генеративного побега .....	33
2.1.2. Морфометрическая характеристика вегетативных органов...	36
3. Анализ изменчивости и пластичности морфологических параметров .....	36
3.1. Изменчивость и пластичность особей растений .....	36
3.2. Морфологическая целостность (корреляционный анализ) ...	43
4. Анализ структуры ценопопуляций .....	49
4.1. Пространственная структура ценопопуляций .....	49
4.2. Онтогенетическая структура .....	53
4.2.1. Периодизация онтогенеза .....	54
4.2.2. Онтогенетический спектр ценопопуляции .....	56
4.2.3. Определение типа ценопопуляции .....	60
4.3. Определение виталитетного состояния ценопопуляций ....	62
5. Установление жизненной стратегии вида .....	65
6. Анализ популяционных характеристик репродуктивной биологии вида .....	71
6.1. Выявление способа семенного воспроизводства в популяциях растений.....	71
6.1.1. Метод беспыльцевого режима .....	71
6.1.2. Анализ качества пыльцы в популяциях растений.....	72
6.1.3. Выявление способности к апомиксису с использованием цитоэмбриологического метода .....	73
6.2. Анализ семенной продуктивности растений в популяциях .....	74
6.3. Морфологическая характеристика семян .....	76
6.3.1. Количественные характеристики семян .....	76
6.3.2. Качественные характеристики семян .....	78
6.4. Биология семян .....	82
6.4.1. Всхожесть и энергия прорастания семян .....	82
6.4.2. Длительность сохранения жизнеспособности семян .....	91
6.5. Зараженность семян вредителями и болезнями .....	92
6.6. Оценка зараженности посевного материала .....	

фитопатогенными бактериями .....	93
6.7. Оценка зараженности посевного материала	
фитопатогенными грибами .....	94
7. Молекулярно-генетические методы выявления полиморфизма в	
ценопопуляциях .....	96
7.1. Фрагментарный анализ ДНК растений .....	96
7.1.1. Выделение ДНК из растительных тканей .....	98
7.1.2. Постановка реакции амплификации .....	103
7.1.2.1. Молекулярные методы, базирующиеся на анонимном	
полиморфизме ДНК (RAPD, ISSR) .....	104
7.1.2.2. Амплификация определённого фрагмента ДНК для	
последующего секвенирования .....	106
7.1.3. Электрофорез в агарозном геле .....	107
7.1.4. Секвенирование амплифицированного фрагмента	
(проведение терминирующих реакций) .....	112
7.1.4.1. Считывание последовательности .....	113
7.1.4.2. Выравнивание .....	114
7.1.5. Статистическая обработка результатов .....	116
Рекомендуемая литература .....	119
Приложения .....	123

## ***Введение***

В учебном пособии приведено описание основных полевых и лабораторных методов изучения ценопопуляций цветковых растений. Подробно изложены методы изучения структуры сообществ, в котором встречается изучаемый вид растений, а также методы изучения морфологических параметров, анализа их изменчивости и пластичности, определения возрастной структуры ценопопуляций. Особое внимание уделено анализу пространственной, онтогенетической и виталитетной структуры ценопопуляций, установлению жизненной стратегии и онтогенетических тактик вида. Отдельный раздел посвящён методам анализу популяционных характеристик репродуктивной биологии вида. Заключительный раздел учебно-методического пособия посвящён изложению современных молекулярно-генетических методов выявления полиморфизма в ценопопуляциях растений.

Учебное пособие рекомендуется для использования бакалаврами и магистрами биологического факультета университета при прохождении полевых практик по основным курсам, читаемым на кафедре ботаники и экологии и на кафедре генетики, а также при освоении бакалаврами и магистрами материала специальных курсов, предметом изучения которых являются особенности биологии и экологии цветковых растений.

## ***1 Методика изучения фитоценозов и характеристики местообитания***

### ***1.1. Изучение фитоценозов***

Под фитоценозом (растительным сообществом), согласно ёмкому определению В.Н. Сукачёва (1935), следует понимать «всякую совокупность растений на данном участке территории, находящуюся в состоянии взаимозависимости и характеризующуюся как определённым составом и строением, так и определёнными взаимоотношениями со средой».

Для того чтобы получить характеристику растительного сообщества, в котором встречается изучаемый вид растений, необходимо провести геоботаническое (фитоценологическое) описание этого сообщества.

Прежде всего, необходимо глазомерно выбрать однородный участок. При этом предполагается однородность по положению в мезорельефе и по микрорельефу, по механическому составу почвы, по доминирующим в основных ярусах видам растений, по сомкнутости (древостоя) и проективному покрытию (травостоя), по равномерному и среднему (насколько это возможно) распределению особей конкретного интересующего вас вида.

Изучение фитоценоза начинается с заложения пробной площади. Она должна располагаться не ближе 20 м от края леса (степи, луга), границы с полем, поляной, дорогой, просекой, пустырём и т.п.. Исключение составляют случаи выхода изучаемого конкретного вида на подобные территории. Размер пробной площади для лесных фитоценозов обычно составляет 400 м<sup>2</sup> (20 20 м). Для описания степного или лугового сообщества бывает достаточной площадь, равная 100 м<sup>2</sup> (10 10 м). На горизонтальных участках пробная площадь, как правило, имеет форму квадрата, на склонах – прямоугольника, вытянутого поперёк склона.

Для закладки пробной площади в лесном фитоценозе достаточно иметь 4 рулетки по 20 м или два бельевых шнура по 40 м каждый. Они предварительно размечаются через 20 м. Для пробной площади в степном (луговом) сообществе длина рулеток или шнуров должна быть, соответственно, в два раза меньшая. По краям шнура и в его середине готовятся петли такого размера, чтобы в них можно было вставить колышки. Колышки рекомендуется заготовить заранее и окрасить их в яркий цвет. Длина колышков - 50-70 см, диаметр - не более 1 см.

Для проведения геоботанических описаний удобно использовать заранее подготовленные бланки описаний (см. образцы бланков в Приложении). Бланк должен иметь следующие блоки: номер описания; дата; Ф.И.О. исследователя (автора описания); географическое положение (область, район, направление и расстояние от ближайшего населённого пункта, название урочища); характеристика местообитания (рельеф; механический состав почвы: П – песок, СП – супесь, СГ.-. суглинок, Г – глина; условия увлажнения и освещения; подстилка (для лесных фитоценозов); окружение, название сообщества, общая характеристика сообщества (общее покрытие высшими растениями – проективное и истинное); размер пробной площади; характеристика сообщества по ярусам; флористический список растений.

Описание лесного фитоценоза начинают с древесного яруса. Определяют сомкнутость крон (проективное покрытие), которая представляет собой отношение площади крон к общей описываемой площади. Сомкнутость крон принято выражать в десятых долях единицы, при этом отсутствие крон принимают за 0, а полное смыкание – за 1. Затем определяют высоту деревьев и их возраст.

Для измерения высоты деревьев используют специальные приборы – высотомеры. При их отсутствии высоту можно измерить эклиметром. При этом отходят от дерева на расстояние, равное 10, 15 или 20 м. Затем окуляр эклиметра направляют на вершину дерева и смотрят, какому углу соответствует риска в прорези, расположенной рядом с окуляром. После этого по таблице 1 находят высоту дерева.

Возраст деревьев определяется по числу годовичных колец на пнях. Годичные кольца лучше видны при рассматривании их в лупу. Если лес разнородный и разновозрастный, то нужно определять возраст пней разной толщины по породам.

Таблица 1.

Определение высоты дерева при помощи эклиметра  
(составлена по тангенсам углов визирования на вершину дерева  
с добавлением 1,5 м на рост наблюдателя)

Угол визиро- вания, °	Высота дерева (м) при расстоянии до него (м)			Угол визиро- вания, °	Высота дерева (м) при расстоянии до него (м)		
	10	15	20		10	15	20
30	7,3	10,1	13,0	45	11,5	16,5	21,5
31	7,5	10,5	13,5	46	11,9	17,0	22,2
32	7,8	10,9	14,0	47	12,2	17,6	22,9
33	8,0	11,2	14,5	48	12,6	18,2	23,7
34	8,3	11,6	15,0	49	13,0	18,8	24,5
35	8,5	12,0	15,5	50	13,4	19,4	25,3
36	8,8	12,4	16,0	51	13,9	20,0	26,2
37	9,0	12,8	16,6	52	14,3	20,7	27,1
38	9,3	13,2	17,1	53	14,8	21,4	28,0
39	9,6	13,6	17,7	54	15,3	22,1	29,0
40	9,9	14,1	18,3	55	15,8	22,9	30,1
41	10,2	14,5	18,9	56	16,3	23,7	31,2
42	10,5	15,0	19,5	57	16,9	24,6	32,3
43	10,8	15,5	20,2	58	17,5	25,5	33,5
44	11,2	16,0	20,8	59	18,1	26,5	34,8

Для измерения окружности деревьев можно использовать сантиметровую ленту, а высоты травяно-кустарничкового яруса – деревянную или металлическую линейку.

При изучении подроста и всходов к подросту относят молодые деревья, высота которых не превышает  $\frac{1}{4}$  высоты верхнего полога. К примеру, если лес имеет высоту 16 м, то к подросту относят деревья высотой до 4 м, а более высокие деревья – к древостою.

Всходами принято считать все молодые деревья не выше 10 см. Целесообразно внутри описываемой пробной площади по параллельным трансектам через определенные промежутки, например, через 2 или 3 м, заложить большое число малых площадок (площадью 1 м<sup>2</sup> или больше) и подсчитать на них число всходов и подроста каждой породы. Выбор малых площадок можно производить и методом



случайного отбора. Учет деревьев, образующих подрост и всходы, удобнее всего вести по высотным группам: 1 – до 10 см (всходы), 2 – от 10 до 50 см (2 – 5-летние растения), 3 – от 50 до 100 см (5 – 10-летние растения), 4 – выше 100 см (более 10 лет).

На каждой пробной площади необходимо подсчитывать число особей семенного и порослевого происхождения.

Для оценки обилия травянистых видов в фитоценозах (как в лесных, так и в степных и луговых) пользуются 6-ти бальной шкалой Ж. Браун-Бланке (Braun-Blanquet, Pavillard, 1925) либо шкалой О. Друде (Drude, 1913), согласно которой приняты следующие ступени обилия:

*soc* (*sociales*) – растения смыкается надземными частями, образуя фон;

*cor*<sub>3</sub> (*copiosae*<sub>3</sub>) – растения встречается очень обильно;

*cor*<sub>2</sub> (*copiosae*<sub>2</sub>) – особей много;

*cor*<sub>1</sub> (*copiosae*<sub>1</sub>) – особей довольно много;

*sp* (*sparsae*) – растения встречаются в небольшом количестве, рассеянно;

*sol* (*solitariae*) – растения встречаются в очень малом количестве, редкими экземплярами.

*un* (*unicum*) – вид встречен на площадке в единственном экземпляре.

При пользовании шкалой Друде неизбежно приходится сочетать представление о количестве экземпляров каждого вида с представлением о покрытии, т. е. о занимаемой им площади. Приблизительно можно принять, что во многих случаях отметка *soc* будет соответствовать покрытию особями данного вида более 90% площади участка, отметка *cor*<sub>3</sub> — 90—70%, *cor*<sub>2</sub> — 70— 50%, *cor*<sub>1</sub> — 50—30%, *sp* — 30—10%, *sol* — менее 10%. В тех случаях, когда особей какого-либо вида очень много, но они очень мелкого размера (например, некоторые весенние эфемеры, как крупка и др.), будет иметь место большое расхождение между обилием и покрытием. В этих случаях при пользовании шкалой Друде в основном принимают во внимание именно количество особей, а не площадь покрытия. Могут быть и разные переходные случаи.

Для выявления полного флористического списка можно рекомендовать следующую последовательность осмотра площадки.

Сначала ее обходят по периметру и записывают все встреченные виды, затем пересекают площадку по диагоналям, дополняют список и одновременно проводят оценку обилия с занесением в бланк.

Все растения, которые не удалось определить непосредственно в полевых условиях, собираются в гербарий с этикеткой, на которой указана дата, номер описания и условный номер неизвестного вида в списке. После определения этот номер заменяется на соответствующее название вида.

Название типа сообщества (ассоциации) дается по окончании работы. Для этого используется доминантный подход — в названии ассоциации указываются латинские названия преобладающих видов для каждого из ярусов. Доминанты одного яруса объединяются знаком + («плюс»), а доминанты, расположенные в разных ярусах, разделяются знаком – («минус»). Например, сообщество с преобладанием древостоя березы повислой и участием липы сердцелистной, с доминированием в подлеске бересклета бородавчатого, а в травяно-кустарничковом ярусе — сныти обыкновенной и ландыша майского получает название: асс. *Betula pendula* + *Tilia cordata* — *Euonymus verrucosa* — *Aegopodium podagraria* + *Convallaria majalis*. Если в одном ярусе в качестве содоминантов выступают разные виды, они перечисляются, начиная с более обильного. Название сообщества на русском языке даётся в порядке возрастания их относительной численности. Поэтому приведённое латинское название сообщества будет читаться как липо-березняк бересклетово-ландышево-снытевый.

## 1.2. Характеристика местообитания

Видовой состав, запасы фитомассы, продуктивность того или иного фитоценоза определяются условиями местообитания (Тарасов, 1981). Поэтому изучение экологических условий является обязательным элементом биогеоценологического исследования. К факторам, оказывающим влияние на растения, относятся рельеф, световой и водный режимы, плодородие почвы, механический состав почвы и другие.

Размещение фитоценозов по территории и их продуктивность в условиях юго-востока европейской части России в значительной мере

определяются мезорельефом. Элементами мезорельефа являются склоны балок. При изучении фитоценоза необходимо установить, на каком элементе мезорельефа он находится, определить экспозицию склона, его крутизну (угол склона) и протяженность.

Сильное влияние на характер нижних ярусов леса оказывает освещенность. В тенистых лесах, травяной покров иногда совсем отсутствует. Такие леса называются мертвопокровными. Напротив, в светлых лесах лесные растения вытесняются степными. Силу света измеряют с помощью люксметра и выражают в люксах. Чтобы определить разницу в освещенности в различных фитоценозах, надо измерять силу света в одно и то же время при одной и той же облачности и на одной высоте, например, при безоблачном небе на уровне подлеска (1,5 м), в промежутке времени между 12 и 13 часами.

Очень важным показателем является также влажность воздуха, определяемая психрометрами, т.к. лесные фитоценозы сильно отличаются друг от друга по данному показателю.

Для изучения почвы фитоценоза делают почвенные разрезы, на которых выделяют почвенные горизонты, определяют их мощность и описывают их в соответствии с методикой, принятой в почвоведении. Затем из каждого горизонта почвы берут пробы для определения влажности и содержания гумуса. Для пересчета процентного содержания гумуса на вес из каждого горизонта буром берут пробы почвы определенного объема для установления объемного веса.

Физико-химическая характеристика важнейших факторов, составляющих условия существования растений, в экспедиционных условиях затруднена и не всегда доступна, в особенности при маршрутном обследовании обширной территории или очень большого числа сообществ. Характеристика растительного покрова позволяет провести экологическую оценку местообитания изучаемого вида с помощью экологических шкал – фитоиндикацию. Под экологической шкалой понимают последовательность ступеней уровней фактора и соответствующие уровни ответных реакций организмов. На каждый отдельный фактор составлена отдельная шкала. Поэтому она несёт имя того фактора, по которому построена. Шкалы объединены в экологическую таблицу. Используются экологические шкалы Л.Г.

Раменского (Раменский и др., 1956), Г. Эленберга (Ellenberg, 1953, 1974, 1979; цитир. по: Воронов, 1973), Д.Н. Цыганова (1983), Э. Ландольта (Landolt, 1977; цитир по: Воронов, 1973) и др. Экологические шкалы, необходимые для анализа положения изучаемого вида в экологическом пространстве, размещены на сайте «Ценофонд лесов Европейской России» (<http://mfd.cepl.rssi.ru/flora/ecoscale.htm>). Экологические шкалы разработаны для разных природных зон и требуют адаптации к условиям, в которых проводится конкретное исследование.

А.Л. Бельгардом (1950; цитир. по: Воронов, 1973) была разработана «**система экоморф**» для условий степной зоны. В ней выделяются группы видов по отношению к сообществу в целом – ценоморфы (сильванты – Sil, степанты – St, пратанты – Pr, палюданты – Pal, рудеранты – Ru), к световому режиму – гелиоморфы (гелиофиты – He, сциогелиофиты – ScHe, гелиосциофиты – HeSc, сциофиты – Sc), к солевому режиму, или трофности почвы – трофоморфы (олиготрофы – OgTr, мезотрофы – MsTr, мегатрофы – MgTr), к режиму почвенного увлажнения – гигроморфы (ксерофиты – Ks, мезоксерофиты – MsKs, ксеромезофиты – KsMs, мезофиты – Ms, гигромезофиты – HgrMs, мезогигрофиты – MsHgr, гигрофиты – Hgr, ультрагигрофиты – UHgr), к тепловому режиму – термоморфы (олиготермы – OgT, мезотермы – MsT, мегатермы – MgT), к климату – клиаморфы (фанерофиты – Ph, хамефиты – Ch, гемикриптофиты – HCr, криптофиты – Cr, терофиты – Th). Система экоморф А.Л. Бельгарда первоначально включала список лишь из 180 видов. Впоследствии этот список дополнялся и расширялся. Система экоморф позволяет характеризовать каждый фитоценоз в целом посредством экоформул и экоспектров и осуществлять качественное сравнение различных сообществ между собой.

Н.М. Матвеев (2006) систему экоморф растений А.Л. Бельгарда оптимизировал для лесостепной и степной зон (табл. 2), расширив группу ценоморф путём включения в неё таких, как: сорно-степные, или степанты-рудеранты (StRu); сорно-луговые, или пратанты-рудеранты (PrRu) и сорно-лесные, или сильванты-рудеранты (SilRu).

Таблица 2

Фитоиндикационная характеристика экоморф растений  
(по Н.М. Матвееву, 2001, 2003)

Экоморфы и их условные обозначения	Экологический оптимум, баллы	Тип режима
<b>Гелиоморфы</b>		
Ультрасциофиты (USc)	0-1 (0,5)	Ультратеневой
Сциофиты (Sc)	1	Теневой
Гелиосциофиты (HeSc)	2	Полутеневой
Сциогелиофиты (ScHe)	3	Полуосвещённый
Гелиофиты (He)	4	Осветлённый
Ультрагелиофиты (UHe)	5	Ультраосвещённый
<b>Трофоморфы</b>		
Ультраолиготрофы (UOgTr)	0-1 (0,5)	Особо бедные (бесплодные) почвы (грунты)
Олиготрофы (OgTr)	1	Скудные (малопродуктивные) почвы
Мезотрофы (MsTr)	2	Среднебогатые (среднепродуктивные) почвы
Мегатрофы (MgTr)	3	Богатые (продуктивные) почвы
Галомегатрофы (HMgTr)	4	Солонцы
Галофиты (Hal)	5	Солончаки
<b>Гигроморфы</b>		
Ксерофиты (Ks)	0-1 (0,5)	Сухой
Мезоксерофиты (MsKs)	1	Сухолюбивый
Ксеромезофиты (KsMs)	1-2 (1,5)	Свежелюбивый
Мезофиты (Ms)	2	Свежий
Гигромезофиты (HgrMs)	2-3 (2,5)	Влажнотеневой
Мезогигрофиты (MsHgr)	3	Влажный
Гигрофиты (Hgr)	4	Сырой
Ультрагигрофиты (UHgr)	5	Мокрый
Гидрофиты (Hd)	6	Водный
<b>Термоморфы</b>		
Ультраолиготермы (UOgT)	1	Холодный (полярный)
Олиготермы (OgT)	2	Умеренно холодный (бореальный)
Мезотермы (MsT)	3	Умеренный (суббореальный)
Мегатермы (MgT)	4	Умеренно тёплый (субтропический)
Ультрамегатермы (UMgT)	5	Тёплый (тропический)

Каждая из экоморф оценивается в баллах по положению её экологического оптимума в соответствующем типе режима, в условиях которого она представлена нормальными видовыми ценопопуляциями с наибольшей долей участия (по проективному покрытию, обилию, встречаемости, жизненности, фитомассе) в сложении сообществ. При отклонении от оптимума названные количественные показатели видовых ценопопуляций данной экоморфы снижаются.

Для определения градации соответствующего экологического режима в исследуемом сообществе Н.М. Матвеев (2006) рекомендует использовать формулу:

$$A = \frac{\sum x_i}{\sum k_i},$$

где  $A$  – искомая градация определяемого экологического режима;  $x_i$  – экологический оптимум  $i$ -го вида или  $i$ -ой экоморфной группы видов;  $k_i$  – значимость (покрытие в % или обилие – покрытие в баллах)  $i$ -го вида или  $i$ -ой группы видов.

Значимость вида или группы видов (по экоморфам) оценивается либо по проективному покрытию (%), либо – по обилию-покрытию (в баллах). Например, по шкале Ж. Браун-Бланке соответствие баллов и покрытия следующее: 1 - 1-5 %; 2 – 6-25 %; 3 – 26-50 %; 4 – 51-75 %; 5 – 76-100 %. Обилие – покрытие  $r$  и + составляет 0.1 балла.

Предположим, что в естественной липовой дубраве (5 дубов и 5 лип) с сомкнутостью крон 0.8 (или 80%) дуб черешчатый (ксеромезофит) имеет покрытие 40% (3 балла по шкале Браун-Бланке) и липа мелколистная (мезофит) имеет такое же покрытие – 40% (3 балла). В травостое представлены виды, относящиеся к ксеромезофитам (суммарное их покрытие 10% или 2 балла), мезофитам (покрытие 30% или 3 балла), гигромезофитам (покрытие 40% или 3 балла) и мезогигрофитам (покрытие 20% или 2 балла). Вычисляем градацию почвенного увлажнения в данном лесонасаждении по вышеприведённой формуле, исходя из оценки экологического оптимума гигроморф (см. табл. 2).

1. По проективному покрытию (%):

$$A = \frac{\sum x_i}{\sum k_i} = \frac{3 \cdot 40 + 3 \cdot 40 + 2 \cdot 10 + 3 \cdot 30 + 3 \cdot 40 + 2 \cdot 20}{3 + 3 + 2 + 3 + 3 + 2} = \frac{300}{16} = 18.75$$

## 2. По облию-покрытию (баллы):

$$A = \frac{\quad}{\quad} = 2.06$$

В результате вычислений получены сходные результаты, свидетельствующие о том, что для исследуемой липовой дубравы свойственен свежий гигротоп (свежий тип увлажнения почвы). Подобным образом, используя данные табл. 2 и сведения о видовом составе (с учётом проективного покрытия или облию-покрытия) сообщества, можно определить градацию других экологических режимов в нём (Матвеев, 2001, 2003).

Данный подход применим не только к лесным, но и к степным, луговым, кустарниковым и иным естественным сообществам. В искусственных лесонасаждениях экоморфный анализ должен включать только виды, внедрившиеся, самопроизвольно (древостой и антропогенный кустарниковый подлесок не учитываются) (Матвеев, 2006).

Широко используются в России и странах бывшего СССР шкалы Л.Г. Раменского, разработанные на основе геоботанических описаний более 20 тысяч фитоценозов. Сравнительная фитоценологическая таблица включает следующие шкалы: увлажнения (У), богатства и засоленности почвы (БЗ), пастбищной дигрессии (ПД), переменности увлажнения (ПУ), аллювиальности (А). Ниже приводится характеристика шкал по группам ступеней с пояснениями по работе Л.Г. Раменского с соавторами (1956) с сокращениями и изменениями согласно современному состоянию основных положений экологии и почвоведения (Экологическая..., 2010).

**Шкала увлажнения** состоит из 120 ступеней и охватывает все различия в водном довольствии растений, наблюдаемые на территории нашей страны.

**Ступени 1-17** отражают пустынное увлажнение. За год выпадает 150 мм и меньше осадков. Условия крайнего недостатка влаги в почве. Для таких условий характерны почвы: такыры, пустынные серозёмы, серо-бурые пустынные, бурые полупустынные.

**Ступени 18-30** – полупустынное (полупустынно-степное) увлажнение, близкое к пустынному. Количество годовых осадков 150-250 мм. Почвы светлокаштановые, бурые полупустынные, серо-бурые пустынные.

**Ступени 31-39** – сухостепное увлажнение. Годовое количество осадков 250-300 мм. Почвы тёмно-каштановые и южные чернозёмы.

**Ступени 40-46** – увлажнение среднестепное. Почвы – чернозёмы обыкновенные и типичные.

**Ступени 47-52** – увлажнение влажностепное или лугопустынное. Богатые луговые степи и остепнённые сухие луга, а также варианты сухих лесов в лесостепной зоне. Почвы – чернозёмы выщелоченные и оподзоленные, серые лесные, луговые. Такое увлажнение можно встретить в понижениях без избыточного увлажнения – по высоким частям речных долин, наиболее дренированным сухим склонам.

**Ступени 53-63** – увлажнение сухих и свежих лугов и лесов. Почвы луговые (дерновые), подзолистые, коричневые бурозёмы. Такое увлажнение встречается по различного рода понижениям – долинам рек, западинам, лиманам.

**Ступени 64-76** – влажнолуговое увлажнение. Почвы луговые – обычно без признаков оглеения или со слабым оглеением. Такое оглеение встречается по пониженным элементам рельефа – по днищам балок, западинам, лиманам, поймам рек. Это – лучшие местообитания для луговых злаков.

**Ступени 77-88** – сыролуговое увлажнение. Сильно сырые луга и леса, а также относительно сухие торфяники верховых болот. Почвы лугово-болотные сильно оглеенные или торфяные.

**Ступени 89-93** – болотно-луговое увлажнение. Болотистые луга и леса, слабо обводнённые болота. Такое увлажнение наблюдается по избыточно затопляемым лиманам или их центральным частям, по притеррасным и прирусловым частям пойм.

**Ступени 94-103** – болотное увлажнение. Средне и сильно обводнённые болота.

**Ступени 104-109** – местообитания прибрежно-водной растительности.

**Ступени 110-120** – местообитания водной растительности.



**Шкала переменности увлажнения** состоит из 20 ступеней, отражающих переменное (по сезонам) и неустойчивое (в смене лет) изменения увлажнённости местообитания. Переменность увлажнения приводит к ясно выраженной экологической разнородности растительных группировок, к совмещению в них растений сухих мест и влаголюбов.

**Ступени 1-4 – высоко обеспеченное водное питание.** Охватывает местообитания с равномерным бескризисным увлажнением. Оно наиболее полно осуществляется в местах, питаемых залегающими на небольшой глубине подземными водами с устойчивым уровнем.

**Ступени 5-6 – средне обеспеченное водное питание.** Местообитания этого рода создаются при обеспечении водного питания близкими грунтовыми водами (у выходов ключей). Растения, характерные для местообитаний с высоко обеспеченным водным питанием, здесь сочетаются с растениями, более выносливыми к временному недостатку влаги.

**Ступени 7-8 – переменное обеспеченное водное питание.** Обеспеченность водного питания в этих местообитаниях заметно изменчива по годам и за вегетационный период, но не настолько велика, чтобы вызвать у растений соответствующие защитные приспособления. Ощутимых кризисов в снабжении растений влагой здесь не наблюдается. Такие местообитания приурочены к северным склонам, полянам, к выходам грунтовых вод; эта приуроченность с углублением в степную зону становится всё более строгой и узкой.

**Ступени 9-11 – умеренно переменное увлажнение.** В таких местообитаниях создаются благоприятные условия для развития растений, потому что наступающие временами иссушение почвы и понижение уровня грунтовых вод способствуют аэрации почвы, улучшают нитрификацию и другие микробиологические процессы в почве.

**Ступени 12-15 – сильно переменное увлажнение.** К местообитаниям данного типа относятся, прежде всего, луга речных пойм и разного рода понижений, весной затопляемых, летом дренируемых рекой, а также многие материковые местообитания, особенно в степной зоне. Сильной переменности увлажнения

способствует солонцеватость почв и наличие в них резко выраженного обогащённого коллоидами и водоупорного иллювиального горизонта.

**Ступени 16-20 –резко переменное увлажнение.** Такие условия складываются в долго и поздно заливаемых поймах крупных рек и лиманах.

**Шкала богатства и засоления** включает 30 ступеней, отражающих как возрастающее засоление, так и богатство почвы. Активное богатство почвы – её обеспеченность элементами пищи растений в подвижной и усвояемой растениями форме. В природе наблюдается непрерывный ряд грааций от резко выщелоченных, кислых и бедных к богатым, а от них – в различной степени засоленным почвам. Это оправдывает соединение в одну шкалу ряда возрастающего засоления и ряда богатства почвы, хотя, по существу, богатство и засоленность – явления разного порядка, которые могут и по-разному сочетаться.

**Ступени 1-3 – особо бедные почвы и торф (олиготрофные).** Реакция почв кислая:  $pH = 4.0-4.5$ . Почвы сильно выщелочены, нередко песчаные. К этой группе относятся местообитания сосняков на песках.

**Ступени 4-6 – бедные почвы и торф.** Реакция почвы кислая:  $pH = 5.0-5.5$ . Почвы выщелоченные, нередко песчаные и супесчаные. Сюда относятся местообитания сосняков.

**Ступени 7-9 –небогатые почвы (мезотрофные).** Реакция почвы слабо кислая:  $pH = 5.5-6.5$ . Почвы обычно подзолистые, дерново-подзолистые, подзолисто-глеевые, торфяные и другие.

**Ступени 10-13 –довольно богатые почвы.** Реакция их обычно в пределах от слабо кислой до нейтральной:  $pH = 6.0-7.5$ . Почвы луговые, лесостепные, выщелоченные чернозёмы. К местообитаниям с такими почвами относятся некоторые поёмные и низинные луга и болота, а также степи и дубравы.

**Ступени 14-16 – богатые почвы (эутрофные).** Реакция их нейтральная:  $pH = 7.0-7.5$ . Сюда относятся типичные, обыкновенные и южные чернозёмы, незасоленные, каштановые, луговые и другие слабо выщелоченные почвы, достаточно богатые элементами питания растений, но, вместе с тем, свободные от вредных солей. На таких почвах произрастает степная, частично полупустынная и пустынная

растительность. С этими местообитаниями связана растительность лучших пойменных и низинных лугов, дубрав, некоторых болот.

**Ступени 17-19 – слабо солончаковатые почвы.** Реакция их слабо щелочная:  $\text{pH} = 7.5-8.3$ . Слабо солончаковатые почвы наиболее широко представлены среди луговых почв по поймам рек, по низинам; экологически слабая солончаковатость широко распространена также по равнинам и низинам степных, полупустынных и пустынных зон. В водных вытяжках этих почв в верхнем полуметровом слое имеется немного анионов –  $\text{SO}_4''$  и  $\text{Cl}'$ . На лугах со слабо солончаковатыми почвами в составе луговой растительности всегда имеется незначительная примесь относительно солелюбивых видов растений.

**Ступени 20-21 – средне солончаковые почвы.** Реакция почвы слабо щелочная:  $\text{pH} = 7.5-8.3$ . Чаще это луговые солончаковые почвы с заметным содержанием сернокислых и хлористых солей в верхнем полуметровом слое ( $\text{SO}_4''$  0.1-0.3 %,  $\text{Cl}'$  0.05-0.1 %). Относительно солелюбивые виды растений образуют значительную примесь в травостое.

**Ступени 22-23 – сильно солончаковые почвы (солончаки).** На высоких ступенях увлажнения это – луговые солончаки. Реакция их обычно щелочная –  $\text{pH}$  до 9.1. В верхнем полуметровом слое значительное количество сернокислых, хлористых и других солей ( $\text{SO}_4''$  до 0.5 %,  $\text{Cl}'$  до 0.3 %). В травостое относительно солелюбивые растения являются преобладающими, наблюдается примесь солончаковых форм растений.

**Ступени 24-28 – резко солончаковые почвы (солончаки).** В верхнем полуметровом слое почвы и непосредственно у поверхности наблюдается большое количество солей (несколько процентов). В составе травостоя преобладают солевыносливые растения.

**Ступени 29-30 – злостно солончаковые почвы (злостные солончаки).** Накопление солей у поверхности и на поверхности почвы достигает таких количеств, что солончаковая растительность сильно изреживается или растительность полностью отсутствует. Поверхность почвы бывает покрыта солевой коркой.

**Шкала аллювиальности** включает 10 ступеней, отражающих весь диапазон отношений растений к мощности ежегодного отложения наилка.

В условиях регулярного (ежегодного) отложения наилка мощностью около 1-3 см развиваются характерные луговые растительные группировки с господством вегетативно подвижных растений. Растительные группировки этого типа и состава наблюдаются не только в поймах рек, но также в понижениях, заливаемых весной стоком талых вод, и внизу склонов с отложением делювия.

Влияние наилка на растительность сложное, комплексное. Вследствие содержания в наилке элементов питания растений он воздействует как удобрительное средство. Имеет значение и физическое влияние дробно растрескавшегося наилка, как своего рода мульчи. Вместе с тем, мощный наилок погребает почки и побеги растений, отчего некоторые растения угнетаются и гибнут. Но многие виды положительно реагируют на аллювиальность.

**Ступень 1 – местообитания без отложения наилка или со следами его.**

**Ступени 2-3 – очень слабо аллювиальные (или делювиальные) местообитания,** с которыми легко мирятся почти все виды растений. Наилка откладывается около 1 мм (ступень 2) и до 2-3 мм (ступень 3).

**Ступень 4 – слабо аллювиальные,** в среднем около 2-5 мм наилка. Уже заметен некоторый отбор, подавление «неаллювиальных» видов.

**Ступени 5-7 – умеренно аллювиальные местообитания,** отложение наилка: около 0.5 см для 5 ступени, около 1 см для 6 ступени и около 2 см для 7 ступени.

**Ступень 8 – сильно аллювиальные.** Отложения наилка 2-4 см. К этой ступени приурочены наиболее ярко выраженные растительные группировки с господством ползучекорневищных злаков.

**Ступень 9 – характеризует избыточное отложение наилка мощностью 5-10 см.** Растительный покров здесь изреживается, в него внедряются однолетние сорняки, семена которых были принесены с частицами наилка.

**Ступень 10 – мощность наилка катастрофическая,** обычно 10-15 см и выше. Аборигенная растительность подавлена, господствуют наносные сорняки или площадь оголена. Подобную катастрофу

вызывает и менее мощный наилок, если он ложится на слой опавших древесных листьев.

Песчаные наносы не оказывают удобрительного действия, не могут улучшить физического состояния и водных свойств почвы. Песчаный нанос, даже весьма мощный, легко пронизывается побегами трав.

**Шкала пастбищной дигрессии** включает 10 ступеней, охватывающих всё многообразное влияние выпаса на растительность и почву.

При выпасе животных происходит угнетение поедаемых растений путём отчуждения их надземных частей, а иногда и вырыванием их с корнем. Это «избирательное» угнетение видов растений неодинаково, находится в зависимости от различных потребностей скота, а также интенсивности, длительности и сезона использования пастбищного угодья. Большое значение имеет повреждение и затаптывание растений (в том числе и непоедаемых). Устойчивость к вытаптыванию у разных видов неодинакова.

Необходимо учитывать также и механическое воздействие животных на почву: её уплотнение (влажные суглинистые почвы), поверхностное распыление (те же суглинки, но сухие), разбивание с разрушением дернины (сырые почвы, пески).

**Ступени 1-2 – влияние выпаса отсутствует или очень слабое.** Эти ступени относятся к лугам, на которые выпас не оказал заметного влияния, а сенокошение также не сильно повлияло на их травостой. Эту стадию дигрессии можно назвать исходной.

**Ступени 3-4 – слабое влияние выпаса, сенокосная стадия.** Выпас, а также раннее сенокошение угнетают разнотравье и дают перевес верховым злакам: тимopheевке, овсянице луговой, костру безостому, бекмании, в меньшей мере – лисохвосту луговому, то есть таким злакам, которые наиболее нужны на сенокосах. Такое влияние выпаса может быть названо сенокосной стадией пастбищной дигрессии.

**Ступень 5 – умеренное влияние выпаса.** Коренное разнотравье почти выпадает, появляются и разрастаются пастбищные сорняки:

верховые сенокосные злаки начинают вытесняться низовыми пастбищными. Эту стадию можно назвать полупастбищной.

**Ступени 6-7 – сильное влияние выпаса (пастбищная стадия).**

Характеризуется господством низовых пастбищных злаков - мятлика лугового, овсяницы красной, полевицы побегообразующей; бобовых – клевер ползучий, клевер шуршащий; много многолетних сорняков – одуванчик, кульбаба осенняя, лапчатка гусиная, лютики и др.

**Ступень 8 – полусбой.** Примыкает к предыдущей стадии; верховые злаки более или менее полно выпали, сорные многолетники разрослись, тесня пастбищные злаки, травостой редет, в него внедряются сбоевые сорные однолетники – гречишка птичья, мятлик однолетний, пастушья сумка и др. Нередко обильно разрастаются колючие малолетники – виды родов *Cirsium*, *Carduus*.

**Ступень 9 – сбой.** Растительный покров сильно изрежен, образован преимущественно спорышом и другими сбоевыми однолетниками.

**Ступень 10 – абсолютный сбой.** Почва практически оголена. Встречаются лишь одиночные сорные растения в угнетённом состоянии, покрывающие незначительную часть площади.

Чем менее благоприятны условия местообитания, тем более сокращается и упрощается ряд пастбищной дигрессии, тем более стираются его промежуточные звенья и раньше наступает внедрение малолетников или эфемероидов.

Установлено, что каждый вид характеризуется различной экологической амплитудой при "массовом", "обильном", "умеренном", "малом" и "единичном" "проективном обилии" в разных сообществах, как это видно из фрагмента "Сравнительной экологической таблицы растений" Л.Г. Раменского и др. (1956) (табл. 3).

В таблице Л.Г. Раменского дана оценка (в баллах) экологического минимума и экологического максимума 1400 видов растений с учётом их участия в сложении травостоя на сенокосах и пастбищах. В.И. Гориным с соавторами ведётся постоянная работа по дополнению и расширению шкал Л.Г. Раменского применительно к природно-климатическим условиям Саратовского Поволжья на основе собранных

в данном регионе полевых материалов (Экологическая..., 2010; Горин, Болдырев, 2013).

Таблица 3

Фрагмент сравнительной экологической таблицы растений  
Л.Г. Раменского и др.

Вид	Шкалы	Массово: >8%	Обильно: 2,5-8%	Умеренно: 0.3-2.5%	Мало; 0,1-0.2 %	Единично □0,1
		m	c	п	p	s
<i>Achillea millefolium</i>	У	58-63	46-67	41-70	37-80	-83
	БЗ	10-14	9-17	7-20	5-22	3-23
	ПД	-	3-6	2-8	1-9	-
	ПУ	-	6-10	5-12	4-16	3-16
	А	1-Э	0-4	0-7	0-8	-
<i>Alopecurus pratensis</i>	У <sub>1</sub> <sup>**</sup>	66-77	61-84	54-87	53-89	-95
	У <sub>2</sub>	60-68	55-76	53-82	52-86	51-90
	БЗ	12-17	10-18	9-20	8-21	7-23
	ПД	1-2	1-5	1-7	1-8	1-9
	ПУ	10-15	-	9-17	6-18	-
	А	-8	-9	1-10	1-10	-
<i>Bromopsis inermis</i>	У <sub>1</sub>	62-66	49-74	47-77	-80	-86
	У <sub>2</sub>	51-60	48-65	47-71	43-78	-82
	У <sub>3</sub>	62-80	55-86	42-87	29-89	22-98
	БЗ	13-18	11-20	10-21	8-23	8-24
	ПД	3-5	2-7	1-8	1-9	-
	ПУ	11-15	10-18	8-19	-	-
	А	-8	-	-	-	-

**Примечание.** \* шкалы: увлажнения (У), богатства и засоленности почвы (БЗ), пастбищной дигрессии (ПД), переменности увлажнения (ПУ), аллювиальности (А); \*\* в нижнем индексе: 1 - лесная зона, 2 - степная зона, 3 - пустынная зона.

Чтобы получить экологическую характеристику местообитания растительного сообщества, необходимо вычислить общие для фитоценоза ступени по шкалам исследуемых факторов. Для этого и пригодится обязательно проведённый учёт обилия видов изучаемого сообщества при его описании. Учёт обилия может проводиться с помощью разных глазомерных шкал, поэтому следует используемую в конкретном случае шкалу соотнести со шкалой, применённой Л.Г. Раменским с соавт. (1956). В.И. Горин с соавторами предложили следующее сопоставление (Экологическая..., 2010) (табл. 4).

При учёте проективного покрытия в процентах или обилия - путём измерения расстояний между соседними особями - может быть полезным такое сопоставление (табл. 5).

Таблица 4

Пример сопоставления глазомерных шкал проективного покрытия и  
обилия растений

Наименование классов обилия и условные обозна- чения по Л.Г. Раменскому с соавторами (1956)	Количественное выражение классов обилия в глазомерных шкалах		
	Л.Г. Раменского с соавторами (1956), %	Друде	6-ти бальной Браун- Бланке, балл
Массово (m)	> 8.0	$\geq \text{cop}_2$	$\geq 5$
Обильно (с)	2.5-8.0	$\text{cop}_1$	4
Умеренно (n)	0.3-2.5	Sp	3
Мало (p)	0.1-0.3	Sol	2
Единично (s)	$\square 0.1$	un	1

Для определения общих ступеней удобен метод, разработанный В.И. Гориным (2002). На примере данных описания модельного фитоценоза (табл. 6) это выглядит следующим образом:

шаг первый. Поиск в ряду «от» показателя с максимальным значением, в рассматриваемом случае это 60. Далее, поиск в ряду «до» показатель с минимальным значением, в данном примере это 56.

Таблица 5

Соответствие между ступенями шкалы обилия Друде, средними  
наименьшими расстояниями между и проективным покрытием

Шкала обилия О.Друде		Средние наименьшие расстояния между растениями (по: Уранов, 1935), см	Проективное покрытие (по: Тарасов, 1981), %
soc (socialis)	растения смыкаются надземными частями, образуя фон		более 90
cop <sub>3</sub> (copiosae)	растения очень обильны	не более 20	90-70
cop <sub>2</sub>	растения обильны	20-40	70-50
cop <sub>1</sub>	растения довольно обильны	40-100	50-30
sp (sparsae)	растения редки, встречаются рассеянно	100-150	30-10
sol (solitariae)	растения единичны	всегда более 150	менее 10
un (unicum)	вид встречен на пробной площади в единственном экземпляре		



Таблица 6

Описание растительности краткочернового луга лесостепной зоны  
(по: Раменский с соавт., 1956)

Названия видов	Классы обилий растений в описании	Ограничительные ступени по шкале увлажнения от - до
<i>Trifolium pratense</i> L.	m	58 – 72
<i>Achillea millefolium</i> L.	m	58 – 63
<i>Koeleria delavignei</i> Czern. ex Domin	m	50 – 56
<i>Poa pratensis</i> L.	c	60 – 89
<i>Festuca sulcata</i> Hack.	c	17 – 59
<i>Galium verum</i> L.	c	45 – 65
<i>Carex praecox</i> Schreb.	c	49 – 73
<i>Filipendula vulgaris</i> Moench	n	45 – 64
<i>Geranium collinum</i> Steph.	n	55 – 89
<i>Knautia arvensis</i> (L.) Coult.	n	42 – 64
<i>Tragopogon brevirostris</i> DC.	n	47 - 59

**Примечание:** m - массово; c - обильно; n - умеренно

шаг второй. Вычисление среднего показателя для найденных двух значений:  $60+56=116:2=58$ . Это и будет искомая общая ступень (согласно выше приведённой характеристике шкалы увлажнения данная ступень соответствует увлажнению сухих и свежих лугов и лесов).

Данный метод имеет под собой экологическую основу. Все виды сообщества в той или иной степени имеют доступ к общим ступеням экологического фактора (в данном случае - увлажнения). Следовательно, необходимо обозначить виды, которые находятся у границ доступа к общей ступени. Поиск в ряду «от» максимального значения - это поиск пограничного влаголюбивого вида, а - наименьшего значения в ряду «до» - это поиск пограничного засухоустойчивого вида. Амплитуды толерантности других видов будут обязательно в той или иной степени пересекать найденные координатные точки. Отсюда следует, что среднее арифметическое значение обозначенных ступеней и будет значением общей ступени. Наглядность работы приведённого метода даёт рис.1.

Проведя аналогичные вычисления (и построения) по другим экологическим факторам получают комплексную оценку (характеристику) местообитания изучаемого сообщества.

Следует заметить, что данный способ оценки экологических условий основан на учёте показаний большинства видов растений, имеющих значительные обилия.

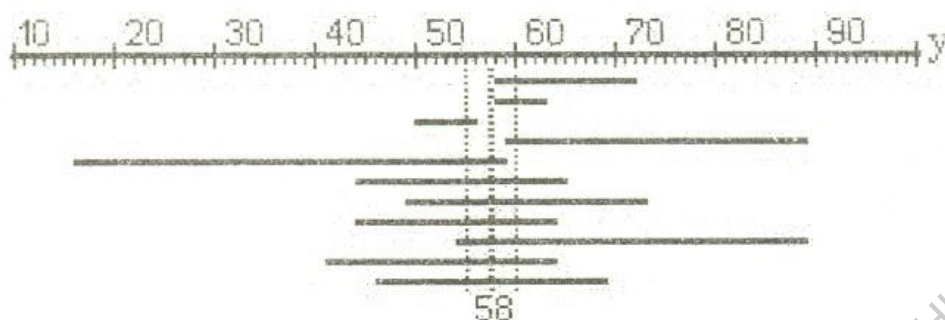


Рис. 1. Схема размещения амплитуд толерантности видов модельного описания (табл. 6) по шкале увлажнения (У). Порядок амплитуд соответствует порядку видов в таблице. Пунктирными линиями обозначены: тонкими - ступень шкалы с максимальным значением («от») и ступень с минимальным значением («до»), а толстой – общая ступень (По: Экологическая..., 2010)

## **2. Изучение морфологических особенностей растений**

При популяционных исследованиях необходимо изучение морфологических особенностей растений. Любая особь растений характеризуется определённым набором признаков, которые выступают в качестве параметров её морфологического статуса. В качестве морфологического признака у особей растений выступает любая, «поддающаяся сравнению структурная особенность организма как компонента фенотипа» (Паавер, 1976, цитир по: Злобин, 1989).

Параметры морфогенеза информативно неравноценны в связи с их разным биологическим смысловым содержанием. Некоторые из них имеют очевидную адаптивную ценность для выживания и репродукции вида, другие, на первый взгляд, в этом отношении нейтральны. Однако при более углублённых исследованиях открывается приспособительный характер и этих признаков. К тому же, некоторые такие нейтральные признаки могут оставаться таковыми в обычных условиях существования популяции, но выступают как адаптивные в стрессовых ситуациях, создавая резервный запас прочности.

Выявление биологически и экологически информативных показателей при оценке особей как компонентов ценопопуляций – одна из важнейших и пока ещё мало разработанных проблем в учении о ценологических популяциях.

Морфологические признаки могут быть подразделены на качественные (например, присутствие на растении цветков, окраска цветков, форма листовой пластинки и т.п.) и количественные, учитывающие число метамеров или структур у растений (например, число боковых побегов, цветков на растении, число листьев и т.п.), а также размерность и массу тела растения и его отдельных частей (длина и ширина лепестков, размер листовой поверхности и т.п.). Количественные признаки обычно называют параметрами, а их учёт – морфометрией.

Качественные и количественные признаки особей оказываются полезными в разных отраслях популяционной биологии. На качественных признаках базируется, в частности, выделение возрастных состояний растений и анализ возрастных спектров популяций. Количественные признаки более полезны при исследовании онтогенетических адаптаций, при оценке жизненного состояния особей и построении виталитетных спектров популяций (Злобин, 1989).

### ***2.1. Морфометрическая характеристика растений***

В ценопопуляционных исследованиях экологической направленности наиболее информативны признаки, отражающие адаптацию организмов к среде обитания, фитоценотической обстановке и плотности популяции, а также признаки, обеспечивающие экологическую стабилизированность особей растений. По своей сущности большинство таких признаков связано с ростовыми процессами растений. Рост – один из важнейших показателей состояния растительного организма. Учёт показателей роста наиболее полно раскрывает морфогенез особи как процесс возникновения её формы, её морфологический статус на любой момент времени и положение в ценопопуляции.

Морфометрические параметры могут быть подразделены на следующие группы (Злобин, 1989):

1. Статистические, которые характеризуют морфометрический статус растения в тот или иной момент времени. В их число входят два вида параметров:

а) метрические, получаемые в результате простых измерений числа или размера морфоструктур. Сюда, в первую очередь, относятся фитомасса растения, число побегов, листьев, цветков, плодов или других счётных признаков, высота растения, побегов, размеры листьев, цветков, плодов и т.п. Общепринятая символика для обозначения морфометрических параметров базируется на латинских названиях этих параметров и приведена в табл. 7 (при необходимости вносятся дополнения и изменения набора параметров);

Таблица 7

Статистические метрические морфометрические параметры

Наименование	Условное обозначение	Размерность
Общая фитомасса растения	$W$	г
Фитомасса листьев	$W_L$	г
Фитомасса репродуктивных органов	$W_G$	г
Фитомасса корней	$W_{Rd}$	г
Фитомасса стеблей	$W_S$	г
Фитомасса отдельного листа	$w_L$	г
Фитомасса отдельного плода	$w_{Fr}$	г
Фитомасса отдельного семени	$w_{Sm}$	г
Площадь листьев растения	$A$	г
Площадь отдельного листа	$a_L$	г
Площадь поверхности корней	$A_{Rd}$	г
Высота растения	$H$	см
Диаметр растения	$D$	см
Число боковых побегов	$B$	шт
Длина побега	$L$	см
Длина стебля (во втором, третьем междоузлии)	$l$	см
Диаметр стебля (во втором, третьем междоузлии)	$d$	мм
Число листьев на побеге	$N_{fol}$	шт
Длина листовой пластинки	$L_{fol}$	см
Ширина листовой пластинки	$Wh_{fol}$	см (мм)
Толщина листовой пластинки	$S$	мм
Число цветков на побеге	$N_{fl}$	шт
Высота цветка	$h_{fl}$	мм
Диаметр цветка	$d_{fl}$	мм
Длина лепестка	$L_{pet}$	мм
Ширина лепестка	$Wh_{pet}$	мм
Число плодов на побеге	$N_{Fr}$	шт
Число соцветий	$N_I$	шт
Общее число метамеров	$N_M$	шт
Длина метамера	$l$	см

б) аллометрические, которые оценивают соотношения в развитии разных частей растения (табл. 8). Эти параметры по сравнению с метрическими имеют меньшую внутригрупповую дисперсию и поэтому стабильнее. Для ряда содержательных оценок морфогенеза они оказываются более полезными;

Таблица 8

Наиболее распространённые статистические  
аллометрические морфометрические параметры

Наименование	Расчётная формула	Размерность
Площадь листьев на единицу фитомассы	$LAR = A / W$	см <sup>2</sup> / г
Удельная поверхность	$S_o = \overline{\quad} / \overline{\quad}$	см / г
Площадь листьев на единицу фитомассы листьев	$SLA = A / W_L$	см <sup>2</sup> / г
Вес корней на единицу фитомассы	$RWR = W_{Rd} / W$	г / г
Фотосинтетическое усилие (вес листьев на единицу фитомассы)	$LWR = W_L / W$	г / г
Вес стеблей на единицу фитомассы	$SWR = W_S / W$	г / г
Отношение площади листьев к диаметру стебля	$ADR = A / d$	см <sup>2</sup> / см
Отношение высоты растения к диаметру стебля	$HDR = h / d$	см / см
Относительный прирост по высоте	$HWR = h / W$	см / г
Плотность соцветия	$P = N_{Fl} / l_{Fl}$	шт / см
Репродуктивное усилие	$RE I = (W_G / W)$	%
	$RE II = (W_G / A)$	%
	$RE III = N_{Sm} / W$	шт / г
	$RE IV = N_{Sm} / A$	шт / см <sup>2</sup>

2. Динамические, которые оценивают темпы роста и формирования особей растений и их отдельных частей за определённые промежутки времени. Динамические параметры имеют большое значение для оценки внутри- и межпопуляционных различий особей.

Различия в размерах не тождественны различиям в скорости роста. В число динамических параметров входят:

а) метрические, которые оценивают динамику в онтогенезе отдельного метрического признака. Их расчётные формулы приведены в табл. 9.

Таблица 9

Наиболее распространённые динамические метрические морфометрические параметры

Наименование	Расчётная формула	Размерность
Абсолютная скорость роста	$AGR = (W_2 - W_1)$	г/день
Абсолютная скорость формирования поверхности листьев	$AGR_A = (A_2 - A_1)$	см <sup>2</sup> /день
Относительная скорость роста	$RGR = (\ln W_2 - \ln W_1)$	г/г/день
Относительная скорость формирования поверхности листьев	$RGR_A = (\ln A_2 - \ln A_1)$	см <sup>2</sup> /см <sup>2</sup> /день
Продолжительность существования листьев	LAD I = ———	см <sup>2</sup> /день
	LAD II = ———	см <sup>2</sup> /день
Продолжительность существования фитомассы	BMD I = ———	г/день
	BMD II = ———	г/день

б) аллометрические, описывающие динамику в онтогенезе аллометрических соотношений. Наиболее важные формулы для этой группы параметров приведены в табл. 10.

Статистические метрические и аллометрические показатели характеризуют прошлые, уже реализовавшиеся уровни активности растительных организмов, а следовательно, условия их существования. Динамические дают информацию о темпах роста и в большей степени, чем статистические параметры, отражают жизненное состояние растений.

При использовании морфометрических методов необходимо единообразие в учётных единицах. Фитомассу выражают в сухом весе (наиболее точно – в абсолютно сухом). При учёте поверхности листьев измеряется лишь их верхняя сторона. Динамические показатели следует учитывать в период активного роста растений.

Наиболее распространённые аллометрические метрические морфометрические параметры

Наименование	Расчётная формула	Размерность
Нетто-ассимиляция	$NAR I = \frac{A}{L} = \frac{A}{L} \cdot \frac{1}{t}$	г/см <sup>2</sup> /день
	$NAR II = \frac{A}{L} = \frac{A}{L} \cdot \frac{1}{t}$	г/см <sup>2</sup> /день
Производительность формирования листовой поверхности	$LAR I = \frac{A}{L} = \frac{A}{L} \cdot \frac{1}{t}$	см <sup>2</sup> /г/день
	$LAR II = \frac{A}{L} = \frac{A}{L} \cdot \frac{1}{t}$	см <sup>2</sup> /г/день
	$LAR III = \frac{A}{L} = \frac{A}{L} \cdot \frac{1}{t}$	см <sup>2</sup> /г/день

Учёт полного комплекса морфометрических параметров связан с полным уничтожением растений, что ведёт к невозможности учесть те же признаки повторно на этих же особях. Необходимые сравнения получают сопоставлением ранжированных рядов. Для этого особи учёта в сроки  $T_1$  и  $T_2$  располагают в порядке возрастания их фитомассы, а затем сравнивают попарно. При этом объёмы выборок должны быть одинаковыми. При неравных объёмах выборок все особи можно разбить на три группы: мелкие, средние и крупные. Вычисления проводят сопоставлением средних показателей по этим группам.

При исследовании ценопопуляций редких и охраняемых видов растений измерения, связанные с отторжением фитомассы, исключены. В таких случаях следует ограничиться измерениями и подсчётами на живых, не изымаемых из ценопопуляции, особях, при минимальном их повреждении.

В ценопопуляционных исследованиях морфометрические методы характеризуют особи растений с исчерпывающей полнотой. Они позволяют: а) дать количественную оценку морфологическому статусу, росту и продукционным процессам растений, б) оценить взаимосвязанность отдельных параметров морфоструктуры растений и на этой основе характеризовать уровень целостности особей, в) получить информацию для последующего выявления ключевых, индикаторных морфологических параметров, на основе которых возможна комплексная оценка и диагностирование жизненного состояния особей растений, г) выявить пороги нормальной

реактивности растений и определить уровень изменчивости и пластичности морфоструктур при воздействии на них экологических и фитоценологических стрессов, д) объективно определить принадлежность видов к тем или иным стратегиям жизни, е) решить задачи таксономии и микроэволюции, ж) осуществить компьютерное моделирование структуры особей растений.

Оценка морфометрических параметров растения ведётся по выборкам репрезентативного объёма. Обычно объём составляет 30 особей (побегов, цветков, листьев и т.п.).

При морфометрических измерениях следует учитывать особенности ветвления побегов. На ранних этапах роста у растения обычно имеется один побег, вырастающий из конуса нарастания зародыша семени или почки (перезимовавшей или спящей). По классификации И.Г. Серебрякова (1962), этот побег - первого порядка, если он образуется из верхушечной почки проросшего семени, а пазушные почки на нем - образования второго порядка.

Побег, вырастающий из зимующей или спящей почки многолетнего растения, можно считать аналогом побега первого порядка и соответственно рассматривать его побеги ветвления. По типу органогенеза терминального конуса нарастания растения делят на две группы: 1) терминальный конус нарастания "закрытый" - дифференцируется на элементы соцветия (или образует одиночный цветок), 2) растения имеют "открытый" конус нарастания верхушечной почки, образующий в течение всего вегетационного периода зачатки листьев, а цветки или соцветия – пазушные образования, сидячие или на облиственных побегах.

У растений первой группы с типично симподиальным ветвлением (виды сем. пасленовых) главный стебель вместе с верхушечным соцветием является репродуктивным побегом первого порядка. Побеги с генеративными органами, вырастающие из пазушных почек, - репродуктивные побеги второго порядка. Специфика их в том, что они расположены в зоне моноподиального нарастания в отличие от побега второго порядка - симподия, продолжающего рост главного стебля. Побеги второго порядка обозначаются номерами узлов, в которых они расположены, начиная от основания главного стебля:  $\Pi_1$ ,  $\Pi_2$ ,  $\Pi_3$  и т.д. Число побегов второго порядка ограничено верхним узлом, после



которого идет главное соцветие. Поэтому, чтобы отличить побег второго порядка - симподий - от побегов того же порядка, расположенных в зоне моноподиального нарастания, у первого к номеру узла добавляется буква "с" ( $\Pi_{3c}$ ). Побег следующего, третьего порядка нумеруются аналогично и обозначаются номером узла побега второго порядка и своим порядковым номером ( $\Pi_1\Pi_1$ ;  $\Pi_1\Pi_2$ ;  $\Pi_1\Pi_3$ ); то же относится к побегам четвертого порядка, если они имеются на растении ( $\Pi_1\Pi_1\Pi_1$ ;  $\Pi_1\Pi_2\Pi_1$  и т.д.).

У растений второй группы, имеющих моноподиальное ветвление, репродуктивные побеги относятся ко второму порядку - они расположены в пазухах на главном стебле. Нумеруются они, начиная от основания главного побега ( $\Pi_1$ ,  $\Pi_2$  и т.д.). Если на этих побегах имеется следующий порядок, то для определения их местоположения нужно указывать номер узла на главном стебле и свой номер, считая от основания побега второго порядка ( $\Pi_1\Pi_1$ ;  $\Pi_1\Pi_2$  и т.д.). По мере роста растения число узлов на главном стебле увеличивается, и в морфологический анализ включаются вновь образующиеся побеги.

Имеются виды, у которых из верхушечной почки образуется соцветие при моноподиальном ветвлении, например: виды сем. капустных (крестоцветных), маревых, астровых (сложноцветных) и др. У таких видов генеративные побеги чаще всего образуются в верхней зоне главного стебля, примыкающей к главному соцветию. В средней части главного побега почки менее развиты (чуть трогаются в рост), а в нижней остаются, как правило, спящими. Поэтому у таких растений удобнее обозначать генеративные побеги второго порядка, считая не от основания побега, а сверху - от верхушечного соцветия. Здесь, как и у растений первой группы, для побегов третьего порядка будет двойная ( $\Pi_1\Pi_1$ ;  $\Pi_2\Pi_1$  и т.д.), а для побегов четвертого порядка - тройная ( $\Pi_1\Pi_1\Pi_1$ ;  $\Pi_2\Pi_1\Pi_1$ ) нумерация.

### ***2.1.1. Порядок проведения анализа отдельного генеративного побега***

На модельных растениях измеряют побеги-аналоги, т.е. побеги одного порядка ветвления и одинакового местоположения, из них составляется вариационный ряд. Репродуктивный побег измеряют от основания до соцветия или цветка и на нем подсчитывают число

листовых узлов, измеряют длину и диаметр стебля во втором или третьем междоузлии, параметры листа, цветка и т.п. Эти показатели записываются в таблицу и служат для дальнейшей статистической обработки. Бланк для измерений изготавливается заранее (см. табл. 11). Если для характеристики побега нужна его облиственность, листья снимают с побега (у охраняемых растений – не снимая с побега) и площадь их измеряют любым доступным способом. Наиболее удобным является фотоэлектрический планиметр, на котором можно измерить площадь отдельного листа, всех листьев одного растения и суммарную площадь – со всех растений пробы. При наличии цифрового фотоаппарата целесообразно в полевых условиях фотографировать каждый объект с масштабной линейкой, а затем в лабораторных условиях на компьютере с использованием соответствующих программных продуктов (ImageJ149-jre6-64, Gimp-2.8.14, Corel и др.) снять соответствующие параметры.

По всем показателям, снятым с побега, вычисляется средняя арифметическая ( $\bar{x}$ ), ее ошибка ( $\pm \bar{S}_x$ ) и относительная ошибка ( $\bar{S}_x \%$ ), которая характеризует репрезентативность выборки (точность опыта) и не должна быть более 3-5%. У растений первой группы облиственную часть побега четко делят на вегетативную и флоральную зоны, поэтому у них составляют ряды из побегов первого порядка (главных), побегов второго и т.д. порядков, ограниченных верхушечным соцветием. У растений второй группы, не имеющих терминального соцветия, характеризуют вегетативные органы главного стебля – от основания до верхушечной почки (длина стебля, число листовых узлов и площадь листьев) – и аналогично побеги второго порядка.

Для характеристики соцветия берут два показателя: число элементов соцветия и их этапы органогенеза. Полученные данные записывают в таблицу и для них вычисляют средние величины со своими ошибками. Для обобщенной характеристики соцветия, учитывающей все его элементы и степень их развития, определяют структуру соцветия по числу его элементов на разных этапах органогенеза, выраженному в процентах (доля признака в %). Этот показатель характеризует качественную изменчивость признаков. Для оценки соцветия в целом вычисляются показатель изменчивости и коэффициент вариации степени развития элементов (Доспехов, 1985).

Таблица 11

## Образец бланка для морфометрической характеристики растений

Название вида растений \_\_\_\_\_

Дата \_\_\_\_\_ № ценопопуляции \_\_\_\_\_

Географическое положение \_\_\_\_\_

Исследователь \_\_\_\_\_

Морфометрические параметры		№№ особей					
		1	2	3	...	29	30
Высота растения, см							
Диаметр растения, см							
Количество побегов, шт.	генеративных						
	вегетативных						
Длина побега, см	генеративного						
	вегетативного						
Количество узлов на побеге, шт.	генеративном						
	вегетативном						
Длина стебля во 2-ом междоузлии, см							
Диаметр стебля во 2-ом междоузлии, мм							
Лист	длина, см						
	ширина, см						
	толщина, мкр						
	площадь, см <sup>2</sup>						
Листочек	длина, см						
	ширина, см						
	толщина, мкр						
	площадь, см <sup>2</sup>						
Число элементов соцветия, шт.	бутоны						
	цветки						
	плоды						
Цветок	высота, см						
	диаметр, см						
	число лепестков, шт.						
Лепесток	длина, см (мм)						
	ширина, мм						
Плод	длина, см (мм)						
	ширина, см (мм)						

На основании полученных данных по ряду проб, характеризующих определенный этап морфогенеза, можно составить графики роста отдельных частей побега и показать динамическую структуру его генеративных органов.

### ***2.1.2. Морфометрическая характеристика вегетативных органов***

Генеративные побеги имеются не на всех стадиях развития растения. К тому же и при наличии генеративных побегов все или некоторые экземпляры исследуемой популяции или образца могут иметь только вегетативные побеги. Их количество и размеры важны для характеристики растения, степени его развития. Поэтому необходимо проводить измерения и вегетативных органов. Разнообразие элементов учета может колебаться в зависимости от особенностей строения растения и от задач исследования. Важно только, чтобы на каждом экземпляре измерялись одинаковые элементы.

Вегетативные побеги бывают укороченными и удлиненными. Укороченные побеги чаще всего представляют собой розетку листьев. Измеряют диаметр розетки и параметры, к примеру, наиболее крупного листа (длину, ширину, площадь), а также – количество листьев в розетке. При наличии нескольких розеток у одного экземпляра учитывают их количество, а измерения можно проводить, например, на самой крупной из них.

Если у растения развиваются удлиненные побеги, подсчитывают их количество у каждого экземпляра, длину, например, самого крупного побега, количество узлов на нем, длину и диаметр стебля во втором (третьем) междоузлии, параметры листа, отходящего от второго (третьего) узла. Если растение имеет сложные листья, то измеряют еще и параметры листочков.

Данные измерений заносят в таблицу (табл. 11).

## ***3. Анализ изменчивости и пластичности морфологических параметров***

### ***3.1. Изменчивость и пластичность особей растений***

В пределах каждой ценопопуляции растений наблюдается несовпадение размеров особей и их отдельных структурных частей. Еще более заметны они при сопоставлении растений из разных ценопопуляций. Иерархия размерности особей складывается на ранних стадиях онтогенеза, она также зависит от разнокачественности семян (Злобин, 1989). При изучении разноразмерности особей растений и их структурных частей различают два аспекта:

- 1) изменчивость – варьирование значений параметра вокруг его среднего значения;
- 2) пластичность – варьирование средних значений параметров при смене условий обитания.

**Изменчивость** - варьирование признаков в пределах одной особи или от особи к особи. Обычно выделяют внутрипопуляционную изменчивость и общую (межпопуляционную) изменчивость.

При изучении изменчивости необходимо учитывать, что некоторые параметры морфогенеза выражаются для данной конкретной особи единственным значением, например, высотой растения, его фитомассой и т.п. Такие параметры меняются только от особи к особи, и в отношении их наблюдается популяционная изменчивость. Для других показателей (например, размеры листовой пластинки, масса плода и др.) изменчивость выявляется уже в пределах одной особи.

В зависимости от факторов, вызывающих изменчивость, и форм ее проявления выделяют:

**географическую изменчивость**, обусловленную общими географическими факторами,

**экологическую** – вызванную действием на растения тех или иных экологических факторов,

**темпоральную** – связанную с погодными колебаниями метеорологических условий.

Разные морфологические признаки отличаются размахом варьирования. У всех растений сильно варьирует фитомасса, число метамеров и многие размерные показатели. Счетные признаки более изменчивы, чем мерные (длина, масса). Варьируют и анатомические признаки растений. Признаки репродуктивной сферы менее изменчивы. В наибольшей степени стабилизированы элементы цветка, ответственные за его функционирование, вес и размер семян.

Существует ряд мер по оценке изменчивости. Наиболее универсально применяемой мерой изменчивости служит **коэффициент вариации**:

$$Cv = \frac{\pm \sigma}{x} \times 100\% ,$$

где  $\sigma$  – среднее квадратическое отклонение,  $x$  – среднее арифметическое.

Коэффициент вариации – это относительный показатель, который удобен тем, что позволяет сравнивать между собой варьирование различных показателей, имеющих неодинаковую размерность (Злобин, 1989).

При оценке амплитуды изменчивости рекомендуется использовать эмпирическую шкалу уровней изменчивости морфометрических параметров, разработанной С.А. Мамаевым (1972) для древесных, но используемой и для травянистых растений. В этой шкале выделены следующие уровни изменчивости:

- очень низкий – меньше 7 %;
- низкий – 8–12 %;
- средний – 13–20 %;
- повышенный – 21–30 %;
- высокий – 31–40 %;
- очень высокий – больше 40 %.

Амплитуда общей изменчивости включает в себя, с точки зрения их происхождения, две основные компоненты – неопределенную и определенную. Неопределенная изменчивость отражает общую несбалансированность того или иного параметра. Определенная изменчивость в пределах данной популяции связана с ее генотипической неоднородностью или воздействием на особи экологических и ценологических факторов, варьирующих от места к месту.

**Пластичность**, в отличие от изменчивости, проявляется в обратимых изменениях структур и функций организма при воздействии новых условий обитания. Обычно пластичность адаптивна и обеспечивает сохранение жизнеспособности особей.

Одним из методов обнаружения пластичности является сопоставление средних арифметических значений для растений разных популяций, разных условий обитания.

Амплитуду пластичности особей можно выявить, распределив значение морфологических параметров вдоль экологических и ценоотических градиентов. Анализ ведется по модели, предложенной Ю.А. Злобиным (1989) (рис. 2).

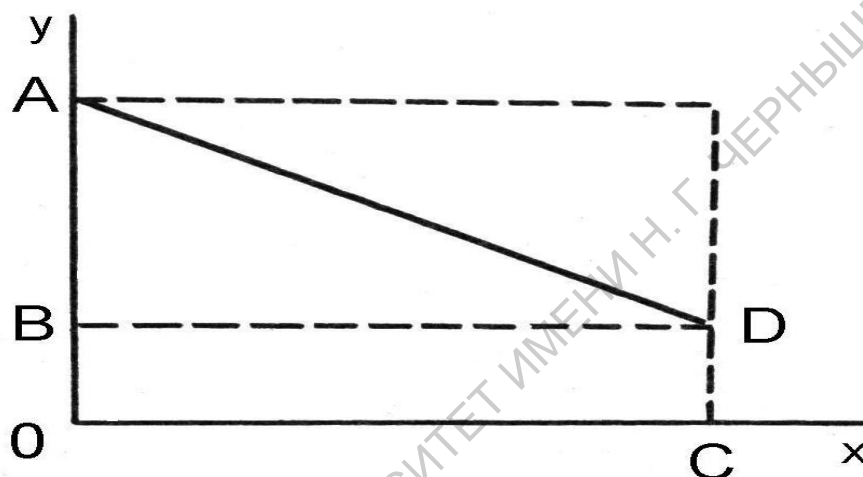


Рис. 2. Регрессия морфологических признаков по ценоклину или экоклину (см. пояснения в тексте)

Ось  $OX$  используется для ординации растительных сообществ (в виде ценоклина), или ординации экологических факторов (в виде экоклина). На оси  $OY$  представляются значения морфометрических параметров. Положение точки  $A$  отражает значение морфологического параметра при полном исключении действия фактора (если он неблагоприятен) или при уровне его оптимума (если он благоприятен). Интервал  $AB$  определяет амплитуду фитоценотической или экологической пластичности параметра.

В зоне действия фактора могут быть раскрыты закономерности изменения морфологического статуса растения. Для этого может использоваться **индекс фитоценотической пластичности ( $I_p$ )** в виде отношения амплитуды пластичности к коэффициенту свободного развития (Злобин и др., 2013):

$$I_p = (A - B) / A.$$

Знаком  $(-)$  отмечаются индексы фитоценотической пластичности, соответствующие негативным эффектам действия фитоценотической обстановки на морфологический параметр, а знаком  $(+)$  – позитивным.

Значения индекса фитоценотической пластичности лежат в интервале от 0 до 1. Чем ближе к единице значение индекса (по модулю), тем выше уровень пластичности рассматриваемого признака.

Уровень пластичности каждого отдельного признака обусловлен также видовыми особенностями растения, что может рассматриваться как видоспецифичность пластичности у растений.

В качестве примера на рис. 3 представлен профиль фитоценотической пластичности морфометрических параметров *Hypericum perforatum*. Из результата анализа индексов фитоценотической пластичности видно, что наиболее отзывчивыми на изменение условий местообитания являются такие признаки, как число боковых побегов 2-го порядка, фитомасса и число цветков и плодов ( $I_p = 0.81–0.98$ ). Средний уровень пластичности ( $I_p = 0.51–0.60$ ) имеют ширина и длина листа, число генеративных боковых побегов 1-го порядка, длина междоузлия, высота и диаметр побега. Наименее пластичный признак – общее число боковых побегов 1-го порядка ( $I_p = 0.45$ ).

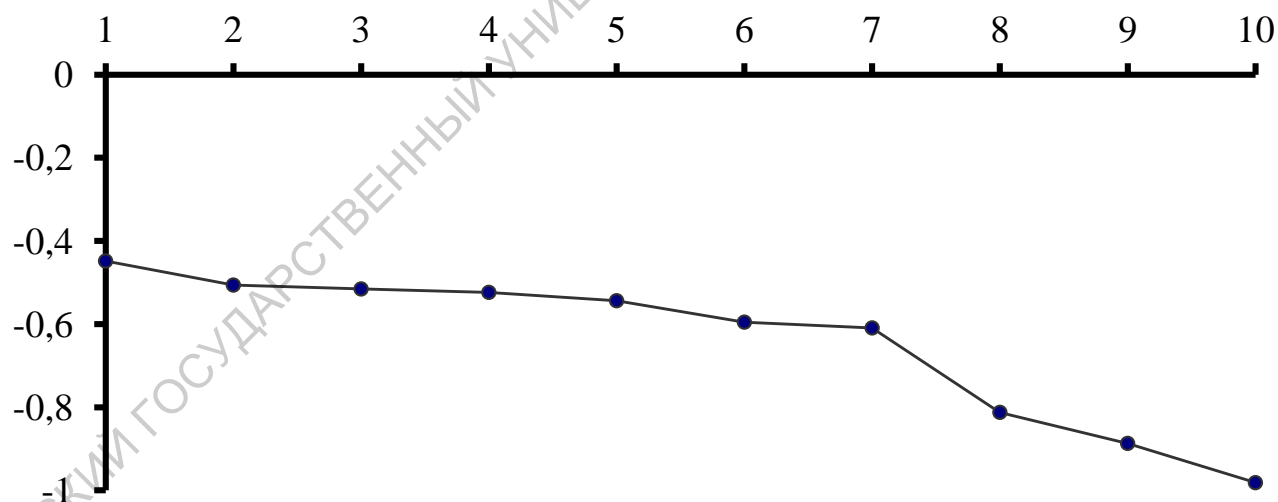


Рис. 3. Фитоценотическая пластичность морфометрических параметров *Hypericum perforatum* (По: Пархоменко, Кашин, 2011).

По оси OY – коэффициент пластичности ( $I_p$ ), по оси OX – параметры: 1 – число боковых побегов 1-го порядка, 2 – диаметр стебля, 3 – высота побега, 4 – длина междоузлия, 5 – длина листа, 6 – число генеративных боковых побегов 1-го порядка, 7 – ширина листа, 8 – число цветков и плодов, 9 – фитомасса побега, 10 – число боковых побегов 2-го порядка.

Изменчивость и пластичность морфогенетических параметров – два разных их свойства. Параметры с общей высокой изменчивостью могут быть малопластичными по экологическим градиентам, а



параметры со сравнительно низкой изменчивостью – по градиентам существенно менять свое значение, как это видно на примере *Tulipa gesneriana* (табл. 12). Другая картина имеет место у зверобоя продырявленного (табл. 13). У данного вида пластичность и изменчивость практически прямопропорциональны, т.е. наибольшему значению коэффициента вариации соответствует наибольшее значение коэффициента пластичности, и наоборот. Следовательно, зависимость изменчивости и пластичности видоспецифична.

Таблица 12  
Пластичность и изменчивость морфологических параметров особей *Tulipa gesneriana* (По: Кашин и др., 2014)

Параметры	Коэффициент вариации ( $C_v$ ), %	Индекс фитоценотической пластичности ( $I_p$ )
Длина листочка околоцветника	19.13	0.33
Высота бокала	19.41	0.28
Толщина листовой пластинки	20.86	0.25
Высота растения	21.66	0.43
Длина побега	22.79	0.44
Длина первого междоузлия	23.90	0.30
Ширина листочка околоцветника	25.12	0.47
Длина второго листа	25.17	0.31
Ширина нижнего листа	25.85	0.45
Ширина второго листа	30.60	0.51
Длина нижнего листа	45.96	0.38
Диаметр куста	45.99	0.50
Диаметр первого междоузлия	52.05	0.30

Пластичность параметров морфогенеза приводит к различиям в облике растений, вырастающих в условиях эколого-ценотического оптимума или минимума. Особи одного и того же вида растений, взятые из разных популяций, оказываются существенно отличающимися по общему габитусу и морфоструктуре. Так, например, у зверобоя продырявленного сдвиг фитоценотических условий от оптимума (который соответствовал группе растений свободного развития – на залежи) к фитоценотическому минимуму (он был обнаружен на остепненном меловом склоне) сопровождался резкими изменениями

морфологической структуры особей. При оптимальных условиях растения зверобоя имели примерно в 15-20 раз большую фитомассу, в 30-40 раз больше цветков и плодов, а число боковых побегов второго порядка в 300-400 раз превышало их количество, наблюдаемое при фитоценоотическом минимуме (Пархоменко, Кашин, 2011).

Таблица 13

Пластичность и изменчивость элементов морфоструктуры *Hypericum perforatum*, проявляющиеся при смене фитоценоотической обстановки (По: Пархоменко, Кашин, 2011)

Параметры	Коэффициент вариации ( $C_v$ ), %	Индекс фитоценоотической пластичности ( $I_p$ )
Высота побега	21,87	-0,51
Число боковых побегов 1-го порядка	23,31	-0,45
Длина нижнего листа флоральной зоны побега	25,04	-0,54
Диаметр 3-го удлиненного междоузлия префлоральной зоны побега	25,38	-0,51
Длина 3-го удлиненного междоузлия префлоральной части побега	33,50	-0,52
Число паракладиев 1-го порядка с цветками;	35,07	-0,59
Ширина нижнего листа флоральной зоны побега	36,44	-0,61
Число цветков и плодов на побеге	62,67	-0,81
Фитомасса побега	74,68	-0,89
Число боковых побегов 2-го порядка	81,70	-0,98

Для исследования межпопуляционной изменчивости морфометрических параметров и их пластичности в каждой ценопопуляции у 30 случайно выбранных особей одного онтогенетического состояния проводят измерение ряда морфометрических параметров (высота и диаметр растения; количество листьев; длина, ширина, толщина листовой пластинки; количество цветков; высота и диаметр цветка и др.). У редких и охраняемых видов измерение параметров проводят у живых растений без их уничтожения (Правила..., 1981). Для каждого параметра определяется среднее арифметическое ( $\bar{x}$ ), ошибка среднего арифметического ( $S_{\bar{x}}$ ), среднее квадратичное отклонение ( $\delta$ ), лимиты (максимум и минимум), коэффициент вариации ( $C_v$ , %) (Гланц., 1999). Статистическую

обработку удобно проводить с использованием программ Microsoft Office Excel, STATISTICA 6.0.

### ***3.2. Морфологическая целостность (корреляционный анализ)***

Растительный организм – целостная биологическая система, обладающая механизмами, которые обеспечивают интеграцию ростовых процессов. Это выражается в скоррелированности структур особей растений (Злобин, 1989).

В качестве меры взаимообусловленности признаков чаще всего используют обычный парный коэффициент корреляции Пирсона (если зависимость линейна) или непараметрический коэффициент корреляции Спирмена (если зависимость не линейна). Коэффициент корреляции удобен своей четкой амплитудой изменения от -1 до +1. Отрицательная корреляция показывает, что увеличение одной переменной связано с уменьшением другой переменной. Положительная корреляция, напротив, означает, что увеличение одной переменной связано с увеличением другой переменной. При этом, чем больше модульное значение коэффициентов, тем существеннее прямая или обратная зависимость. Близкие к нулю и нулевые значения свидетельствуют об отсутствии связей. Перед началом корреляционного анализа сначала устанавливается линейность зависимости. При построении корреляционных матриц обязательно учитывается уровень значимости ( $p$ ). Уровень значимости более 0.05 считается очень низким, и при таком уровне корреляция считается недостоверной. Коэффициенты корреляции для удобства интерпретации силы связей обычно разделяют на следующие группы:

- 1)  $|r| \geq 0.80$  – очень сильная связь;
- 2)  $0.80 > |r| \geq 0.70$  – сильная связь;
- 3)  $0.70 > |r| \geq 0.60$  – умеренная связь;
- 4)  $0.60 > |r| \geq 0.30$  – слабая связь.

Особое внимание следует обратить на то, что матрицы корреляций – это многомерные объекты. Их сравнение не следует сводить к рассмотрению варьирования отдельных коэффициентов, так как составляющие матрицу коэффициенты корреляции не являются независимыми величинами и изменения одной из связей отражается на других. В то же время для исследования важно не просто формальное

установление степени различия между корреляционными матрицами, а и выяснение, за счет каких именно изменений в системе связей оно возникает. Интерпретация получаемых результатов становится еще более содержательной, если степень различия корреляций определенного признака сопоставить с изменениями его средних значений и размаха варьирования в соответствующих выборках.

Н.С. Ростовской (2002) было предложено при сравнении матриц корреляции применять отдельную оценку различий по уровню и структуре связей. Для оценки *среднего уровня связей* используется **коэффициент детерминации** (квадрат коэффициента корреляции —  $r^2$ , усредненный по всей матрице ( $R^2_m$ ) или по отдельным признакам ( $R^2_{ch}$ )). Показателем *сходства матриц по структуре* является **коэффициент корреляции между z-преобразованными матрицами** ( $r_z$ ;  $z$  — преобразование Р. Фишера).

Для вычисления корреляций между матрицами каждая из сравниваемых матриц (без диагональных элементов) после  $z$ -преобразования перестраивается таким образом, что становится вектором. Набор из  $m$  таких векторов (где  $m$  — число сравниваемых матриц) образует массив исходных данных. В нем каждая матрица представлена как признак, а отдельные коэффициенты этой матрицы — как значения этого признака.

Оба показателя ( $R^2$ ,  $r_z$ ) могут быть вычислены как для *полной матрицы*, так и для *отдельных признаков* соответственно по столбцам матриц. Эти величины можно легко получить, используя стандартные программы — Statistica, Excel.

Интерпретация выявляемых различий между матрицами входит в число трудных задач, особенно в тех случаях, когда сравнивается много матриц высокого порядка (по большому числу признаков). На этом этапе анализа полезны различные графические методы изображения структуры связей в сравниваемых матрицах, например сечения корреляционного цилиндра, или «корреляционные кольца» (рис. 4). Для увеличения наглядности связи разного уровня изображаются линиями различной толщины, а отрицательные корреляции соответствующими пунктирными линиями. Рассмотрение ординации таких изображений матриц позволяет выявить направления изменений корреляционных связей.

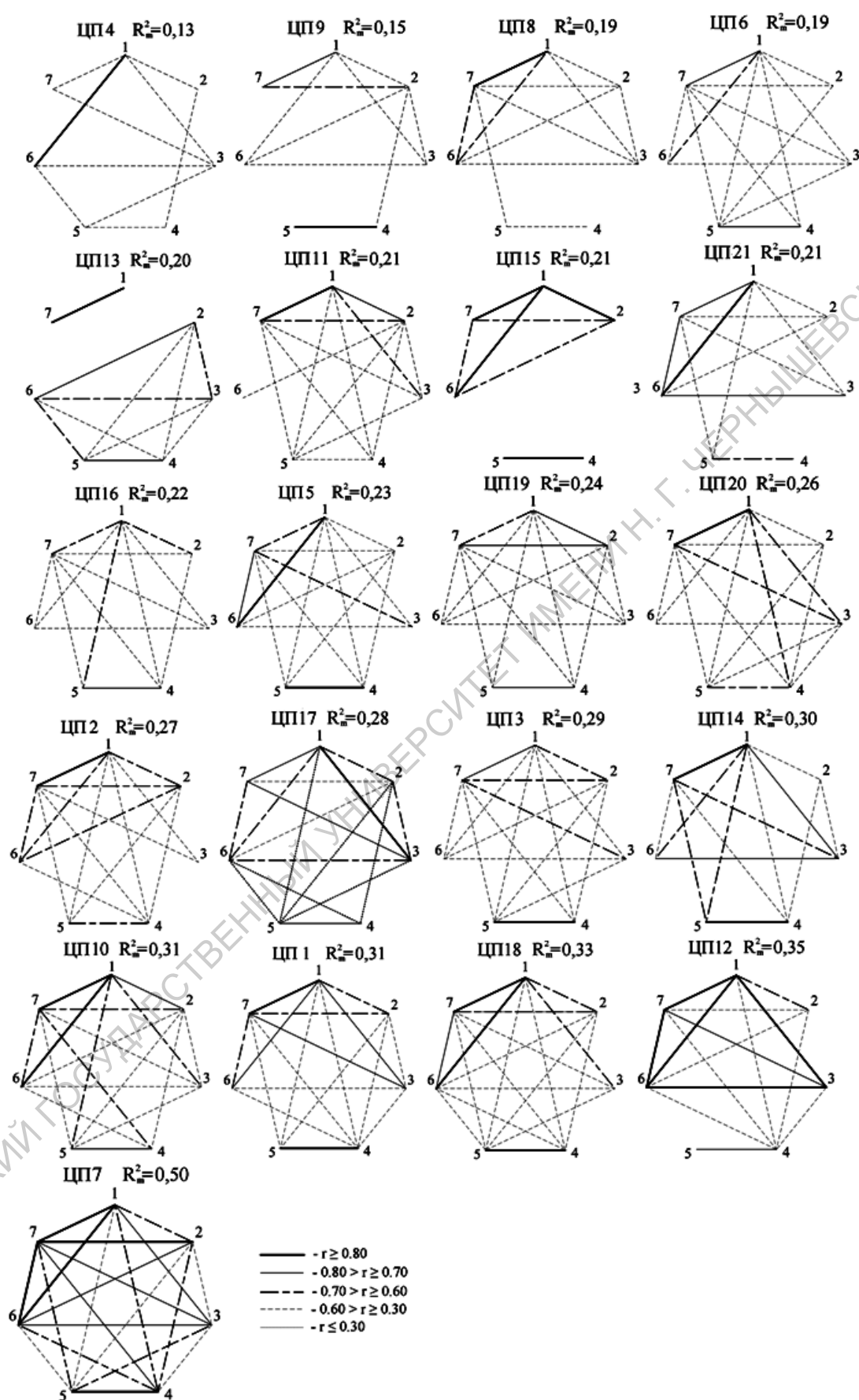


Рис. 4. Корреляционные связи морфометрических признаков *Hypericum perforatum* в исследованных ценопопуляциях. 1 – фитомасса побега, 2 – высота побега, 3 – число боковых побегов 2-го порядка, 4 – ширина листа, 5 – длина листа, 6 – число цветков и плодов, 7 – диаметр стебля (По: Пархоменко, Кашин, 2011)

Еще один наглядный метод – построение графа корреляций (рис. 5), но он неудобен для ряда матриц. Простейший вид «развертки» — максимальный корреляционный путь, однако, этот метод допускает некоторую случайность в последовательности соединения признаков. Если продолжить построение, используя не только максимальные, но и близкие к ним значения коэффициентов корреляции, мы получим дополненный граф корреляций, лучше отражающий структуру связей.

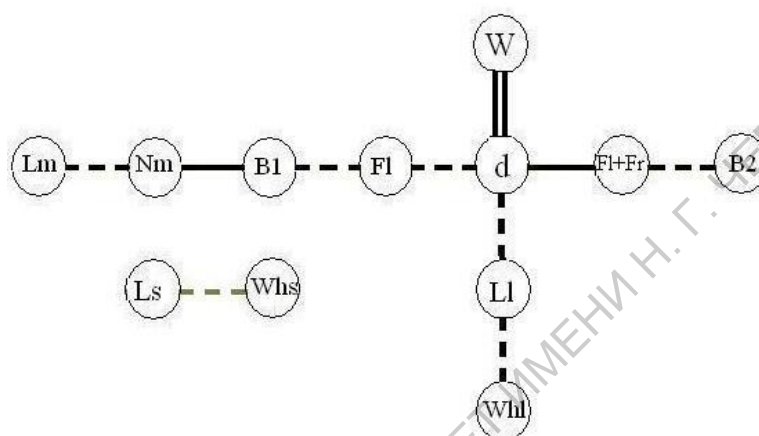


Рис. 5 – Корреляционные связи морфометрических параметров особей. Кругами обозначены морфометрические параметры, а линиями – сопряженные связи:  $\equiv$  – значительные, весьма прочные связи ( $r \geq 0,80$ ),  $=$  – прочные связи ( $0,80 > r \geq 0,70$ );  $-$  – умеренные связи ( $0,70 > r \geq 0,60$ );  $---$  – слабые связи ( $r < 0,6$ ) (По: Пархоменко, Кашин, 2011)

Установлено, что значительную роль в проявлении взаимосвязей между исследуемыми признаками играет размах их варьирования. Поэтому для выявления различий рекомендуется сопоставлять детерминированность ( $R^2$ ) и относительную изменчивость ( $Cv$ ) а) разных признаков; б) одних и тех же признаков в разных выборках (вариантах, условиях).

Принципиальной особенностью растений как объектов анализа является возможность оценки их состояния большим набором параметров, число которых неограниченно велико. Такая оценка ведет к тому, что при числе учитываемых признаков более 5-6 (что дает корреляционную матрицу с 25 - 36 значениями) визуальный анализ системы корреляционных коэффициентов оказывается непродуктивным, неизбежно вносит элементы субъективизма, а при числе параметров более 10 он вообще невозможен. Поэтому необходимо проводить работу по корректировке признакового

пространства, т. е. оценку первоначального набора исследованных признаков и исключение из анализа некоторых «избыточных» и «второстепенных» признаков. Избыточными считаются группы сильно взаимосвязанных показателей, из которых для анализа вполне достаточно оставить только часть. Второстепенными являются малоинформативные (для целей исследования) показатели, обычно относительно независимые или слабо связанные одновременно с несколькими плеядами (факторами).

При сопоставлении изменений средних значений комплекса признаков и корреляций между ними в большинстве случаев удастся обнаружить определенную связь между силой действия фактора и выявляемыми изменениями корреляционных матриц. Если наблюдения (или эксперимент) проведены в градиенте условий, то разным градациям фактора соответствуют последовательные изменения системы взаимосвязей и степень различий между корреляционными матрицами нарастает с увеличением силы внешних воздействий. Разные периоды онтогенеза также характеризуются определенными изменениями силы и структуры связей между исследованными признаками.

Н.С. Ростовской (2002) показано, что существуют определенные закономерности варьирования морфологических признаков в зависимости от условий окружающей среды. Это позволяет использовать их в качестве системных индикаторов, объединяя в группы по особенностям общей и согласованной изменчивости. Выделяется четыре группы системных признаков-индикаторов:

Группа 1. Эколого-биологические системные индикаторы – признаки, отражающие согласованную изменчивость особей в неоднородной среде (сильно изменчивы и сильно детерминированы).

Группа 2. Биологические индикаторы – признаки, изменения которых являются ключевыми для организма в целом или отдельного органа (слабо изменчивы и сильно детерминированы).

Группа 3. Генотипические (таксономические) индикаторы – признаки, обладающие повышенной автономностью в развитии (слабо изменчивы и слабо детерминированы).

Группа 4. Экологические индикаторы – признаки, изменчивость которых определяется преимущественно влиянием внешних факторов (сильно изменчивы и слабо детерминированы). К этой группе

относятся показатели развития «избыточных» структур, например степень ветвистости побега, интенсивность кущения у злаков. Изменения таких признаков могут служить чувствительным индикатором даже относительно слабых внешних воздействий. В некоторых случаях IV группу образуют признаки, измерение которых не очень четко определено, или характеристики таких частей, органов, которые отличаются плохой сохранностью в измеряемом материале: размеры листьев на побеге в конце вегетационного сезона. В эту же группу попадают признаки, по которым существует внутрипопуляционный полиморфизм (окраска каймы листочков обертки, а также антоциановая окраска и опушенность побега у *Leucanthemum vulgare*).

Так, по результатам исследования структуры изменчивости морфологических признаков (рис. 6) тюльпана Геснера, к группе экологических системных индикаторов отнесен диаметр куста, как признак в большей степени зависящий от условий внешней среды и слабо связанный с изменениями других признаков особи. К эколого-биологическим системным индикаторам, изменчивость которых зависит от внешних факторов и, определяя корреляционную структуру особи, влечет за собой согласованные изменения всей структуры связей морфологической системы растения, отнесены диаметр междоузлия и длина нижнего листа. К группе генотипических (таксономических) системных индикаторов отнесены толщина листовой пластинки и длина междоузлия. Все остальные параметры отнесены к группе биологических системных индикаторов, которые в меньшей степени зависят от условий среды, но обладают общей согласованной изменчивостью, являясь ключевыми для всей морфологической структуры особи.

#### **4. Анализ структуры ценопопуляций**

##### **4.1. Пространственная структура ценопопуляций**

При первичном изучении ценопопуляции необходимо указать её площадь. Затем определяют численность (абсолютное число особей) и плотность (число особей на единицу площади).



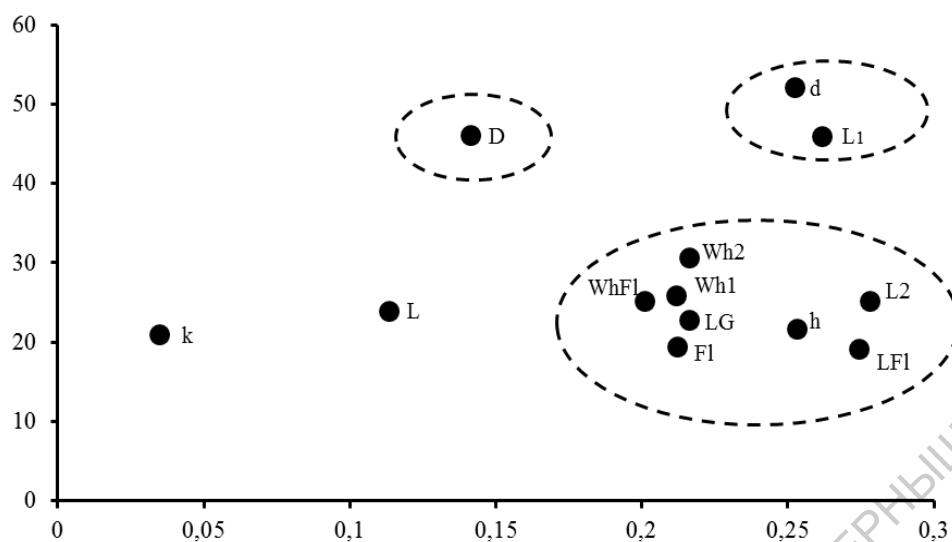


Рис. 6. Структура изменчивости морфологических признаков *Tulipa gesneriana* в 2014г. По оси ординат – коэффициент вариации (V, %), по оси абсцисс – квадрат коэффициента корреляции  $r^2$ , усредненный по отдельным признакам ( $R^2_{ch}$ ). h – высота растения; D – диаметр куста; L<sub>1</sub> – длина нижнего листа; Wh<sub>1</sub> – ширина нижнего листа; L<sub>2</sub> – длина второго листа; Wh<sub>2</sub> – ширина второго листа; L – длина междоузлия; d – диаметр междоузлия; F<sub>1</sub> – высота бокала; L<sub>F1</sub> – длина листочка околоцветника; Wh<sub>F1</sub> – ширина листочка околоцветника; L<sub>G</sub> – длина генеративного побега; k – толщина листовой пластинки (По: Кашин и др., 2014).

Численность особей в ценопопуляции – это их общее количество в локальной ценопопуляции. Численность можно определить прямым пересчётом всех особей данной популяции, а можно прибегнуть к учёту особей на пробных площадках. В таком случае говорят о средней численности особей, указывают ошибку средней и уровень достоверности оценки. По величине средней численности особей и величине общей площади, занимаемой ценопопуляцией, можно определить как общую численность, так и среднюю популяционную плотность.

Способы определения площади зависят от характера произрастания вида. В том случае, когда поросль более или менее плотная и её границы хорошо выражены, её очертания приравнивают к какой-либо геометрической фигуре – прямоугольнику, квадрату или кругу и измеряют параметры, необходимые для вычисления площади выбранной фигуры. В случае, когда на однородном участке вид представлен отдельными пятнами, которые составляют менее 50 % от всего участка или растительного сообщества, сначала рассчитывают площадь всего участка вышеуказанным способом, а затем вычисляют процент, занятый пятнами вида. Площадь ценопопуляции так же

определяют с помощью GPS-навигатора с использованием соответствующей опции.

Плотность ценопопуляции определяется количеством особей на единицу площади и вычисляется по формуле:

$$D = N/P,$$

где  $D$  – популяционная плотность;  $N$  – число особей;  $P$  – площадь.

При определении плотности ценопопуляции используют разные подходы: 1) счётными единицами являются особи семенного происхождения – генеты, 2) счётными единицами являются любые самостоятельные по световому и корневому питанию (хотя бы и соединённые между собой) побеги – раметы, 3) при иерархическом способе подсчитывают генеты, а в пределах каждого генета – раметы.

Для оценки плотности ценопопуляции существует несколько независимых методов. Для небольших по площади ценопопуляций это можно сделать прямым пересчётом всех особей в пределах популяционного поля (территория, на которой размещены особи ценопопуляции). В случае больших площадей, занятых ценопопуляциями, можно использовать пересчёт особей на пробных площадках. В зависимости от вида и его распределения в пространстве размер пробных площадок может составлять от 25х25 см, 1х1 м до 10х10 м. Количество растений подсчитывается на 10 таких площадках, после чего вычисляется среднее значение и ошибка средней арифметической. В отдельных случаях считают количество особей каждой возрастной группы отдельно. Площадки закладывают случайным образом в границах одного фитоценоза. Если популяция мала, проводят полный учет всех особей. В малочисленных популяциях редких видов растений на особо охраняемых природных территориях картируют положение каждой особи с помощью GPS-навигатора.

В.М. Остапко (2005) предложил оценивать популяции растений на основе соотношения размера популяционного поля и численности особей. Используя такой подход, он выделил три категории популяций:

- 1) плохое состояние популяции - популяционное поле меньше 1 га, а численность особей - менее  $10^3$  шт.;
- 2) удовлетворительное состояние — популяционное поле от 1 до 10 га, а численность особей  $10^3$ — $10^5$  шт.;

3) хорошее состояние популяции - популяционное поле более 3 га, а число особей - не менее  $5 \cdot 10^4$  шт.

Для редких видов растений такие критерии пока не разработаны. По мнению В.Г. Кияк (2011), критерием маленькой популяции является численность взрослых особей меньше 1000 шт. и площадь популяции меньше  $1000 \text{ м}^2$ .

Пространственное размещение особей несёт информацию об экологии видов, характере мозаики микроусловий, способах размножения растений и взаимоотношениях между ними. Различают три основных типа размещения особей внутри популяции: равномерное, случайное и контагиозное (групповое).

Для оценки характера размещения особей в популяции наиболее простым и достаточно точным индексом является индекс Одума (1986). Он основан на использовании распределения Пуассона, в котором среднее арифметическое ( $x_{\text{ср}}$ ) равно дисперсии ( $s^2$ ). Индекс Одума (его называют также коэффициентом агрегации, или коэффициентом дисперсии) записывается как:

$$I_{Od} = \frac{s^2}{x_{\text{ср}}},$$

где  $s^2$  - дисперсия;  $x_{\text{ср}}$  — среднее арифметическое численности особей на учётной площадке.

При  $I_{Od} < 1$  особи распределены в популяции равномерно; если  $I_{Od} > 1$  - контагиозно, при  $I_{Od} = 1$  особи распределены случайным образом. Уровень значимости индекса Одума можно оценить, сравнивая рассчитанное значение  $I_{Od}$  с табличным значением  $F$ -критерия Фишера - Снедекора при числе степеней свободы  $df_1 = df_2 = n - 1$ . Если расчетное значение индекса превышает табличное, то оно статистически достоверно на уровне 95%.

В тех случаях, если  $x_{\text{ср}} > s^2$ , рассчитывается обратная величина  $x_{\text{ср}} / s^2$ , которая затем сравнивается с табличным значением  $F$ -критерия Фишера - Снедекора с числом степеней свободы  $df_1 = df_2 = n - 1$ . Если рассчитанное значение превышает табличное, то распределение носит равномерный характер.

Об обилии особей и характере их размещения в популяции можно получить представление, используя метод измерения расстояний между

растениями, предложенный Г.И. Дохман, А.М. Якшиной, О.В. Шаховой (1954; цитир. по: Воронов, 1973). От одного экземпляра (выбранного случайным образом), который принимается за центр, измеряется расстояние до четырех ближайших экземпляров того же вида. Проводят 100-300 таких измерений в каждой ценопопуляции. Данные промеров, выраженные в сантиметрах, разбивают на классы расстояний (например, 1-9 см, 10-19 см, 20-29 см и т.д.), результаты изображают в виде кривой (рис. 7). При построении кривой по горизонтальной оси наносят классы расстояний, а по вертикальной – число расстояний между экземплярами данного вида, относящихся к тому или иному классу.

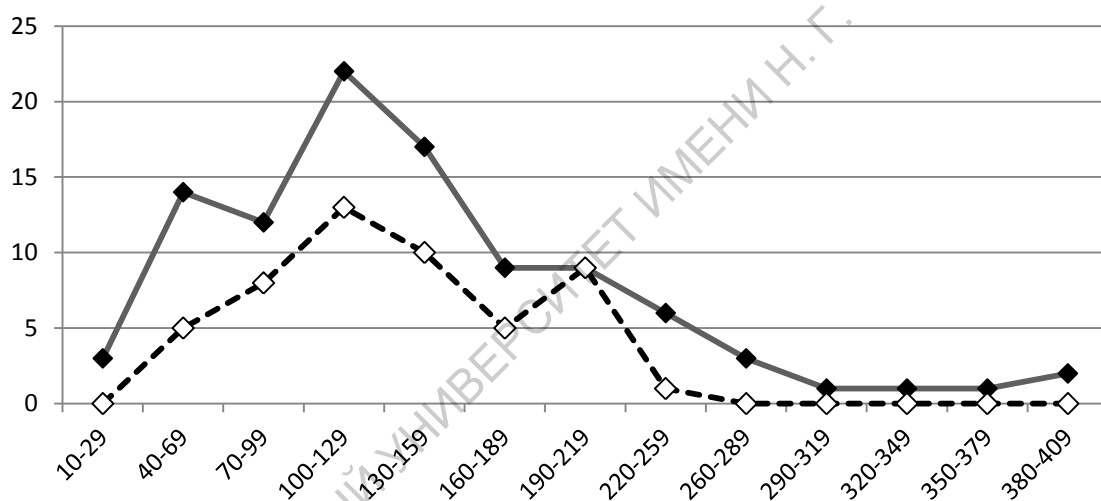


Рис. 7. Характер размещения особей *Delphinium pubiflorum* в ценопопуляции на территории Татищевского района Саратовской области (По: Ермолаева и др. 2015). Сплошная линия - данные за 2014 год, прерывистая линия – данные за 2013 год.

При этом, чем выше обилие вида, тем большее количество его особей находится в первых классах расстояния, чем равномернее вид распределён в фитоценозе, тем меньше растянута его кривая вдоль горизонтальной оси.

Для перевода средних расстояний между растениями вида в количество экземпляров этого вида на единицу площади можно воспользоваться шкалой, составленной Д.Экокс (табл. 14) (Воронов, 1973).

Обычно для целей таких исследований схемы размещения особей изучаемого вида на учетной площадке зарисовывают в масштабе на миллиметровой бумаге, чтобы потом при камеральной обработке была возможность количественно охарактеризовать особенности

пространственной структуры ценопопуляции: среднее расстояние между особями в группе, возрастной состав особей в группах скопления и т.д. На основании этих данных делают вывод о типе пространственной структуры ценопопуляции.

Таблица 14

Соотношение между числом экземпляров и расстоянием между ними

Расстояние, см	Число растений на 1 га	Расстояние, см	Число растений на 1 га
2.5	15 309 485	360.0	738
7.5	1 700 922	450.0	472
11.2	755 965	600.0	266
15.0	425 230	900.0	118
22.5	188 979	1500.0	42
30.0	106 307	2250.0	19
37.5	68 037	3750.0	7
48.0	38 270	6000.0	2
60.0	26 576	9000.0 и более	1 и менее
90.0	11 812	-	-
180.0	2 953	-	-

#### 4.2. Онтогенетическая структура

В рамках эколого-демографического подхода к ценопопуляциям растений наиболее существенной признается возрастная дифференциация особей, так как она лежит в основе исследований структуры и динамики ценопопуляций (способность ее к самоподдержанию и устойчивость). При этом у древесных растений возрастную дифференциацию осуществляют путем определения календарного возраста (отрезка времени с момента возникновения особи до момента исследования), для остальных групп растений – по онтогенетическим или возрастным изменениям (биологическому возрасту). Этот подход основан на том, что в каждый момент времени любой организм характеризуется специфическим набором морфологических, анатомических, физиологических и других признаков, совокупность которых определяет его возрастное состояние. Распределение особей в ценопопуляции по календарному возрасту называется возрастным составом или возрастным спектром популяции, распределение по онтогенетическим состояниям – онтогенетической структурой или онтогенетическим спектром популяций.

Онтогенетическое состояние особи – это определённый этап онтогенеза растения, характеризующийся наличием ряда индикаторных морфологических и биологических признаков, в частности, определённым положением особи в пространстве и особыми взаимоотношениями со средой (Заугольнова, 1976).

#### **4.2.1. Периодизация онтогенеза**

Определение биологического возраста (онтогенетического состояния) становится возможным после достаточно подробного описания полного онтогенеза исследуемого вида. А.А. Уранов (1975) разработал детальную периодизацию онтогенеза, предложенную ранее Т.А. Работновым (1950). Согласно данной периодизации выделяют четыре периода онтогенеза и 11 онтогенетических возрастных состояний растения: латентный период (семена), прегенеративный (проростки, ювенильные, имматурные и виргинильные особи), генеративный (молодые, зрелые и старые генеративные растения) и постгенеративный (субсенильные, сенильные и отмирающие особи) (табл. 15).

Онтогенетическое состояние и возраст связаны между собой лишь коррелятивно, поскольку у растений особь, насчитывающая много лет жизни, может находиться в одном из ранних возрастных состояний. В связи с этим Ю.А. Злобин (2009) считает правильным употреблять термин онтогенетический спектр и онтогенетическое состояние, а термины возрастной спектр и возрастное состояние – только в тех случаях, где можно определить возраст растения в числовом выражении.

Биометрические величины позволяют внести еще одну количественную характеристику степени развития особи – возрастность, определяемую как долю энергии, которая освоена особью к середине данного возрастного состояния. Способ вычисления возрастности, применимый фактически для всех биоморф, предложен А.А. Урановым (1975). Величины возрастности, вычисленные им для каждого возрастного состояния, приведены в таблице 15.

Распределение особей в ценопопуляции по календарному возрасту называется возрастным составом, по биологическому возрасту – воз-

Таблица 15

## Возрастные периоды и состояния у семенных растений

Период онтогенеза	Возрастные состояния особей	Индексы	Признаки	Возрастность
1	2	3	4	5
Первичного покоя (латентный)	Покоящиеся семена	se		0.0025
Прегенеративные (виргинильный)	Проростки (всходы)	p	Смешанное питание (за счет веществ семени и ассимиляции первых листьев. Наличие морфологической связи с семенем или с семядолей.	0.0067
	Ювенильные	J	Простота организации. Наличие листьев иной формы и расположения, чем у взрослых растений. Сохранение зародышевых структур (корня, побега). Потеря связи с семенем, отсутствие семядолей.	0.0180
	Имматурные	Im	Развитие листьев и корневой системы полувзрослого типа, начало ветвления, появление плагиотропных побегов, сохранение отдельных элементов первичного побега.	0.0474
	Виргинильные	V	Растения имеют характерные для вида листья, побеги, корневую систему. Генеративные органы отсутствуют.	0.1192
Генеративный	Молодые генеративные	G <sub>1</sub>	Появление генеративных органов. Преобладание процессов новообразования над отмиранием.	0.2700
	Зрелые генеративные	G <sub>2</sub>	Уравновешивание процессов новообразования и отмирания. Максимальный ежегодный прирост биомассы. Максимальная семенная продуктивность.	0.5000
	Старые генеративные	G <sub>3</sub>	Преобладание процессов отмирания над процессами новообразования. Резкое снижение генеративной функции. Ослабление процессов корне- и побегообразования.	0.7310
Постгенеративный (сенильный)	Субсенильные (старые вегетативные)	Ss	Полное отсутствие плодоношения. Возможно наличие абортивных цветков или соцветий. Вторичное появление листьев имматурного типа.	0.8808
	Сенильные	S	Накопление отмерших частей, предельное упрощение жизненной формы. Появление ювенильных черт. Отсутствие почек возобновления.	0.9529
	Полу-трупы	sc		0.9819

растным спектром или спектром возрастных состояний. Он может быть выражен в абсолютных числах или в процентах от общего числа особей и представлен в виде таблиц, гистограмм или графиков.

Для построения возрастного спектра ценопопуляций предварительно выделяются возрастные состояния, проходимые растением в течение его большого жизненного цикла.

#### **4.2.2. Онтогенетический спектр ценопопуляции**

Онтогенетический спектр популяции растений в составе конкретного фитоценоза – это распределение особей по их онтогенетическим состояниям. Он может быть дан в форме таблицы, гистограммы (рис. 8), ломанной или плавной кривой и может быть выражен в абсолютных числах или в процентах от общего числа особей. Он отражает количественные отношения абсолютной численности особей различных возрастных уровней или их процентное участие в сложении популяции.

Возрастные спектры, построенные на основе описанного выше расчленения жизненного цикла растения могут быть весьма разнообразны. Это может зависеть от видовых свойств, местообитания, а так же от момента развития популяции.

**Нормальная ценопопуляция** – это ценопопуляция, не зависящая от заноса зачатков извне, т.е. способная к самоподдержанию семенным или вегетативным путём, либо тем и другим путём вместе (Заугольнова, 1976). Нормальная популяция, содержащая особи всех возрастных состояний является нормальной полночленной. Если в ней отсутствуют особи каких либо возрастных состояний, то такую ценопопуляцию следует считать нормальной неполночленной.

Нормальная ценопопуляция испытывает лишь обратимые циклические изменения численности и возрастного состава и характеризуется относительно постоянным положением максимальных значений в спектре. Нормальная ценопопуляция, достигшая равновесного состояния, называется **дефинитивной**. Ценопопуляции, испытывающие односторонние необратимые изменения возрастного состава, численности, продуктивности, жизненности и др., называются **сукцессионными**.



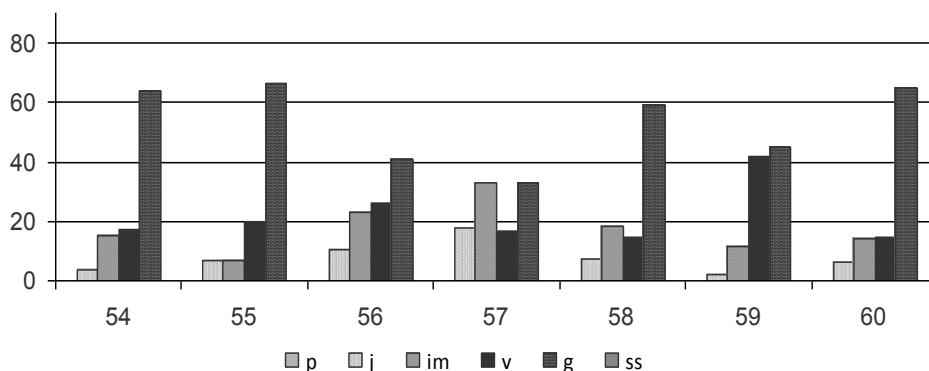


Рис. 8. Онтогенетические спектры ценопопуляций *Bulbocodium versicolor*. По оси абсцисс – номера популяций, по оси ординат – доля особей, %. p – проростки; j – ювенильные; im – имматурные; v – виргинильные; g – генеративные; ss – субсенильные

У нормальных дефинитивных ценопопуляций возможно выделение базового онтогенетического спектра (рис. 9), структура которого в значительной степени определяется биологическими свойствами вида. Сравнивая возрастные спектры ценопопуляций конкретного вида можно установить такой вариант спектра, который наиболее часто встречается у данного вида, в котором сохраняются соотношения во взрослой, наиболее стабильной части ценопопуляции. Такой спектр можно назвать базовым (Заугольнова, 1976). У видов с широкой экологической амплитудой вероятно существует не один, а несколько типов базового спектра. Для определения базового спектра необходимо исследовать не менее 10 ценопопуляций в разных частях ареала и различных местообитаниях. Базовый спектр определяется на основе средней величины для процентного участия каждого возрастного состояния. Имеющиеся возрастные спектры сопоставляют друг с другом по соотношению возрастных групп во взрослой части ценопопуляции и выявляют наиболее часто встречающийся вариант (варианты).

Базовый спектр представляет собой одну из характеристик популяций, отличающуюся некоторой степенью вариабельности. Если средние показатели участия возрастных групп в пределах базового спектра определяются биологическими свойствами вида, то вариации в пределах зоны варьирования связаны с пластичностью реакций вида при воздействии различной экологической и ценотической обстановки.

Поскольку базовый спектр представляет собой некоторую обобщенную характеристику, то каждая конкретная ценопопуляция

будет обладать спектром, несколько отклоняющимся от базового, т.е. для каждого базового спектра вида будет существовать некоторая зона, в пределах которой возможны колебания. Теоретически она должна заключаться в пределах:

$$M \pm 3\delta,$$

где  $M$  – среднее значение относительной численности (в %) каждой возрастной группы,  $\delta$  – среднее квадратичное отклонение.

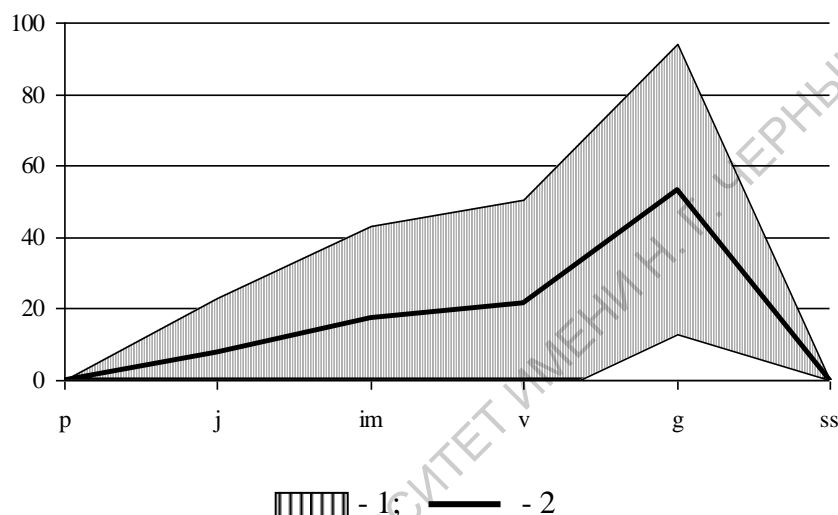


Рис. 9. Базовый онтогенетический спектр *Bulbocodium versicolor*: 1 – зона базового спектра; 2 – базовый спектр. По оси абсцисс – онтогенетические состояния особей, по оси ординат – доля особей отдельных онтогенетических состояний, %. Обозначения те же, что на рис. 8

Типы базовых спектров выделяются по положению абсолютного максимума в спектрах онтогенетических состояний и по характеру кривой, аппроксимирующей спектр. Выделено четыре типа возрастных спектров: левосторонний спектр, абсолютный максимум которого приходится на молодые особи (от ювенильных до молодых генеративных); одновершинный спектр с абсолютным максимумом на средневозрастных генеративных особях (симметричный); правосторонний спектр с абсолютным максимумом на старых генеративных или субсенильных особях; бимодальный спектр (двувершинный), состоящий из двух модальных групп, одна из которых относится к молодой, другая – к старой части ценопопуляции (рис. 10).

Базовые спектры могут характеризоваться как полным набором возрастных состояний (полночленные спектры), так и отсутствием некоторых возрастных групп (спектры облигатно неполночленные). Ценопопуляции разных видов могут развиваться до дефинитивного

состояния при разном сочетании возрастных групп: одни с преобладанием молодых растений, другие - зрелых, третьи – старых.

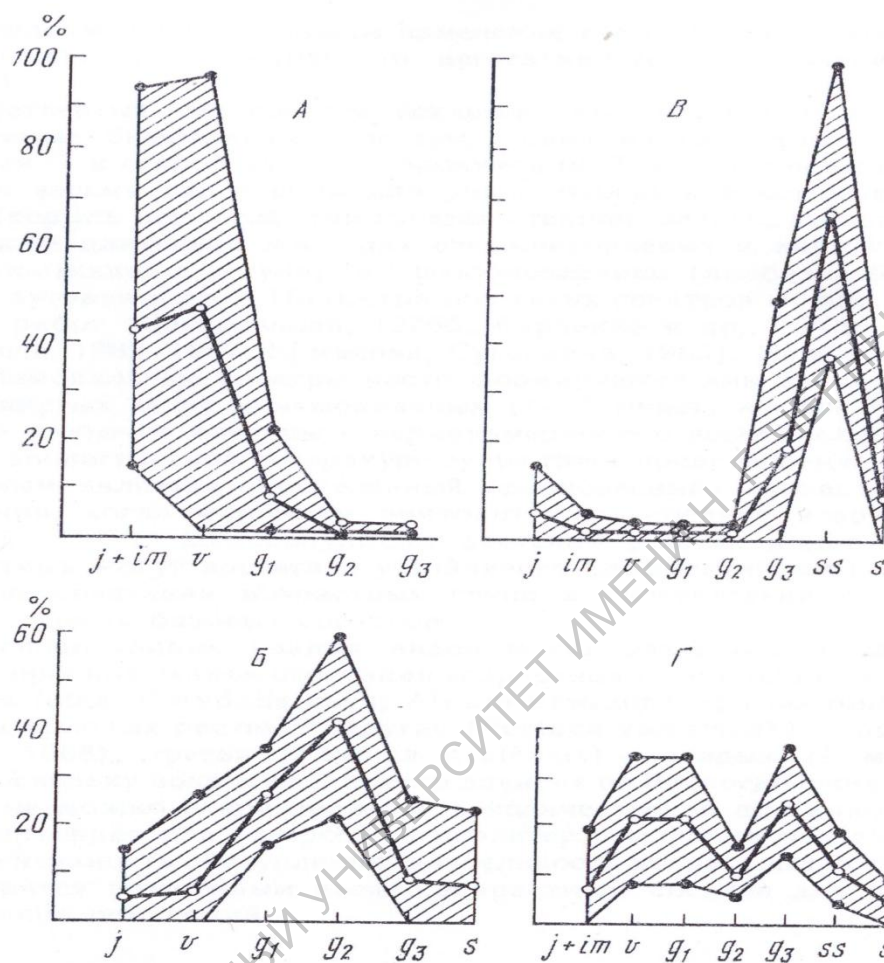


Рис 10. Типы базовых спектров ценопопуляций: А – левосторонний спектр, Б – одновершинный симметричный, В – правосторонний, Г - двухвершинный. Штриховкой показана величина  $\pm 3\sigma$

Базовый спектр считается обобщенной характеристикой динамически равновесного состояния популяции, к которому она стремится после отклонений, вызванных влиянием внешних воздействий. При этом различная степень вариабельности свидетельствует об относительной динамичности или стабильности возрастной структуры популяций.

Важной характеристикой динамичности или стабильности возрастной структуры ценопопуляций является индекс восстановления. Индекс восстановления для исследованных ценопопуляций вычисляют как отношение количества растений прегенеративного периода к количеству растений генеративного периода (Жукова, 1987). Индекс

восстановления вычисляют по формуле:

$$I_1 = \frac{\Sigma j \rightarrow v}{\Sigma g_1 \rightarrow g_3} \times 100 \%,$$

где  $\Sigma j \rightarrow v$  – сумма растений всех возрастных состояний прегенеративного периода,  $\Sigma g_1 \rightarrow g_3$  – сумма растений всех возрастных состояний генеративного периода. К ценопопуляциям, способным к самовозобновлению, относят ценопопуляции, характеризующиеся индексом восстановления больше 1 (Заугольнова и др., 1988). Индекс восстановления определяется по формуле (Заугольнова и др., 1988):

$$I = \Sigma j \rightarrow v / \Sigma g_1 \rightarrow g_3$$

где  $\Sigma j \rightarrow v$  – сумма растений всех возрастных состояний прегенеративного периода,

$\Sigma g_1 \rightarrow g_3$  – сумма растений всех возрастных состояний генеративного периода.

Еще одной важной характеристикой состояния ценопопуляций является коэффициент возрастности. Он вычисляется по формуле:

$$\Delta = \Sigma k_i m_i / \Sigma k_i,$$

где  $k_i$  – численность  $i$ -той возрастной группы,  $m_i$  – возрастность одной особи той же группы. Возрастность одной особи для каждой возрастной группы приведена в таблице 2 (Уранов, 1975).

Коэффициент возрастности показывает степень воздействия ценопопуляции на среду. Эта степень воздействия является показателем мощности ценопопуляций. Коэффициент возрастности можно определить как средневзвешенную возрастность одной особи. Чем выше он, тем старше исследуемая популяция.

#### 4.2.3. Определение типа популяции

А.А. Уранов (1975) ввёл понятие возрастности особи ( $m_i$ ) как доли энергии, потребленной ею к данному возрастному состоянию  $i$ , по отношению ко всей энергии, доступной особи в течение полного онтогенеза. Количественно возрастность особи выразил как

$$m_i = 1 / 1 + e^{6-i}$$

Согласно этой формуле, половина всей энергии потребляется в среднем к зрелому генеративному состоянию  $g_2$ , бальная оценка которого и стоит в показателе экспоненты.

Л.А. Животовский (2001) аналогично предлагает понятие энергетическая эффективность растения  $i$ -го онтогенетического состояния:

$$e_i = 4e^{6-i} / (1 + e^{6-i})^2$$

Эффективность растения  $i$ -го онтогенетического состояния можно интерпретировать как величину его нагрузки на энергетические ресурсы среды, выражаемую в долях нагрузки, производимой растениями  $g_2$  этой популяции. Величины  $m_i$  и  $e_i$  приведены в таблице 16.

На основе понятия возрастности А.А. Уранов (1975) ввёл индекс возрастности популяции (дельта) как средневзвешенные значения  $m_i$ , где “весом” являлась доля растений  $i$ -го онтогенетического состояния. Коэффициент возрастности определяли по формуле

$$\Delta = \sum K_i m_i / \sum K_i$$

где  $\sum K_i$  – сумма растений всех возрастных состояний,  $m_i$  – возрастность особей (по: Уранов, 1975).

Соответственно этому Л.А. Животовский (2001) выводит среднюю энергетическую эффективность популяции ( $\omega$ ) или индекс эффективности как средневзвешенное значение величины  $e_i$ .

Среднюю энергетическую эффективность популяции ( $\omega$ ), или индекс эффективности как средневзвешенное значение величин  $e_i$ , рассчитывали по формуле:

$$\omega = \sum n_i e_i / \sum n_i$$

где  $n_i$  – это абсолютное число растений  $i$ -ого возрастного состояния,  $e_i$  – эффективность,  $\sum n_i$  – общее число растений (Животовский, 2001) (табл. 16).

Основываясь на совместном использовании этих двух индексов Л.А. Животовский (2001) предлагает классификацию типов нормальных популяций “дельта-омега” (рис. 11). Данная классификация охватывает и популяции, имеющие два пика в возрастном спектре (например, прегенеративных и сенильных) и характеризующие, например, переход от старых к молодым популяциям. Такие популяции получили название переходного типа или переходных, поскольку могут представлять собой переход от популяции стареющего типа к молодой.

Таблица 16

## Онтогенетические состояния и их характеристики

Периоды и этапы	Возрастное состояние	Индексы	Возрастность ( $m_i$ )	Эффективность ( $e_i$ )
I. Латентный	Семена	se	0.0025	0.0099
II. Прегенеративный	Проросток	p	0.0067	0.0266
	Ювенильное	j	0.0180	0.0707
	Имматурное	im	0.0474	0.1807
	виргинильное	v	0.1192	0.4200
III. Генеративный	Молодое генеративное	$g_1$	0.2700	0.7864
	Зрелое генеративное	$g_2$	0.5	1.0
	Старое генеративное	$g_3$	0.7310	0.7864
IV. Постгенеративное	субсеньльное	ss	0.8808	0.4200
	Сеньльное	s	0.9529	0.1807
	Отмирающее	sc	0.9819	0.0707



Рис. 11 Типы нормальных популяций, выделяемые критерием «дельта-омега» на основе значений индекса возрастности ( $\Delta$ ) и индекса эффективности ( $\omega$ ).

#### 4.3. Определение виталитетного состояния ценопопуляций

Виталитет – это уровень состояния растений, обеспечивающий реализацию генетически обусловленной программы роста и продукции.

Для оценки виталитетной структуры ценопопуляции необходимо измерение у особей ряда морфологических параметров. В зависимости от целей конкретного исследования и специфики объекта, измерению могут подлежать не все параметры, а лишь часть их. У одних видов растений при подобных исследованиях необходимо проводить изъятие определенного числа особей (10-50, обычно 30) из ценопопуляции с проведением дальнейших замеров. У редких и охраняемых видов, образующих малочисленные ценопопуляции, изъятие растений не

проводится, и измерению подлежат лишь те признаки, по которым можно получить достоверные данные в полевых условиях, не причинив вред самому растению.

Для оценки жизненности (виталитета) особи в популяции используется индекс виталитета особи (IVI), который рассчитывается по формуле (Ишбирдин и др., 2005):

$$IVI = \frac{\sum_{i=1}^N X_i^1 / X_i^2}{N}$$

где  $X_i^1$  – значение  $i$ -го признака особи,  $X_i^2$  – среднее значение  $i$ -го признака для всей выборки,  $N$  – число признаков. Ключевые признаки для расчетов индекса IVI устанавливают с применением корреляционного анализа. Обычно выбирают 3 - 7 признаков, максимально скоррелированных между собой.

Ранжированный по индексу виталитета ряд особей разбивают на три класса виталитета - высший (а), средний (b) и низший (с) (Злобин, 1989). Установление границ класса b проводят в пределах границ доверительного интервала среднего значения ( $x_{cp} \pm \sigma$ ). Результаты представляют в виде виталитетных спектров ЦП (рис. 12).

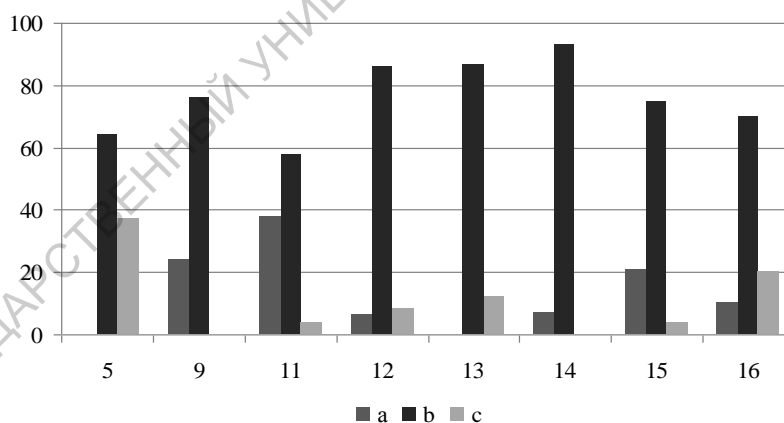


Рис. 12. Виталитетные спектры ценопопуляций *Tulipa schrenkii* в 2013 г. По оси абсцисс – классы виталитета, по оси ординат – доля особей отдельных классов, % (По: Кашин и др., 2014).

Виталитетный тип ценопопуляций определяется с использованием критерия Q (Злобин, 1989):

цветущие ценопопуляции - ( $Q = 1/2(a+b) > c$ ;

равновесные ценопопуляции - ( $Q = 1/2(a+b) = c$ ;

депрессивные ценопопуляции - ( $Q = 1/2(a+b) < c$ ).

Степень процветания или депрессивности ЦП оценивают с помощью индекса  $I_Q = (a+b)/2c$  (Ишбирдин и др., 2005). В этом случае значения выше единицы соответствовали процветающему состоянию, а значения ниже единицы – депрессивному. Степень отклонения от единицы, соответствующей равновесному состоянию, отражает степень процветания или депрессии (табл. 17).

Таблица 17

Характеристика жизненности и виталитетный тип ценопопуляций  
*Tulipa schrenkii* в Саратовской области в 2013г.

№ ЦП	Доля особей по классам виталитета, %			IVC	$I_Q = (a+b)/2c$	Q	Виталитетный тип ценопопуляции
	a	b	c				
5	0	64	37	0.73	0.85	31.82	депрессивная
9	24	76	0	1.13	-	50.00	процветающая
11	38	58	4	1.07	11.50	47.92	процветающая
12	6	86	8	0.94	5.67	45.94	процветающая
13	0	87	13	0.89	3.40	43.59	процветающая
14	7	93	0	0.92	-	50.00	процветающая
15	21	75	4	0.96	11.50	47.92	процветающая
16	10	70	20	0.91	2.00	40.00	процветающая

Для характеристики виталитетной структуры ценопопуляции в целом используют индекс виталитета ЦП (IVC) (Ишбирдин, Ишмуратова, 2004; Ишбирдин и др., 2005):

$$IVC = \frac{\sum_{i=1}^N X_i^1 / X_i^2}{N},$$

где  $X_i^1$  – значение i-го признака в ЦП,  $X_i^2$  – среднее значение i-го признака для всех ЦП, N – число признаков.

Для оценки жизненности ценопопуляций можно использовать средние значения морфометрических параметров особей в популяциях. В этом случае количественные диапазоны каждого признака организма разбивают на пять классов с одинаковым объемом в линейной шкале. Затем каждому классу присваивается балл. Наименьший балл соответствует худшему состоянию организма. Перевод значений признаков в шкалу баллов проведен по методике Г.Н. Зайцева. Результаты могут быть представлены в виде круговых диаграмм (рис. 13). Иногда в комплексе с морфологическими параметрами на таком графике отражают и популяционные (плотность, доля цветущих особей, IVC и др.).



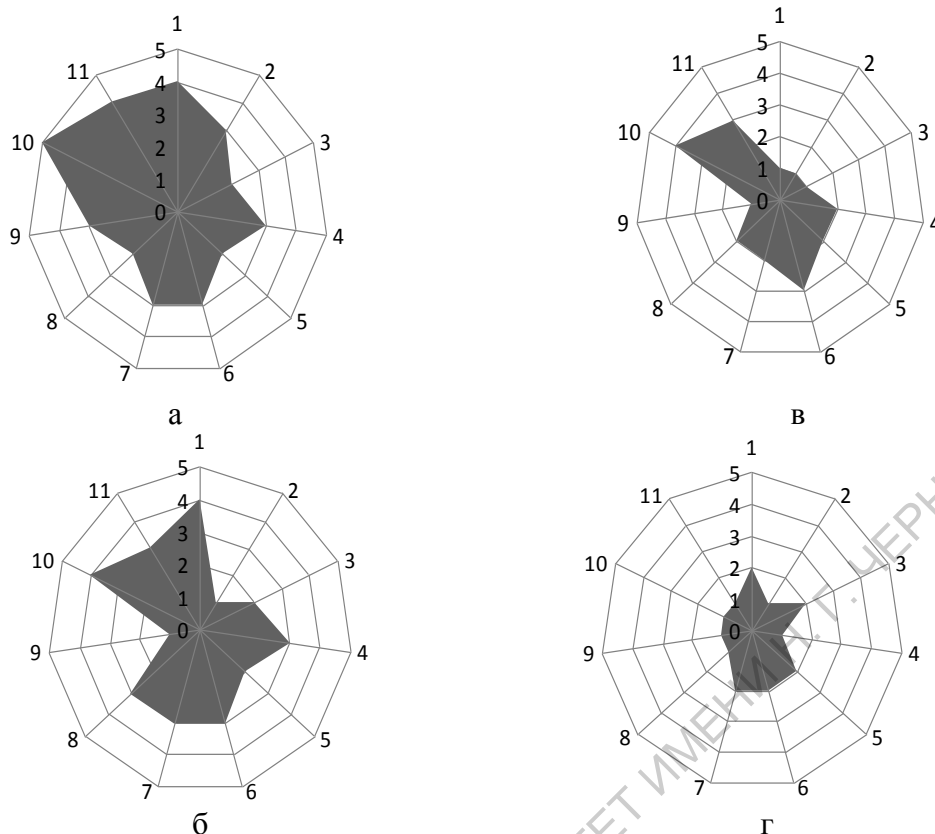


Рис. 13. Морфологические параметры прострела лугового (в баллах): а – Ботанический сад, б – Кумысная поляна, в – Татищевский р-н, г – Красноармейский р-н. Признаки: 1 – высота растения; 2 – число генеративных побегов; 3 – длина цветоножки; 4 – длина побега; 5 – высота цветка; 6 – диаметр цветка; 7 – длина лепестка; 8 – ширина лепестка; 9 – число листьев; 10 – длина листа; 11 – ширина листа.

## 5. Установление жизненной стратегии вида

Наиболее популярной является система **эколого-ценотических стратегий** Раменского-Грайма, в которой стратегия определяется как место в системе независимых и определяющий выживание организмов факторов – стресса и нарушения (Миркин, Наумова, 1998). Выделяют три первичных типа стратегии – С (виоленты), S (пациенты) и R (эксплеренты). Кроме первичных выделяют и переходные вторичные типы стратегий – CS, CR, SR, CSR.

Под **онтогенетической стратегией** понимают изменчивость морфологической целостности растений на экоклинe (Ишбирдин, Ишмуратова, 2004).

Число вовлеченных в анализ стратегии вида ценопопуляций не должно быть ниже пяти-семи. Выборка должна представлять как можно более широкий экологический спектр местообитаний с охватом условий индивидуального и популяционного оптимумов, а так же пессимумов на

краю экологического ареала. Пессимальное положение популяции может определяться положением на краю географического ареала, обитанием в нетепличных эколого-ценотических условиях (определяется по положению сообщества в системе эколого-флористической классификации растительности) и сильным антропогенным прессом. Оценка экологических и антропогенных факторов местообитания производится по составу видов в сообществе с использованием экологических шкал (см. глава 1).

В каждой ценопопуляции производится измерение морфологических параметров 30 (в некоторых случаях и более) растений каждого возрастного состояния. Для оценки изменения силы корреляционных связей эта выборка репрезентативна. Выбор морфологических параметров диктуется необходимостью прижизненного учета в случае с редкими растениями. При выборе признаков отдаются предпочтение тем, которые имеют высокую общую (по коэффициенту вариации -  $C_v$ ) и согласованную (по квадрату коэффициента корреляции -  $R^2_{ch}$ ) изменчивость. Это, как правило, такие параметры, как длина и ширина листовая пластинки, длина черешка, высота и толщина стебля и др. Изменение этих признаков носит адаптивный характер (Паутов, 2002; Ростова, 2002). Не включаются в анализ мало изменчивые параметры и параметры с высокой общей и низкой согласованной изменчивостью (количество боковых побегов), изменчивость которых зависит от влияния внешних факторов. В расчетах, прежде всего, используются такие признаки, степень развития которых определяется экологическими условиями (высота и диаметр стебля, параметры листьев и т.д.), не зависимо от уровня их согласованной изменчивости.

Для оценки степени морфологической целостности растений можно использовать «**индекс морфологической интеграции**» -  $I$  (Злобин, 1989), рассчитываемый по формуле:

$$I = \frac{B}{\sqrt{n^2 - n} \cdot 2},$$

где  $B$  – число статистически значимых коэффициентов корреляции,  $n$  – число параметров.

Кроме того для оценки среднего уровня связей в матрицах чаще применяем коэффициент детерминации, который рассчитывается как

усредненный по всей матрице квадрат коэффициента корреляции -  $R_m^2$  (Ростова, 2002) (см. главу 2). Сравнительный анализ результатов, полученных с использованием этих двух показателей морфологической интеграции, показал их хорошее соответствие. Причиной служит то, что процедура возведения в квадрат усиливает вклад в коэффициент детерминации достоверных (со значениями по модулю близкими к 1) коэффициентов корреляции.

Высокий уровень интеграции структур может быть результатом более полной реализации генетической взаимообусловленности в их развитии в условиях оптимума и реализации в условиях стресса защитной стратегии.

Существуют два способа установления экологического градиента: прямой и не прямой. В первом случае изучаемые ценопопуляции ординируются вдоль известного фактора, во втором - вдоль расчетного градиента, который требует экологической интерпретации. Использование прямого градиентного анализа требует наличия ведущего, перекрывающего влияние прочих, фактора.

А.Р. Ишбирдин с соавт. (2005) предложили метод установления эколого-ценотического градиента (экоклина) с использованием показателя виталитета (жизненности) растений в ценопопуляциях по размерному спектру особей. При этом исходят из того, что максимальное развитие растение получает в наиболее благоприятных условиях и уменьшает свой габитус в условиях стресса, порождаемого любыми факторами или их сочетаниями (см. главу 2..).

Индекс вычисляется для каждой ценопопуляции. Градиент ухудшения условий роста выстраивается как ряд ценопопуляций по убыванию значения их индексов виталитета. Наибольшее значение индекса соответствует наилучшим условиям реализации ростовых процессов, а наименьшее - худшим условиям. Отношение максимального значения индекса к минимальному будет отражать в пределах исследованных популяций размерную пластичность вида (индекс размерной пластичности):

$$ISP = IVC_{\max} / IVC_{\min}$$

Преимущество предлагаемого подхода в отсутствии необходимости полного совпадения набора оцениваемых параметров растений в ценопопуляциях. Пробная ординация ценопопуляций по

разным наборам признаков дала совпадающие или очень близкие результаты.

Выделяют несколько типов реагирования онтогенеза растений на стресс - онтогенетических стратегий (Ишмуратова, Ишбирдин, 2004):

1. С усилением стресса происходит увеличение морфологической интеграции - проявляется защитная компонента в стратегии выживания (Злобин, 1989).
2. С усилением стресса происходит ослабление морфологической интеграции - проявляется стрессовая компонента в стратегии выживания.
3. При нарастании стресса происходит сначала усиление, а затем ослабление взаимообусловленности в развитии структур растения (чередование защитной и стрессовой компонент в онтогенетической стратегии).
4. При нарастании стресса происходит сначала ослабление, а затем усиление взаимообусловленности в развитии структур растения (чередование стрессовой и защитной компонент в онтогенетической стратегии) (рис. 14).

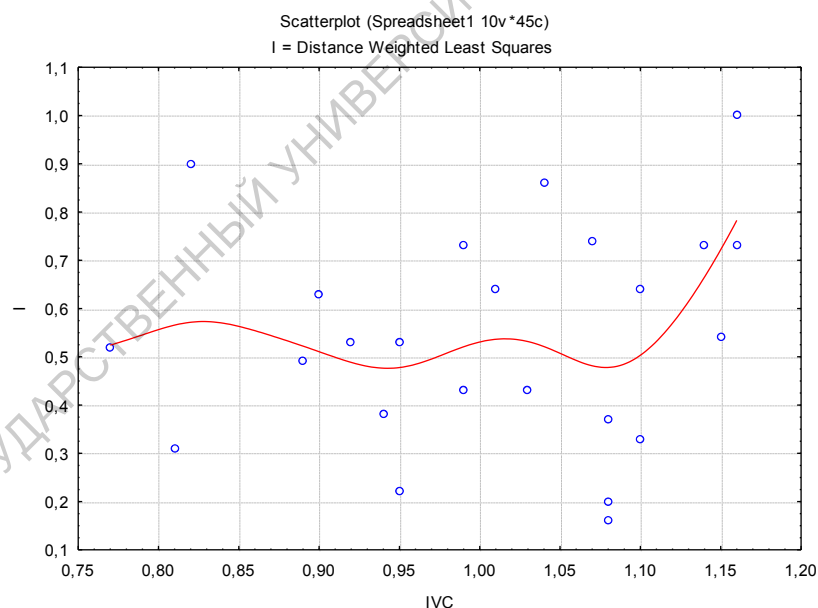


Рис. 14. Изменение морфологической целостности *T. gesneriana* в ряду изменения эколого-ценотических условий. По оси абсцисс индекс виталитета ценопопуляций (IVC), по оси ординат - индекс морфологической интеграции особей (I).

Чередование стрессовой и защитной компонент в онтогенетической стратегии наблюдается у тюльпана Геснера (рис. 14). Такой тип зависимости характерен для видов, проявляющих пациентность (S-стратегии). Сильный стресс у них усиливает детерминированность в развитии морфоструктур. Размерная

пластичность у таких видов, как правило, невысокая.

Ю.А. Злобин (1989) различает так же **онтогенетические тактики** структурных частей растения и растения в целом в процессе развития, а так же тактики, реализуемые в зависимости от положения ценопопуляции на экологическом градиенте. Характер изменения морфологических параметров оценивается по изменению уровня их варьирования, оцениваемого по коэффициенту вариации. Всего им выделяются четыре возможных варианта онтогенетических тактик:

стабилизация (варьирование признака стабилизировано);

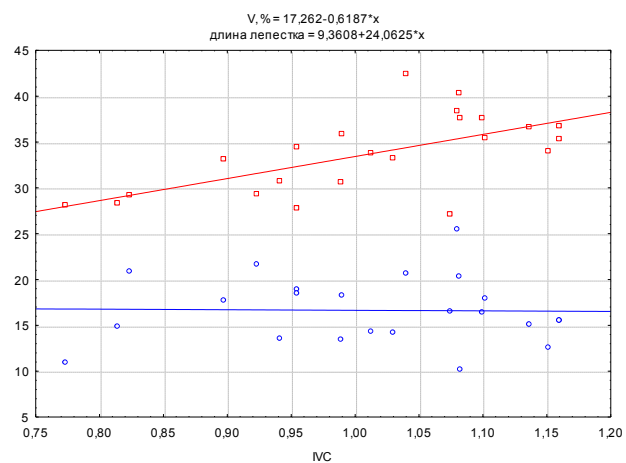
конвергенция (уровень варьирования признака падает при стрессе);

дивергенция (уровень варьирования возрастает);

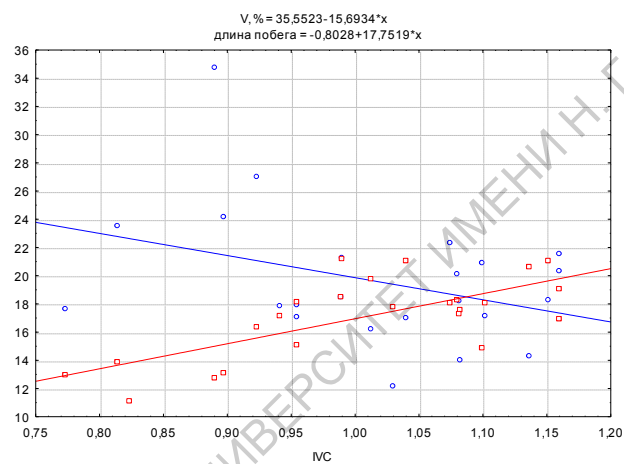
неопределенная изменчивость (неопределенные изменения уровня варьирования признака) (рис. 15).

Анализ морфологической структуры тюльпана Геснера выявил три типа онтогенетических тактик в формировании признаков морфоструктуры: конвергентную, дивергентную и стабилизацию. Зависимость изменения коэффициента вариации некоторых признаков от виталитета ценопопуляции представлена на рисунке 15. Дивергентный характер онтогенетической тактики имеет длина побега (рис. 15 б). При ухудшении условий обитания наблюдается общее уменьшение высоты растений и увеличении вариации этого признака. Конвергентный характер имеют большинство параметров вегетативной сферы тюльпана. Наиболее хорошо он выражен у признака ширина нижнего листа (рис. 15 в). При нарастании стресса происходит уменьшение размеров вегетативных органов и снижение их вариабельности. Тактика стабилизации характерна для генеративных органов, например, длины листочка околоцветника (рис. 15 а). При ухудшении условий генеративная сфера так же уменьшается в размерах.

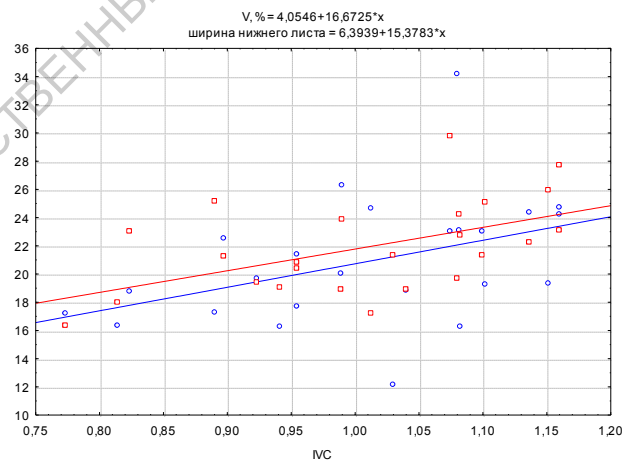
Таким образом, у тюльпана не наблюдается характерная для многих видов, тактика, направленная на уменьшение вегетативной сферы при стабилизации генеративной в стрессовых условиях. При нарастании стресса происходит общая миниатюризация растений, увеличивается разброс по высоте цветоноса. Размеры цветка вариабельны в меньшей степени, чем размеры вегетативных органов.



а



б



в

Рис. 15. Зависимость коэффициента вариации признаков ( $V, \%$ ) тюльпана Шренка от виталитета ценопопуляций (IVC) - синим. Зависимость среднего значения признака от IVC - красным. а - длина листочка околоцветника, б - длина побега, в - ширина нижнего листа.

## **6. Анализ популяционных характеристик репродуктивной биологии вида**

### **6.1. Выявление способа семенного воспроизводства в популяциях растений.**

#### **6.1.1. Метод беспыльцевого режима**

Суть метода состоит в предотвращении возможности опыления и оплодотворения с помощью механической или пространственной изоляции соцветий или цветков.

Механическая изоляция обеспечивается, как правило, помещением соцветий или цветков женского типа в специальные бумажные (как правило, пергаментные) пакеты (изоляторы) до начала цветения. Используются и другие приёмы изоляции: ватные тампоны, изоляторы из ткани и т.п. Изоляторы не должны препятствовать росту соцветий.

В случае обоеполости соцветий или цветков, изоляции предшествует операция механической кастрации - удаления пыльников». Она производится либо с помощью пинцета в случаях: 1) крупных пыльников и 2) небольшого числа цветков в соцветии при несросшихся в трубку пыльниках; либо путем срезания пыльников ниже основания.

При раздельнополости и однодомности, как например, у кукурузы, кастрацию производят путем удаления мужских соцветий.

Электрофизическая кастрация, температурная и т. п. являются недостаточно надежными.

Пространственная изоляция достигается выращиванием только женских (как правило, кастрированных) растений, в том числе мужски стерильных (с ЦМС или ГМС) форм, на участках, не доступных из-за большого расстояния для возможных опылителей.

При этом о частоте апомиксиса судят по частоте образования семян в условиях изоляции.

Использование метода ограничено:

а) техническими возможностями. Далеко не все формы легко кастрировать (например, при обилии мелких цветков в крупном раскидистом соцветии, как у многих *Panicoideae*);

б) выявлением только автономных форм апомиксиса, не требующих опыления. Идентификация псевдогамного апомиксиса требует цитозэмбриологического анализа.

Этот метод приложим ко многим сложноцветным (*Taraxacum* и т.п.), а в других семействах лишь к отдельным видам. У аллогамных видов - строгих перекрестников - возможна идентификация автономного апомиксиса данным методом без кастрации (Кашин, Шишкинская, 1999).

### **6.1.2. Анализ качества пыльцы в популяциях растений.**

В исследованиях, выполненных П.Г. Куприяновым (1989), четко установлена положительная корреляция между степенью дефектности пыльцы (СДП) и апомиксисом. С использованием математических методов им проведена оценка предельного уровня дефектности пыльцы у половых видов, который отделяет их от апомиктичных. Такая граница соответствует СДП = 11.7%. Определение степени дефектности пыльцы производится на временных препаратах, окрашенных ацетокармином. При подсчете числа дефектных пыльцевых зерен нужно соблюдать следующие правила:

а) общее число подсчитанных на препарате пыльцевых зерен должно составлять выборку большого объема (200-300, не менее ста);

б) во избежание повторного подсчета одних и тех же пыльцевых зерен поля зрения располагают по определенной системе. Если пыльцы незначительное количество, то ведется ее полный подсчет на стекле. Чем больше количество пыльцы на препарате, тем меньше число полей зрения.

в) с помощью статистической обработки определяют оптимальный размер выборки, предварительно изучив СДП у нескольких особей;

г) дефектной пыльцой считается вся пыльца кроме той, которая имеет нормальный размер и хорошо выполнена. СДП - это доля дефектных пыльцевых зерен в общем количестве пыльцы в пыльнике.



Данный метод - метод прогнозирования, но не окончательного выявления апомиксиса. Это обусловлено тем, что значительное снижение качества пыльцы может происходить и по другим причинам, совершенно не связанным с апомиксисом. Такими причинами могут быть: хромосомная несбалансированность генотипа, воздействие неблагоприятных экологических факторов, ЦМС, гинодиэция, вегетативное размножение и другое. Однако, как показали исследования П.Г. Куприянова, основной вклад в проявление этого признака вносит именно апомиксис. Поэтому метод позволяет значительно сократить круг видов - предполагаемых апомиктов, путем исключения из него видов с нормальной пыльцой, которые характеризуются половым размножением.

### ***6.1.3. Выявление способности к апомиксису с использованием цитозмбриологического метода***

Точное заключение о наличии у вида апомиктичного способа размножения можно сделать при использовании цитозмбриологического метода анализа. Переход на апомиктичный способ размножения сопровождается значительными изменениями в ходе процессов развития гаметофитов, гамет, зародыша и эндосперма. Изучение этих изменений у разных видов позволило С.С.Хохлову составить перечень эмбриологических признаков апомиксиса (Хохлов и др., 1978). В этот перечень включено несколько десятков эмбриологических признаков апомиксиса. Однако, есть прямые и косвенные эмбриологические признаки апомиктичного размножения. Например, прямым признаком апомиксиса является ранний эмбриогенез (**преждевременная эмбриония**), то есть образование зародыша до цветения, а также образование зародышей из соматических клеток или при отсутствии следов оплодотворения.

К числу косвенных признаков апомиксиса можно отнести низкое качество пыльцы, аномальная структура части или всех зародышевых мешков, формирование нескольких зародышевых мешков в одной семязпочке и прочее.

Несмотря на точность эмбриологического метода полная уверенность в наличии апомиксиса, а также определении его частоты возможна только при комплексном использовании нескольких методов.

Использование цитозембриологического метода выявления апомиксиса стало более эффективным после разработки ряда ускоренных методик исследования женской генеративной сферы (методика ферментативной мацерации и диссекции семязачатков, методика просветления семязачатков и др.) (Юдакова и др., 2012). Однако нужно иметь виду, что наличие эмбриологических признаков апомиксиса не может гарантировать его полную реализацию на уровне производства семян. В связи с этим желательно, чтобы цитозембриологический анализ сопровождался выявлением семенной продуктивности.

### ***6.2. Анализ семенной продуктивности растений в популяциях***

Принято различать понятия семенной продуктивности и урожая семян. Семенная продуктивность - это плодовитость отдельной особи или даже генеративного побега. Урожай семян - это количество семян, собираемых с единицы площади, занимаемой определенной популяцией или образцом.

В понятии "семенная продуктивность" принято различать потенциальную семенную продуктивность и реальную или фактическую (Вайнагий, 1974). Первая определяется количеством семязачатков, продуцируемых особью; вторая - количеством нормально развитых семян на ту же единицу учета. Отношение показателей реальной семенной продуктивности (РСП) к потенциальной (ПСП), выраженное в процентах, предлагается называть коэффициентом продуктивности:  $K_{пр} = (РСП/ПСП) \cdot 100$ .

Для решения ряда теоретических вопросов при анализе реальной семенной продуктивности важно учитывать также процент завязавшихся, но невызревших семян, и количество вызревших, но поврежденных семян.

Показатели семенной продуктивности значительно варьируют по годам в связи с многогодовичными колебаниями условий вегетации и

меняются с возрастом растений, достигая максимума у  $g_2$ - $g_3$  растений. Это должно учитываться при разработке программы исследований.

Завершающим этапом в изучении семенной продуктивности является определение качества семян.

Семенная продуктивность различных особей в пределах одной популяции даже в один и тот же сезон далеко не одинакова, поэтому основным методическим требованием является получение данных, достаточных для статистической обработки. Случайная выборка в 30 особей или генеративных стеблей является более или менее достаточной.

У многолетников единицей учета служит генеративный побег. Ветвящиеся побеги срезаются у самого основания. При определении ПСП на них подсчитывают число цветков (а), в цветке – число завязей (б), в завязи – число семязачатков (в). При определении РСП на побеге подсчитывают число плодов (г), а в плодах – число семян (д). При возможности определения границ особей у многолетников подсчитывают число генеративных побегов (N) на 30 особях и данные семенной продуктивности побега пересчитывают на особь путём перемножения средних величин:

$$\text{ПСП} = a_{\text{ср}} \cdot b_{\text{ср}} \cdot v_{\text{ср}} \cdot N_{\text{ср}}, \quad \text{РСП} = \Gamma_{\text{ср}} \cdot d_{\text{ср}} \cdot N_{\text{ср}}.$$

У видов с односемянными плодами потенциальная семенная продуктивность соответствует числу цветков. Если число семязачатков в завязи строго фиксировано (зонтичные, губоцветные, маревые и т.п.), среднее число цветков умножают на соответствующее число семязачатков в завязи.

В многосемянных плодах с неопределенным числом семян подсчитываются семена и семязачатки в каждом плоде. Для учета реальной семенной продуктивности следует увеличить выборку до 200-300 плодов.

Если период созревания и осыпания плодов на особи очень растянут, материал собирают в 2-3 срока (по 30 экземпляров). При этом число цветков и бутонов подсчитывают полностью на всех стеблях в каждый срок, а вариационный ряд составляют один для всех учтённых экземпляров. Анализ плодов для определения реальной семенной продуктивности производится только в плодах, достигших соответствующей фазы спелости к данному сроку учета. При этом,

естественно, в разные сроки будут анализироваться цветки, занимающие различное положение в соцветии.

Выборка плодов для анализа реальной семенной продуктивности должна охватывать разные ярусы или зоны всех соцветий генеративного побега. Конкретная методика взятия проб для анализа плодов (семян) определяется морфологическими особенностями соцветий.

Кроме коэффициента продуктивности ( $K_{пр}$ ) важным показателем при анализе семенного воспроизводства является коэффициент плодочтения ( $K_{пц}$ ) (Томилова, 1985).  $K_{пц}$  вычисляется как среднее количество вызревших плодов ( $N_{Fr}$ ), отнесённое к среднему количеству цветков ( $N_{Fl}$ ), развившихся на растении:  $K_{пц} = N_{Fr} / N_{Fl}$ .

### **6.3. Морфологическая характеристика семян**

Внешние особенности плодов и семян являются видовым признаком. Кроме того, и на популяционном уровне различия в их морфологии могут быть заметными. Различия морфологического характера выражаются в величине семян, их форме, цвете, наличии и характере рисунка на поверхности семян, наличии на ней волосков, прицепков и т.д..

#### **6.3.1. Количественные характеристики семян**

При сравнительном изучении семян определяют их величину и массу у растений разного возраста и разных лет сбора, изучаются семена всех исследуемых популяций.

При определении величины семян измеряют их длину, ширину и толщину.

Линейные размеры определяют с помощью измерительной лупы (с точностью до 0,1 мм), бинокля, микрометра, штангенциркуля. Для этого из партии семян отсчитывают 30 шт. При наличии большого количества семян их размеры могут определяться просеиванием навески семян на решетках с отверстиями различного диаметра.

Масса 1000 шт. семян определяется следующим образом: отсчитывают 4 пробы по 1000 семян и взвешивают. При небольшом количестве семян в пробу включают 100 семян, затем путем пересчета

определяют массу 1000 семян. Достоверность данных можно проверить по таблице 18.

Таблица 18

Таблица допускаемых расхождений между двумя пробами при определении массы 1000 семян

Масса наибольшей пробы семян, г	Допустимые расхождения, г	Масса наибольшей пробы семян, г	Допустимые расхождения, г	Масса наибольшей пробы семян, г	Допустимые расхождения, г
0.20-0.40	0.01	7.18-7.37	0.35	14.15-14.34	0.69
0.41-0.61	0.02	7.38-7.58	0.36	14.35-14.55	0.70
0.62-0.81	0.03	7.58-7.78	0.37	14.56-14.75	0.71
0.82-1.02	0.04	7.79-7.99	0.38	14.76-14.96	0.72
1.03-1.22	0.05	8.00-8.20	0.39	14.97-15.16	0.73
1.23-1.43	0.06	8.21-8.40	0.40	15.17-15.37	0.74
1.44-1.63	0.07	8.41-8.61	0.41	15.38-15.57	0.75
1.64-1.84	0.08	8.62-8.81	0.42	15.58-15.78	0.46
1.85-2.04	0.09	8.82-9.02	0.43	15.79-15.98	0.77
2.05-2.25	0.10	9.03-9.22	0.44	15.99-16.19	0.78
2.26-2.45	0.11	9.23-9.42	0.45	16.20-16.40	0.79
2.46-2.66	0.12	9.43-9.63	0.46	16.41-16.60	0.80
2.67-2.86	0.13	9.64-9.83	0.47	16.61-16.80	0.81
2.87-3.07	0.14	9.84-10.04	0.48	16.81-17.01	0.82
3.08-3.27	0.15	10.05-10.24	0.49	17.02-17.21	0.83
3.28-3.48	0.16	10.25-10.45	0.50	17.22-17.42	0.84
3.49-3.68	0.17	10.46-10.65	0.51	17.43-17.62	0.85
3.69-3.88	0.18	10.66-10.86	0.52	17.63-17.83	0.86
3.89-4.09	0.19	10.87-11.07	0.53	17.84-18.03	0.87
4.10-4.30	0.20	11.08-11.27	0.54	18.04-18.24	0.88
4.31-4.50	0.21	11.28-11.48	0.55	18.25-18.44	0.89
4.51-4.70	0.22	11.49-11.68	0.56	18.45-18.65	0.90
4.71-4.91	0.23	11.69-11.89	0.57	18.66-18.85	0.91
4.92-5.12	0.24	11.90-12.10	0.58	18.86-19.06	0.92
5.13-5.32	0.25	12.11-12.29	0.59	19.07-19.27	0.93
5.33-5.53	0.26	12.30-12.50	0.60	19.28-19.47	0.94
5.54-5.73	0.27	12.51-12.71	0.61	19.48-19.67	0.95
5.74-5.94	0.28	12.72-12.91	0.62	19.68-19.88	0.96
5.95-6.14	0.29	12.92-13.12	0.63	19.89-20.08	0.97
6.15-6.35	0.30	13.13-13.32	0.64	20.09-20.29	0.98
6.36-6.55	0.31	13.33-13.52	0.65	20.30-20.49	0.99
6.56-6.76	0.32	13.53-13.73	0.66	20.50-20.70	1.00
6.77-6.96	0.33	13.74-13.93	0.67	20.71-20.91	1.01
6.97-7.17	0.34	13.94-14.14	0.68	20.92-21.12	1.02

#### Правила пользования таблицей.

Предложенная таблица разработана в соответствии с требованием ГОСТ 13056.4-67, п. 1.4 и содержит две графы. В первой графе – массы

наибольших проб семян с одинаковым допускаемым расхождением сгруппированы в один цифровой ряд, во второй графе – показаны величины допустимых расхождений.

Пример 1: масса первой пробы семян – 4.89 г, второй пробы - 4.67 г, допускаемое расхождение для массы наибольшей пробы ( 4.89 г) составляет 0.23 г. Фактическое расхождение между первой и второй пробами составляет  $4.89 - 4.67 = 0.22$  г, то есть не превышает допускаемого, поэтому третью пробу не отсчитывают.

Пример 2: Масса первой пробы семян – 4.08 г и второй пробы – 4.29 г. Допускаемое расхождение для массы наибольшей пробы (4.29) составляет 0.20 г. Фактическое расхождение между первой и второй пробами составит  $4.29 - 4.08 = 0.21$  г, то есть более допускаемого, поэтому отсчитывают и взвешивают третью пробу.

### **6.3.2. Качественные характеристики семян**

Термин «разнокачественность семян» очень широко употребляется в литературе. Но этим термином обозначают любые различия семян, в том числе и по количественным показателям. Вместо «разнокачественность» лучше использовать термин «неоднородность семян».

Под семенами здесь понимаются односемянные зачатки различной морфологической природы - семена, односемянные плоды и плодики, односемянные части членистых или дробных плодов.

Признаки неоднородности семян могут быть наследственными или модификационными, вызываться различными факторами и проявляться у семян одного плода, одной особи, популяции или в разных участках ареала.

Признаки неоднородности семян

I. Количественные: размеры, абсолютный вес, парусность.

II. Структурные:

а) морфологические: форма, характер симметрии, окраска, скульптура поверхности, наличие и характер придатков, степень развития зародыша, его положение и форма;

б) анатомические: гистология спермодермы или околоплодника, особенности эндосперма - размеры и форма клеток, размеры крахмальных зерен и т.д.

III. Биофизические: электрические свойства семян, радиочувствительность.

IV. Биохимические: состав белков, аминокислот, витаминов и др., состав и активность ферментов.

V. Физиологические: проницаемость покровов семени, степень влажности, глубина покоя, физиология прорастания, длительность жизнеспособности.

Природа и факторы изменчивости семян, уровни ее проявления обуславливают различные формы и типы неоднородности семян (табл. 19). Сущность различных форм неоднородности семян раскрывается ниже.

#### Формы модификационной неоднородности семян.

Под матуральной неоднородностью семян понимаются различия семян по степени спелости к моменту уборки. Формирование семян в многосемянном плоде, в соцветии и на всей особи идет неравномерно. Одновременно можно наблюдать семена на самой начальной стадии формирования и семена, закончившие развитие. Семена разной спелости различаются по степени развития зародыша, по химическому составу эндосперма, по физическому состоянию семенной кожуры и содержанию влаги. Эти различия обуславливают разные размеры и абсолютный вес семян, их окраску, а также характер их прорастания.

Топографическая неоднородность обусловлена местом образования семян на растении. Она свойственна только вполне зрелым семенам, развивающимся в различных частях соцветий и кроны. Ее определяют разные условия питания и водоснабжения семян в плоде и на особи, разный возраст цветоносов и разные темпы прохождения этапов органогенеза.

Диапазон различий зрелых семян в пределах соцветий, особенно таких специализированных, как сложный колос, сложный зонтик, корзинка, метелка, початок, весьма широк. Топографическая неоднородность охватывает все категории различий – от количественных до физиологических (табл. 19).

## Типы и формы неоднородности семян по уровням проявления и факторам

Уровни проявления	Типы неоднородности семян			
	Ненаследственная (модификационная)		Наследственная (генотипическая)	
	Формы и уровни их проявления	Фактор	Формы и уровни их проявления	Фактор
А. Органный в пределах: а) плода б) соплодия	Матуральная (Аа, Аб, Б)	Разновременность созревания семян	I. Разнородные семена, сходные по генотипу 1. Гетерокарпическая (Аа, Аб, Б)	Генотип вида
Б. Организменный (в пределах особи)	Топографическая (Аа, Аб, Б)	Разные условия питания и водоснабжения; разные возраст цветоносов и темпы органогенеза	II. Разнородные семена, различные по генотипу 1. Индивидуальная (В)	Индивидуальная изменчивость
В. Популяционный	Сезонная (В)	Метеорологические условия сезона, фенологическое состояние популяции	2. Межпопуляционная (Г)	Биологическая изоляция
Г. Видовой (в пределах ареала)	Разногодичная (В)	Метеорологические условия разных лет	3. Географическая (Г)	Географическая изменчивость
	Возрастная (В)	Разный возраст плодоносящих особей		
	Экологическая (В, Г)	Различия условий местообитания		

Четыре формы модификаций иной неоднородности проявляются в пределах популяции.

Сезонная неоднородность свойственна видам с растянутым периодом цветения и плодоношения. Она выявляется при сравнительном изучении семян, собранных отдельно в разные календарные сроки на протяжении вегетационного периода.

Сезонная неоднородность может быть связана с неполным вызреванием семян в связи с меняющимися погодными условиями в течение



вегетации. Семена разных сроков сбора нередко различаются по посевным качествам.

Разногодичная неоднородность семян возникает в пределах одной популяции в разные годы под воздействием неодинаковых погодных условий разных вегетационных сезонов.

Возрастная неоднородность также проявляется в пределах одной популяции. Возраст плодоносящих растений существенно сказывается на обилии и свойствах их семян.

Экологическая неоднородность наблюдается у семян разных популяций, произрастающих в неоднородных экологических (включая фитоценоотические) условиях. Этот тип неоднородности может обнаруживаться и на видовом уровне, и в пределах отдельных популяций.

#### Формы наследственной неоднородности семян

Гетерокарпическая неоднородность семян отражает разные формы гетерокарпии в пределах особи. Гетероморфные плоды, заключающие семена с глубокими морфологическими и физиологическими различиями, часто занимают строго фиксированное положение в соцветии (соплодии) и на особи. На первый взгляд гетерокарпическая неоднородность может быть принята за топографическую. Однако эти две формы неоднородности семян существенно отличаются друг от друга. Гетерокарпическая неоднородность является постоянным наследственным признаком вида в отличие от топографической, которая носит модификационный характер. Кроме того, различия семян при гетерокарпии выступают резче, как правило, затрагивая морфологические структуры семян, даже такие, как тип зародыша.

Гетерокарпическая неоднородность отличается от других форм наследственной неоднородности тем, что из семян любого морфотипа развиваются особи, формирующие весь спектр гетероморфных зачатков (плодов, члеников, семян), свойственных виду, поэтому ее выделяют в особый подтип наследственной неоднородности семян.

Три другие формы наследственной неоднородности семян (индивидуальная, межпопуляционная и географическая) проявляются только на популяционно-видовом уровне. Кроме того, в потомстве воспроизводится только один тип семян, свойственный материнской

особи (индивидуальная), исходной популяции (межпопуляционная) или конкретному участку ареала (географическая).

Наследственная неоднородность возникает и вследствие опыления генетически неоднородной пылью. Ее можно обозначить как «гетерозиготная». Но эта форма не включена в классификацию, так как ее невозможно обнаружить по фенотипу семян, а различия в фенотипе потомства нельзя отграничить от модификационных различий особей. Кроме того, гетерозиготная неоднородность семян - это всеобщее свойство всех семян (кроме апомиктических) вследствие того, что генетическая неоднородность гамет возникает и, в результате мейоза, наблюдается даже у строгих самоопылителей.

Различные формы неоднородности семян, отраженные в классификации, постоянно сочетаются друг с другом. Поэтому основным условием их разграничения и сравнительного исследования является строго дифференцированный сбор материала: в пределах многосемянного плода, одного соцветия, отдельной особи, изолированной популяции и т.д.

#### **6.4. Биология семян**

##### **6.4.1. Всхожесть и энергия прорастания семян**

Исследование процессов прорастания включает: выяснение условий прорастания семян при посеве в поле и при проращивании в лабораторных контролируемых условиях (температуры, влажности, аэрации, света, глубины заделки и т.д.); изучение всхожести семян (процент и энергия прорастания) и их реакции на условия проращивания в зависимости от условий формирования, места и времени сбора, длительности и условий хранения; изучение анатомических и физиолого-биохимических изменений в семенах, особенно на начальных этапах прорастания.

Под **всхожестью** понимается способность семян дать в определенных, точно установленных, воспроизводимых условиях нормальные проростки. Процент всхожести означает число семян, которые в установленных условиях за определенный срок дали нормальные проростки. При определении всхожести нужно иметь в

виду, что у одних растений семена сразу прорастают после созревания, а у других – через некоторый промежуток времени, который называется периодом покоя.

#### Выяснение причин покоя и разработка методов его преодоления.

Причины покоя семян различны и соответственно различны методы его преодоления. Поэтому при работе с покоящимися семенами необходимо иметь представление о типе покоя. Классификация типов покоя дана М.Г. Николаевой с соавт. (1985). Для установления типа покоя необходимо выяснить: а) степень развития и относительную величину зародыша, б) способность к набуханию семян, в) влияние различных покровов на способность к прорастанию (проращивание семян после удаления или повреждения различных покровов зародыша), г) реакцию семян на обработку гиббереллином либо другими стимуляторами прорастания, д) реакцию семян на теплую и холодную стратификацию. Изучение условий нарушения покоя и прорастания семян после предпосевной подготовки включает выяснение действия, в первую очередь, различной температуры (постоянной, периодически сменяющейся в течение стратификации или колеблющейся в течение суток). Желательно изучение действия таких факторов, как условий аэрации, влажности стратификационного субстрата, рН среды и т.д. Некоторые из них могут оказывать очень сильное действие на прорастание покоящихся семян. Во многих случаях необходимо исследовать действие света.

Желательно изучение зависимости глубины покоя семян от степени зрелости, длительности и условий хранения.

Явление вторичного покоя семян и условия, вызывающие его, изучаются при действии различной температуры, аэрации (погружение под воду или изменение состава атмосферы), подсушивания, обработки ингибиторами и стимуляторами.

Особую задачу представляет собой изучение характера и глубины покоя в зависимости от популяционной специфики семян, эколого-географических условий формирования и свойств материнского растения.

Изучение прорастания покоящихся семян желательно проводить не только в лабораторных, но и в полевых условиях для выяснения влияния климатических, почвенных, биотических и других условий.

Большое значение имеет выяснение внутренних причин покоя различных типов и сущности изменений, происходящих при его нарушении. В первую очередь это касается природы глубокого физиологического покоя и сущности стратификационных изменений.

Для выяснения специфики действия пониженной температуры следует проводить параллельные наблюдения за семенами, помещенными в такие же условия увлажнения, аэрации и т.д., но в тепло.

Особенно рекомендуется изучение активности ферментов, содержания и физиологического действия гормонов, динамики запасных веществ нуклеинового и белкового обмена, а также выявление структурных изменений в различных частях семени и зародыша.

Важным разделом является разработка методов ускоренного проращивания семян. Используемые методы в большой мере зависят от правильности определения типа покоя. Например, доразвитие зародыша в случае морфологического типа покоя стимулирует обработка гиббереллином. Для семян, находящихся в физиологическом покое, большое значение может иметь обработка такими физиологически активными веществами, как тиомочевина (ТМТД) и  $KNO_3$ , кинетин, а также гиббереллин или совместное действие двух последних гормонов вместе. Стимулировать прорастание может ухудшение аэрации. Для твердых семян (физический тип покоя) рекомендуются различные методы химической и термической обработки. Большой интерес представляет изучение действия ультразвука, токов высокой частоты и других физических методов воздействия. Успех тех или иных воздействий во многом зависит не только от типа покоя, но и от видовой специфики семян, времени, а также температурных и других условий обработки и проращивания.

Во всех случаях ускоренного проращивания покоящихся семян важно проследить способность сеянцев к дальнейшему росту при определенных температурных, световых и других условиях.

При проведении опыта отсчитывают подряд 4 пробы по 100 семян. Для определения всхожести крупносеменных культур берут 4 пробы по 50 шт. в каждой.

Проращивание целесообразно проводить в чашках Петри, которые дезинфицируют этиловым спиртом. При отсутствии спирта посуду

можно кипятить в воде. На проращиваемых семенах может появиться плесень, в таких случаях их перекладывают на чистое ложе. В чашках Петри в качестве ложа применяют вату и белую фильтровальную бумагу, которые опускают в воду, затем вынимают и дают стечь избытку воды. Правильность увлажнения ложа имеет большое значение: излишек воды задерживает при проращивании доступ воздуха к семенам, недостаточное увлажнение вызывает пересыхание ложа, что ведет к искажению результатов опыта.

В журнале по изучению биологии семян перед посевом записывают дату сбора семян и их происхождение. На ложе чашки Петри кладут этикетку с указанием номера варианта и повторения.

Семена раскладывают (высевают) на ложе чашки Петри равномерно на расстоянии не менее 0,5 - 1,5 см одно от другого в зависимости от крупности. Такое расположение необходимо для предотвращения распространения инфекции и для правильной оценки основных частей ростка.

Круглосуточное проращивание семян на свету ведут в специальных световых термостатах или в обычных термостатах при открытой наружной и закрытой стеклянной дверцах. При отсутствии специальных аппаратов чаще всего пользуются обыкновенным термостатом, поставив его лицевой стороной к свету. Для равномерного освещения семян в термостате снимают часть полок.

Варианты условий при определении всхожести семян являются следующими. Условия освещения: свет (дневной), темнота (в термостате или в черной бумаге). Температурные режимы проращивания – постоянные температуры: 5, 10, 20, 25, 30°C; переменные температуры: 6 часов при повышенной и 18 часов при пониженной температуре, режимы: 10 – 20; 10 – 30 и 20 – 30°C.

Условия опыта: температурный режим - 8 вариантов. Световой режим - 2 варианта. Повторность (1 чашка - 50 - 100 семян ) - 4-кратная. Для закладки опыта необходимо иметь 32-64 чашки Петри; 100-200 г ваты (3 г на чашку); термостат с терморегулятором; холодильник; 3200 семян для крупносемянных видов; для мелкосемянных видов 6400 шт.

При проведении опытов рекомендуется не допускать подсыхания и переувлажнения ложа в чашках Петри. Для этого к параллельным пробам добавляют одинаковое количество воды, при избытке воды в

чашках ее сливают. Необходимо также соблюдать установленный температурный режим и проверять температуру не менее 3 раз в день. При проращивании семян в условиях переменной температуры необходимо следить, чтобы перемена температур проходила резко, в течение короткого промежутка времени. Для притока к семенам свежего воздуха необходимо ежедневно приоткрывать на 1-2 мин чашки Петри, в которых проращивают семена. Термостат следует дезинфицировать не реже одного раза в декаду спиртом или раствором марганцовокислого калия.

Учет всхожести семян проводят при ежедневном осмотре чашек Петри, удаляя все нормально и ненормально проросшие семена; в конце опыта отмечают твердые (ненабухшие) семена, их число отдельно заносят в журнал по изучению биологии прорастания семян (образец бланка приведён в табл. 20).

К нормально проросшим семенам (всхожим) относят семена, имеющие нормально развитый корешок размером не менее длины семени, а у семян круглой формы - не менее диаметра семени.

К ненормально проросшим семенам относят семена, имеющие следующие дефекты: уродливые ростки и корешки, ростки без корешков, нитевидные и водянистые корешки без волосков, корешки со вздутиями и ко времени определения всхожести не развившие дополнительных корешков, корешки или ростки с трещинами и перехватами, достигающими проводящих тканей, ненормально увеличенные семядоли и укороченные корешки.

К невсхожим семенам относят набухшие семена, которые к моменту окончательного определения всхожести не проросли, но имеют здоровый вид и при надавливании пинцетом не раздавливаются; загнившие семена с мягким разложившимся эндоспермом, загнившим зародышем, с частично или полностью загнившими корешками; твердые семена, которые к установленному методикой сроку определения всхожести остаются не набухшими или не изменяют первоначального внешнего вида.

Период проращивания для определения всхожести для разных видов различен. Для одних достаточно одной недели, чтобы проросли все способные прорасти семена, для других необходимы месяцы. В

Таблица 20

## Образец бланка по изучению биологии прорастания семян

№ чашки	Видовое название	№ ЦП	Дата сбора семян	Дата закладки	Условия опыта		№ повторности	Динамика прорастания семян (дата/к-во проросших семян)				Количество семян, шт.				
					наличие света	температура, °C						загнивших	заплесневевших	уродливо проросших	Нормально проросших	твёрдых
1					свет	5	1									
2							2									
3							3									
4							4									
5						10	1									
6							2									
7							3									
8							4									
9						20	1									
10							2									
11							3									
12							4									
13						25	1									
14							2									
15							3									
16							4									
17						30	1									
18							2									
19							3									
20							4									
21						10-20	1									
22							2									
23							3									
24							4									
25						10-30	1									
26							2									
27							3									

28						4											
29						20-30	1										
30							2										
31							3										
32							4										
33						Тем-	5	1									
34						но-		2									
35						та		3									
36								4									
37							10	1									
38								2									
39								3									
40								4									
41							20	1									
42								2									
43								3									
44								4									
45							25	1									
46								2									
47								3									
48								4									
49							30	1									
50								2									
51								3									
52								4									
53							10-20	1									
54								2									
55								3									
56								4									
57							10-30	1									
58								2									
59								3									
60								4									
61							20-30	1									
62								2									
63								3									
64								4									



большинстве случаев опыты по определению всхожести продолжаются в течение одного месяца.

Статистическая обработка данных, полученных в опыте, включает нахождение средней арифметической, дисперсии, ошибки средней и коэффициента вариации.

У некоторых видов растений требуется нарушение покоя семян, которое можно выполнить следующими несколькими способами.

Стратификация семян. 1) Если семян много или они крупные. Речной песок, промытый и прокаленный (при температуре 150 – 200°C в течение 2-3 ч), увлажняют до 60 - 70% от полной влагоемкости (150 см<sup>3</sup> воды на 1 кг крупнозернистого песка) и тщательно перемешивают с семенами или переслаивают семена песком. На 1 объемную часть семян берут 3 части песка. Вместо песка можно использовать торф (при том же соотношении), который лучше пропускает воздух, что ускоряет процесс. Смесь семян с песком для стратификации в мешочках или ящиках помещают в прохладное место с температурой 5°C (в холодильник, под снег). Через каждые 20 - 30 дней смесь высыпают и перемешивают, увлажняют и продолжают сохранять при пониженной температуре до начала прорастания семян. Чтобы ускорить прорастание, смесь после стратификации выдерживают при температуре 14 - 19°C. Если необходимо замедлить процесс прорастания семян, смесь помещают на холод.

2) Если семян мало либо они очень мелкие, то их сразу закладывают в чашки Петри для проращивания в нескольких повторностях и помещают в холодильник.

Необходимый период стратификации и температуру охлаждения определяют путем эксперимента для каждого вида растений. Для этого из стратифицированной партии семян через каждые две недели берут 4 пробы по 100 семян и проращивают при оптимальном для данного вида режиме.

Скарификация семян. Для нарушения влагонепроницаемости семенной оболочки у твердых семян применяют разные способы: надрезание, нанесение царапин напильником, осторожное растирание в ступе с песком, помещение семян в концентрированную серную кислоту (от 20 мин до 4 ч в зависимости от вида растения). После обработки кислотой семена тщательно промывают водой. Семена

можно обрабатывать водой, доведенной до кипения (90 - 95°C). Обработку проводят мгновенно трехкратным погружением марлевых мешочков с семенами в кипяток, а затем в холодную воду.

Определение всхожести скарифицированных семян проводят по общей методике.

Намачивание и промывание семян водой. Если на процесс прорастания оказывают тормозящее действие вещества, находящиеся в семенах, их можно удалить промыванием семян (в мешочках из марли) на ситах в проточной воде в течение 1-2 сут.

Сроки лабораторной всхожести проверяют ежегодно, желательно в весенний период (время естественного прорастания в природе). Одновременно производят посев семян в грунт для определения полевой всхожести. Температурный и световой режимы оптимальные, повторность (1 чашка Петри) 4-кратная, количество семян в одном повторении 50 – 100.

**Энергия прорастания** – выраженное в процентах число проросших семян на определенный, условно принятый день. Практическое значение сведений по энергии прорастания сводится к тому, что они позволяют значительно раньше, чем при подсчете окончательной всхожести ориентировочно судить о качестве семян.

При низкой энергии прорастания появление всходов в полевых условиях растягивается на более продолжительное время, что увеличивает угрозу гибели проростков. При дружном прорастании ростки лучше преодолевают сопротивление слоя почвы, покрывающего семена.

Срок учета энергии прорастания определяется усредненным минимальным количеством дней, в течение которых прорастает максимальное количество семян, взятых в опыт.

Для видов растений, давно введенных в культуру, сведения о сроке учета энергии прорастания можно найти в справочниках. Но таких видов немного. Для большинства видов сроки необходимо определять самостоятельно. Для этого удобно пользоваться графическим изображением кривой прорастания семян. Вначале эта кривая поднимается круто вверх, затем изгибается и выходит на плато. Период от начала прорастания семян до резкого перегиба кривой и является сроком учета энергии прорастания.

#### **6.4.2. Длительность сохранения жизнеспособности семян**

Важно установить срок сохранения семенами жизнеспособности. Для этого на практике обычно проращивают семена разных лет урожая, хранившиеся в течение ряда лет, изучая их энергию прорастания и всхожесть при оптимальных для данного вида условиях. Определяют, через какой период времени семена, хранившиеся в определенных условиях, полностью теряют всхожесть. Отрезок времени от сбора урожая семян до потери ими всхожести условно считают сроком сохранения семенами жизнеспособности.

Первостепенное значение имеет изучение сохранения жизнеспособности и всхожести семян при различных строго контролируемых условиях (температура, влажность, газовый состав, предварительное подсушивание семян и т.д.). Одним из лучших методов хранения семян является метод хранения в герметических условиях при минимальной влажности и температуре.

**Жизнеспособность семян** подразумевает не фактическую всхожесть, а потенциальную способность семени к прорастанию, жизненность заключающегося в нем зародыша. В этом смысле всхожесть не всегда совпадает с понятием жизнеспособности семян. Например, твердые семена клевера с хорошо сохранившимся зародышем будут считаться жизнеспособными, но при учете всхожести обычными способами в число всхожих семян не попадут, поскольку останутся не набухшими.

Для быстрого определения жизнеспособности покоящихся семян используют взрезывание с визуальной оценкой состояния семян и то же, но с последующим окрашиванием; проращивание изолированных зародышей на свету; проращивание семян и зародышей, обработанных гиббереллином, кинетином и т.д.

Метод Нелюбова служит для установления жизнеспособности семян (Каменский, 1935). Этот метод состоит в следующем: подвергаемые исследованию семена намачиваются в воде в течение срока от 2 до 18 час, в зависимости от вида растений и температуры воды. При помощи скальпеля, копейца и пинцета у семян выделяется целиком или лишь обнажается зародыш, который подвергается затем

окрашиванию в водном растворе индигокармина, имеющем концентрацию  $2:1000=0,2\%$  по весу, при помощи погружения выделенного зародыша или семян с обнаженным зародышем в такой раствор на 2-3 часа при температуре 30 °С. Затем семена вынимают из раствора, промывают водой и внимательно рассматривают. Зародыши, способные к прорастанию, при этом вовсе не окрашиваются, зародыши мертвые окрашиваются целиком в синий цвет, а слабые зародыши окрашиваются лишь частично.

### ***6.5. Зараженность семян вредителями и болезнями***

Семена древесных и травянистых растений повреждаются вредителями и болезнями. Видовое разнообразие их сильно варьирует в различных эколого-географических районах. Для выявления видового состава вредителей и возбудителей болезней в первую очередь выбирают модельные плодоносящие растения, и все последующие наблюдения за состоянием урожая проводятся на них не менее трех лет. Выбирают по 3-5 моделей для участков разных экспозиций, почвенных разностей и видового состава, это дает возможность судить о влиянии среды на биологию вредителя или возбудителя заболеваний. Для установления видового состава и степени повреждения урожая с каждого модельного растения на протяжении вегетационного сезона один раз в 10 дней после завязывания плодов (или шишек) снимают определенное (в зависимости от урожая) количество плодов (шишек), которые вначале осматривают визуально, а затем часть их изучают более детально, взрезывая скальпелем и просматривая содержимое под лупой или биноклем.

Часть собранных плодов, оставшуюся не взрезанной, помещают в энтомологические садки (стеклянные банки, сетчатые садки, чашки Петри, полиэтиленовые мешочки и пр.) для последующего выведения взрослых фаз вредителей и для наблюдения за их биологией и фенологией.

Для наблюдения за состоянием семян однолетних травянистых растений предлагаемая методика должна быть несколько видоизменена в зависимости от вида растения.

Весь полученный материал по насекомым и клещам фиксируют либо в 70%-ном спирте, либо умерщвляя эфиром и затем укладывают в коллекционные коробки для последующей обработки. Из каждой партии собранных плодов и шишек берут часть для установления имеющихся на них возбудителей грибковых заболеваний.

#### **6.6. Оценка зараженности посевного материала фитопатогенными бактериями**

Зараженность семян исходного посевного материала фитопатогенными бактериями устанавливают путем фитопатологической экспертизы. Для этого используется биологический метод, основанный на стимуляции развития бактерий в зараженных семенах при оптимальных условиях температуры и влажности, он обеспечивает определение скрытой зараженности семян и степени пораженности образца.

От каждого образца отсчитывают по 100 семян, поверхность их дезинфицируют 1% раствором  $\text{KMnO}_4$  в течение 10-15 минут, чтобы уничтожить плесневые грибы и повысить энергию прорастания. Затем семена промывают несколько раз в стерильной воде и фламбированным над пламенем пинцетом раскладывают в стерильные чашки Петри, дно которых предварительно выстилают тонким слоем стерильной ваты или марли и накрывают кружком стерильной фильтровальной бумаги; все это смачивают стерильной или хорошо прокипяченной водой. Семена в чашках раскладывают на расстоянии 1 см друг от друга.

Во влажной камере семена выдерживают не менее 10 дней при комнатной температуре. Незараженные семена дают здоровые проростки, а зараженные бактериями набухают, потом становятся мягкими, загнивают или на поверхности их обильно выступает бактериальный экссудат в виде капелек мутной жидкости или вязкой слизи. Некоторые зараженные семена дают ростки, но через 3-5 дней они становятся в той или иной степени стекловидными вследствие развившихся в их тканях бактерий, а потом загнивают. Держать семена во влажной камере следует не более 10 дней, так как накопившаяся бактериальная инфекция в чашке с больных семян переходит на

здоровые проростки, вызывает заболевания их и нивелирует истинную картину зараженности.

По истечении 10 дней (а если температура в лаборатории 26 - 28°C, то достаточно 5-7 дней; при 30°C - 3-4 дня) следует провести учет степени зараженности. Семена со здоровыми проростками и твердые семена (не наклюнувшиеся) относят в группу не зараженных. Семена наклюнувшиеся и загнившие, а также с больными ростками, относят в группу зараженных. Зараженность семян образца (%) устанавливают путем деления количества зараженных на количество, заложенное на анализ, и умножают на 100. Все анализы делают в 3-5 повторностях и выводят средний процент здоровых и больных семян в образце.

Степень зараженности семян бактериями почти всегда находится в полном соответствии со степенью полевой устойчивости видов и образцов из разных ценопопуляций.

#### **Шкала для характеристики зараженности бактериями семян в баллах:**

- 1 - образцы, в которых здоровых семян от 90 до 100% (устойчивые);
- 3 – образцы, в которых здоровых семян от 70 до 90% (относительно устойчивые);
- 5 - образцы, в которых здоровых семян от 50 до 70% (средне поражаемые);
- 7 – образцы, в которых здоровых семян от 30 до 50% (сильно поражаемые);
- 9 - образцы, в которых здоровых семян только до 30% (очень сильно поражаемые).

#### **6.7. Оценка зараженности посевного материала фитопатогенными грибами**

Патогенные грибы сохраняют свою жизнедеятельность в семенах, богатых белками, углеводами и минеральными веществами. Поэтому с зараженным посевным материалом могут заноситься в почву многие вредоносные болезни. Сапрофитными грибами может быть вызвано плесневение семян, что приводит к их гибели.

Видовой состав грибов на семенах определяют на основании фитопатологического анализа. Основными методами анализа семян на грибную инфекцию являются: обмывка семян водой для установления наружной инфекции и высев на питательные агаровые среды для установления глубинной инфекции (биологический метод).

Метод обмывки семян используют при поверхностном загрязнении семян спорами грибов. Для этого семена помещают в пробирку, заливают водой, тщательно встряхивают (5-7 мин.), жидкость отливают в другую пробирку и после оседания спор часть светлой жидкости сливают, а осадок исследуют под микроскопом. По обнаруженным спорам определяют вид гриба.

Скрытую зараженность семян определяют биологическим методом с использованием влажных камер или агаровых питательных сред. Влажную камеру готовят следующим образом: в стерильные чашки Петри помещают тонкий слой стерильной ваты, сверху покрывают простерилизованными кружками фильтровальной бумаги, смачивают стерильной или охлажденной кипяченой водой. В каждую чашку раскладывают семена на расстоянии 1 см друг от друга. Анализируемые семена дезинфицируют в растворе сулемы (1: 1000) в течение 1-1.5 мин, в 1% растворе  $\text{KMnO}_4$  (7-10 мин); или в растворе стрептомицина (0.5 г на 100 см<sup>3</sup> воды) в течение 1 мин. После дезинфекции семена промывают три раза в стерильной воде.

Для анализа берут 100-200 шт. семян. Через 4-7 дней (при температуре 22-25°C) на зараженных семенах появляется мицелий или плодоношение гриба, которое определяется микроскопическим просмотром.

Агаровые питательные среды применяют для определения глубинной инфекции семян. Перед закладкой на питательную среду семена дезинфицируют для уничтожения поверхностной сапрофитной инфекции. В стерильных условиях (в боксе) на дно стерильных чашек Петри разливают агаровую питательную среду (картофельный подкисленный агар, сусло-агар и другие среды). На каждую чашку Петри расходуют питательной среды 2/3 объема пробирки. После затвердения агара семена раскладывают пинцетом, который периодически фламбируют над пламенем спиртовки.

Чашки Петри с анализируемыми семенами содержат при комнатной температуре (22-24°). Через несколько дней микроорганизмы из зараженных семян переходят на питательный субстрат в виде колоний грибницы. Сапрофитная микрофлора вскоре образует спороношение, в этой фазе ведут ее определение. Грибы рода фузариум необходимо пересевать в пробирки на сусло-агар. Далее выявленные в чистую культуру грибы определяют до вида.

## **7. Молекулярно-генетические методы выявления полиморфизма в популяциях**

### **7.1. Фрагментарный анализ ДНК растений**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – очень мощный метод размножения ДНК вне организмов (*in vitro*). С момента его открытия в 1983 году и по настоящее время этот метод используется практически во всех молекулярно-биологических лабораториях. Исходным материалом для ПЦР является ДНК в объеме нанограмм. Из одного определённого фрагмента ДНК с помощью ПЦР за несколько часов можно получить много миллионов копий, которые могут быть визуализированы в электрофорезном геле. Открытие фермента *Taq*-полимеразы, выделенной из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, позволило автоматизировать ПЦР в термоциклерах или амплификаторах (Клонирование..., 1988).

Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, повторяющихся 30-40 циклов:

1. Денатурация матрицы ДНК при 94°C в течение 30-40 сек.
2. Отжиг праймеров; в зависимости от длины и состава праймеров при 37-65°C в течение 20-60 сек. (чем длиннее праймер, тем выше температура связывания).
3. Синтез (достраивание) цепей ДНК при 72°C (оптимальная температура для *Taq*-полимеразы) – 1-2 минуты.

В настоящее время наиболее распространёнными и доступными методами выявления генетического полиморфизма, описания популяционно-генетической структуры популяций и установления филогенетических связей между растениями являются RAPD (random amplified polymorphic DNA – случайно амплифицированный



полиморфизм ДНК) и ISSR (inter-simple sequence repeats – межмикросателлитные повторы последовательностей), базирующиеся на анонимном полиморфизме ДНК, и методы изучения последовательностей фрагментов (ДНК-секвенирование).

#### Требования к лаборатории ПЦР-анализа

Лаборатория должна быть разделена на зоны (комнаты) для каждой из стадий ПЦР. Следует иметь не менее двух комнат:

а) Пре-ПЦР-помещение, где проводится обработка образцов – выделение ДНК, приготовление реакционной смеси для ПЦР и постановка ПЦР (при наличии условий два последних этапа рекомендуется также проводить в дополнительном помещении); в этих помещениях запрещается проводить другие виды работ с гербарием и растительными образцами для исключения дополнительного пылевого загрязнения.

б) Пост-ПЦР-помещение, где проводится детекция продуктов амплификации; в пост-ПЦР-помещении допускается использовать другие методы исследования, которые проводятся в данной лаборатории.

В крайнем случае, возможно использование общего помещения с разделением во времени процессов выделения ДНК, амплификации, проведения электрофореза и промежуточной обработкой лабораторного оборудования инактивирующими ДНК растворами (например, 1 М раствор HCl) и УФ-облучением.

Работа в лаборатории должна быть организована в одном направлении: от пре-ПЦР-помещения к пост-ПЦР-помещению. Каждое помещение лаборатории должно иметь свой набор реагентов, автоматических пипеток, наконечников, пластиковой и стеклянной посуды, лабораторного оборудования, халатов и перчаток, используемых только в данном помещении и выносящихся в другие ПЦР-помещения. Оборудование, материалы и инвентарь в каждой комнате должны иметь соответствующую маркировку.

Необходимо однократно использовать пробирки и наконечники для автоматических пипеток и обязательно менять наконечники при переходе от одной пробы к другой, с целью предотвращения

перекрёстной контаминации при выделении ДНК, или при раскапывании реакционной смеси.

Рабочие поверхности, оборудование и материалы следует облучать ультрафиолетом с максимумом излучения в области 260 нм. Облучение необходимо проводить в течение 1 часа до начала работы и в течение 1 часа после окончания работы. Использованные наконечники, пробирки и другие загрязнённые ДНК материалы необходимо обрабатывать реагентами, вызывающими деградацию ДНК (1 М HCl, 10% гипохлоридом натрия или 10% хлорной известью).

### **7.1.1. Выделение ДНК из растительных тканей**

Экстракция ДНК из растений – исходная точка для молекулярно-генетического анализа. Для большинства видов растений возможно долгосрочное хранение в засушенном виде, в состоянии, пригодном для дальнейшей экстракции ДНК. Самый простой подход – поместить лист растения в бумажный пакет и высушить в тени в мягких условиях (не допуская принудительного нагрева). Возможен сбор живых листьев в отдельные бумажные пакетики, с дальнейшей сушкой силикагелем в большем, герметично закрывающемся полиэтиленовом пакете. Условия сушки, при которых получают лучшие гербарные образцы, также подходят для наилучшей консервации ДНК непосредственно в растении.

При наличии достаточных финансовых средств для научной работы рекомендуется использовать специальные наборы или «киты» для выделения ДНК (в англ. kit – комплект). Использование наборов позволяет очень быстро получить (в течение часа) чистую ДНК, и что очень важно – примерно одинаковой концентрации от пробы к пробе, готовую к дальнейшему использованию. Большинство современных наборов для выделения ДНК работают на основе гель-силикатных фильтров, которые встроены в специальные пробирки-колодки.

Ниже приведены наиболее популярные коммерческие киты:

NucleoSpin® Plant II Kit – фирма Macherey-Nagel, [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)

PowerPlant® Pro DNA Isolation Kit – фирма MO BIO laboratories, [www.mobio.com](http://www.mobio.com)

Набор реагентов ФитоСорб – фирма Синтол, [www.syntol.ru](http://www.syntol.ru)

Тем не менее, существует большое количество методов экстракции ДНК, достаточно дешёвых и дающих хороший выход ДНК, но более трудоёмких. Приведём лишь некоторые из них.

Стандартный СТАВ метод выделения ДНК (Doyle and Doyle, 1987)

СТАВ/ЦТАБ лизирующий буфер (на 500 мл):

- 2% СТАВ/ЦТАБ (10.0 г)
- 1.4 М NaCl (40.91 г)
- 20 мМ ЭДТА (3.7 г)
- 100 мМ трис-HCl (6.07 г)
- добавить дистиллированную воду до конечного объёма 500 мл. pH довести до 8 с помощью HCl.

Для каждого образца подготовить 4 стерильных 1.5 мл пробирки, подписать и поставить в ряд друг за другом в штатив для пробирок. Подготовить СТАВ-буфер, очистительный раствор (24 части хлороформа и 1 часть изоамилового спирта), изопропанол, 70% раствор этанола и автоклавированные пестики-измельчители.

1. Примерно 2 см<sup>2</sup> листьев положить в 1.5 мл пробирку (можно положить лист на пробирку и надавливанием крышки вырезать два-три круга).
2. Добавить 400 мкл СТАВ-буфера и быстро, в течение 30 сек. измельчить, с помощью пестика-измельчителя.
3. Добавить 10 мкл РНКазы и 5 сек. встряхнуть на встряхивателе.
4. Инкубировать 60-80 мин при 65°C на водяной бане или сухом нагревателе, периодически аккуратно взбалтывая.
5. Добавить 400 мкл очистительного раствора хлороформ-изоамиловый спирт.
6. Центрифугировать 1 мин при максимальной скорости (13000 об./мин).
7. Осторожно пипеткой отобрать верхнюю фазу (стараясь не взбалтывать промежуточную плёнку-осадок) и перенести в новую пробирку.
8. Повторить пункты 5-7.
9. Добавить 350 мл холодного изопропанола и тщательно перемешать растворы переворачиванием.
10. Центрифугировать 10 мин при 13000 об./мин.

11. Изопропанол аккуратно слить и осаждённую ДНК прополоскать в 70% спирте.
12. Центрифугировать 5 мин при 13000 об./мин.
13. Спирт слить и ДНК оставить в открытой пробирке для высыхания (обычно достаточно около часа; важно чтобы остатки спирта испарились).
14. Высохшую ДНК растворить в дистиллированной воде или для долгого хранения лучше растворить в ТЕ-буфере (10 mM трис-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 8.0).

#### SDS-метод быстрого выделения ДНК из свежих листьев

Экстракционный SDS-буфер (на 100 мл):

- 200 mM трис-HCl pH 7.5 (20 мл 1M)
  - 250 mM NaCl (12 мл 1M)
  - 25 mM ЭДТА (5 мл 0.1 M)
  - 0.5% SDS (СДС – додецилсульфата натрия)
  - довести дистиллированной водой объём раствора до 100 мл.
- (1M раствор – 0.1 молекулярного веса вещества в граммах растворить в 100 мл)

1. Примерно 2 см<sup>2</sup> листьев положить в 1.5 мл пробирку (можно положить лист на пробирку и надавливанием крышки вырезать два-три круга).
2. Добавить 400 мкл экстракционного буфера и быстро, в течение 30 сек. измельчить, с помощью пестика-измельчителя.
3. Добавить 10 мкл РНКазы и 5 сек. встряхнуть на встряхивателе.
4. Инкубировать 15 мин при 65°C на водяной бане или сухом нагревателе, периодически аккуратно взбалтывая.
5. Добавить 200 мкл 5M ацетата калия, слегка взболтать, но не встряхивать.
6. На 10 мин поставить в ледяную воду.
7. Центрифугировать 15 мин при максимальной скорости (13000 об./мин).
8. 500 мкл верхней фазы перенести в новую пробирку, не задевая осадок.

9. Добавить 400 мкл очистительного раствора хороформ-изоамиловый спирт (24 части хлороформа и 1 часть изоамилового спирта).
10. Центрифугировать 1 мин при 13000 об./мин.
11. Осторожно пипеткой отобрать верхнюю фазу, стараясь не задевать промежуточную плёнку-осадок, и перенести в новую пробирку.
12. Повторить пункты 9-11.
13. Добавить 500 мкл изопропанола и тщательно перемешать растворы переворачиванием.
14. Центрифугировать 10 мин при 13000 об./мин.
15. Изопропанол аккуратно слить и осаждённую ДНК прополоскать в 70% спирте.
16. Центрифугировать 5 мин при 13000 об./мин.
17. Спирт слить и ДНК оставить в открытой пробирке для высыхания (обычно достаточно около часа; важно чтобы остатки спирта испарились).
18. Высохшую ДНК растворить в дистиллированной воде или для долгого хранения лучше растворить в ТЕ-буфере (10 mM трис-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 8.0).

Метод выделения большого количества ДНК из свежих листьев (Фризен, 2007)

Лизис-буфер (на 1 л):

- 8 M Мочевина (480.48 г)
- 0.35 M NaCl (350 мл 1M)
- 0.05 M трис-HCl (pH=7.5) (50 мл 1M)
- 0.02M ЭДТА (40 мл 0.1 M)
- добавить дистиллированной воды до 1 литра

1. 3 г листьев заморозить жидким азотом и растереть в фарфоровой ступке (при отсутствии жидкого азота возможно прямое перетирание листьев в лизис-буфере с добавлением кварцевого песка).
2. Добавить 15-20 мл лизис-буфера.
3. Хорошо протереть и размешать, добавить 1 мл фенола и 0.5 мл 20% СДС (SDS).

4. Оставить нагреваться до комнатной температуры (15-25 мин.) и потом перенести с помощью пипетки в 50 мл пробирку.
5. Добавить 1 объём раствора фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (75% фенол; 24% хлороформ; 1% изоамиловый спирт). Тщательно перемешать и 10 мин центрифугировать при 4000 об./мин.
6. Верхнюю фазу снять, перенести в другую пробирку и опять развести с 1 объёмом раствора фенол-хлороформ-изоамиловый спирт.
7. Тщательно перемешать и 10 мин центрифугировать при 4000 об./мин.
8. Верхнюю фазу снять, перенести в другую пробирку и добавить 1/20 объёма 3М ацетата натрия и два объёма 96% этилового спирта.
9. Аккуратно перемешивать до тех пор, пока вся ДНК не скрутится в «медузу» (рис. 16).
10. Переложить ДНК стеклянной палочкой в чистую пробирку, промыть в 70% этаноле (около 5 мл). Спирт слить и ДНК оставить в пробирке для просыхания (обычно достаточно около часа; важно чтобы остатки спирта испарились).
11. Высохшую ДНК растворить в ТЕ-буфере.



Рис. 16. Осаждённая ДНК (По: Куцев, 2009)

Важной промежуточной стадией анализа является измерение концентрации выделенной ДНК и анализ качества её очистки. Для определения концентрации ДНК в растворе широко используется в основном 3 метода: спектрофотометрический, флуориметрический и электрофорез в агарозном геле. Наиболее чувствительным является флуориметрический метод. Протоколы определения концентрации ДНК обычно поставляются вместе с флуориметром и набором реагентов к нему, при этом они сильно различаются в зависимости от фирмы-производителя и в данном пособии не рассматриваются.

Достаточно точным и быстрым является спектрофотометрический метод, однако он обладает сравнительно малой чувствительностью. В последнее же время появился ряд моделей бесцветных спектрофотометров, измеряющих концентрацию ДНК и других компонентов в объёмах нескольких микролитров. По показателям точности они практически не уступают флуориметрам, не требуют предварительной подготовки образцов и производят измерение в автоматическом режиме. Следует ожидать, что в ближайшее время метод спектрофотометрии останется единственным широко используемым при проведении обычных молекулярно-генетических исследований.

#### Измерение концентрации ДНК с помощью спектрофотометра

1. В кварцевую кювету внести 1 мл буфера, использованного для разведения ДНК, или воды.
2. Поместить кювету в УФ-спектрофотометр, снять показания оптической плотности (OD) при 325 нм и установить «0». Извлечь кювету с калибровочной пробой и поставить кювету, содержащую ДНК, снять показания.
3. Повторить этапы для 280, 260 и 230 нм. Важно, чтобы ДНК была растворена в том же самом растворе, что и в калибровочной пробе.
4. Оценить чистоту выделенной ДНК (соотношение оптической плотности 260/280 нм должно составлять 1.7-2.0; если это значение ниже, провести дополнительную очистку или перевыделить ДНК).
5. Определить концентрацию (C) ДНК по поглощению при 260 нм, используя следующее соотношение:

$$C \text{ (мкг/мл)} = OD/0.02$$

#### **7.1.2. Постановка реакции амплификации**

Основными элементами реакционной смеси при постановке реакции амплификации являются:

- буферный раствор (10X-буфер), обеспечивающий необходимые условия реакции – pH, ионную силу раствора. Обычно поставляется фирмой-производителем совместно с *Taq*-полимеразой и его состав оптимизирован именно для данной полимеразы.

- один (RAPD, ISSR) или пара (ITS, хлоропластная ДНК) праймеров, комплементарных противоположным концам разных цепей определённого фрагмента или множеству фрагментов ДНК.

- термостабильная ДНК-полимераза – фермент для катализа полимеризации ДНК. В настоящее время производится огромное количество *Taq*-полимераз, различающихся по параметрам реакции и оптимальным составам ПЦР-смесей. Общим для них является то, что оптимальная температура полимеризации находится в пределах от +60 до +80°C и синтез цепи происходит при наличии короткой затравки (праймера) от 5' к 3' концу цепочки ДНК.

- дезоксинуклеозидтрифосфаты – dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Необходимы для построения новых цепочек ДНК. Важным является одинаковое процентное содержание всех четырёх нуклеозидов в составе ПЦР-смеси.

- ионы  $Mg^{2+}$ , необходимы для работы полимеразы. Ионы вводят в раствор в виде  $MgCl_2$  или  $MgSO_4$ . Удобно использовать 10-кратную концентрацию сток-раствора (по аналогии с 10X-буфером) – например, водный раствор с 25 мМ концентрацией  $MgCl_2$  – тогда объём  $MgCl_2$ , вносимый в реакционную смесь, будет равен объёму 10X-буфера. Возможно использование коммерческих 10X-буферов, уже содержащих в своём составе  $MgCl_2$ , что упрощает процедуру приготовления реакционной смеси.

- ДНК-матрица (геномная ДНК растения), которую необходимо проанализировать.

### **7.1.2.1. Молекулярные методы, базирующиеся на анонимном полиморфизме ДНК (RAPD, ISSR)**

#### **Протокол амплификации ДНК**

1. Для каждой пробы подготовить стерильные 0.5 мл или 0.2 мл ПЦР-пробирки (размер пробирки зависит от используемого амплификатора), подписать и поставить в ряд в штатив для пробирок. Поместить в подписанные пробирки по 2.5 мкл ДНК исследуемых образцов (предварительно ДНК разморозить, встряхнуть на вортексе и отцентрифугировать несколько секунд;



концентрация ДНК – 1-20 мкг/мл, но одинаковая во всех анализируемых образцах). Оставить при комнатной температуре.

2. Перед каждой постановкой амплификации проводится расчёт для приготовления реакционной смеси (англ. – Master-Mix) с помощью следующей таблицы (таблица заносится в лабораторный журнал):

Деионизованная H <sub>2</sub> O	10х буфер	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	dNTPs (20 mM)	Праймер (10 mM)	<i>Taq</i> (5 ед/мкл)
15.3 мкл × n	2.5 мкл × n	2.5 мкл × n	1 мкл × n	1 мкл × n	0.2 мкл × n

n – количество анализируемых образцов + 1 на каждые неполные 10 образцов (например, при количестве проб 15 шт. n = 17)

3. В отдельную 1.5 мл пробирку добавить последовательно все 6 компонентов, тщательно смешать на вортексе и центрифугировать короткое время, чтобы удалить пузырьки воздуха из смеси. *Taq*-полимеразы добавляется в последнюю очередь, при этом размораживать её не нужно. Поставить пробирку с реакционной смесью на лёд.
4. В каждую пробирку с ДНК добавить по 22.5 мкл реакционной смеси, встряхнуть на вортексе, отцентрифугировать несколько секунд, поставить в амплификатор и включить программу.

### Программы амплификации

Амплификация проводится в специальном приборе – термоциклере (амплификаторе), который производит нагрев и охлаждение ПЦР-смеси в соответствии с заданной программой. Как было указано ранее, каждый цикл амплификации включает 3 этапа: денатурацию ДНК, отжиг праймеров и достройка (элонгация) цепи. Для получения наилучших результатов температуру отжига необходимо подбирать эмпирически. При завышенной температуре отжига эффективность реакции будет неоправданно низкой, тогда как при заниженной могут образовываться неспецифические продукты амплификации. Для эффективной оптимизации температуры отжига следует использовать амплификатор с функцией градиента, при этом в

разных пробирках в одной программе ПЦР поддерживается разная температура с определённым шагом, что ускоряет процесс подбора оптимальных её значений по максимальному выходу продукта.

Далее приводятся программы амплификации, дающие удовлетворительный результат даже на простейших моделях амплификаторов Eppendorf, BioRad, Biometra.

#### *RAPD*

- 1 цикл: 95°C – 2 мин.;
- 35 циклов: 95°C – 30 сек., 34°C – 1 мин., 72°C – 2 мин.;
- 1 цикл: 72°C – 10 мин.;
- 4°C – длительное охлаждение.

#### *ISSR*

- 1 цикл: 95°C – 2 мин.;
- 35 циклов: 95°C – 30 сек., 44°C – 45 сек., 72°C – 1 мин. 30 сек.;
- 1 цикл: 72°C – 10 мин.;
- 4°C – длительное охлаждение.

### **7.1.2.2. Амплификация определённого фрагмента ДНК для последующего секвенирования**

#### Протокол амплификации ДНК

1. Для каждой пробы подготовить стерильные 0.5 мл или 0.2 мл ПЦР-пробирки (размер пробирки зависит от используемого амплификатора), подписать и поставить в ряд в штатив для пробирок. Поместить в подписанные пробирки по 2 мкл ДНК исследуемых образцов (предварительно ДНК разморозить, встряхнуть на вортексе и отцентрифугировать несколько секунд; концентрация ДНК – 1-20 мкг/мл). Оставить при комнатной температуре.
2. Перед каждой постановкой амплификации проводится расчёт для приготовления реакционной смеси с помощью следующей таблицы (таблица заносится в лабораторный журнал):

Деионизованная H <sub>2</sub> O	10х буфер	dNTPs (20 мМ)	Праймер 1 (10 мМ)	Праймер 2 (10 мМ)	Taq (5 ед/мкл)
20.8 мкл × n	3 мкл × n	2 мкл × n	1 мкл × n	1 мкл × n	0.2 мкл × n

n – количество анализируемых образцов + 1 (контрольная проба)

3. В отдельную 1.5 мл пробирку добавить все 5 компонентов, тщательно перемешать на вортексе и центрифугировать несколько секунд, чтобы удалить пузырьки воздуха из смеси. *Taq*-полимераза добавляется в последнюю очередь, при этом размораживать её не нужно. Поставить на лёд.
4. В каждую пробирку с ДНК добавить по 28 мкл реакционной смеси, встряхнуть на вортексе, отцентрифугировать несколько секунд, поставить в амплификатор и включить программу.

#### Программа амплификации

Программы часто различаются температурой на этапе отжига, поскольку связывание праймеров зависит от длины и состава используемых олигонуклеотидов. В изучении генома (ядерная ДНК) наиболее популярен анализ ITS-региона рибосомальной ДНК (ITS рДНК), в пластоме используется большой спектр генов и интронов. Например, программа ПЦР для амплификации ITS рДНК с праймерами ITS-A – ITS-26R выглядит следующим образом:

- 1 цикл: 95°C – 1 мин. 30 сек.;
- 30 циклов: 94°C – 20 сек., 55°C – 30 сек., 72°C – 3 мин.;
- 1 цикл: 72°C – 5 мин.;
- 4°C – длительное охлаждение.

Праймеры для амплификации ITS-региона и многих участков хлоропластного генома можно найти в Internet.

#### **7.1.3. Электрофорез в агарозном геле**

ДНК является полианионом и передвигается в электрическом поле к аноду (от «минуса» к «плюсу»). Эта особенность используется для разделения фрагментов ДНК различной длины при их передвижении в электрическом поле через молекулярное сито. Такое молекулярное сито создаётся на базе полиакриламида или агарозы. Фрагменты ДНК от 100 до 2000 пар нуклеотидов (п.н.) хорошо разделяются в агарозном геле. В полиакриламидных гелях чёткость разделения намного лучше, но и намного дороже, да и трудоёмкость выше.

Для расчёта состава геля необходимо знать площадь ванночки для заливки геля. Умножив длину на ширину получаем площадь в см<sup>2</sup>, умножив площадь на 0.5 (толщина геля в сантиметрах) получаем необходимый объём геля в миллилитрах. Например, при размере геля 20×20 см объём готовой агарозы должен быть  $20 \cdot 20 \cdot 0.5 = 200$  мл, соответственно, для приготовления 1.5% геля необходимо взять 3 г сухой агарозы. Предварительно необходимо взвесить агарозу и залить в стеклянной плоскодонной колбе рассчитанным объёмом 0.5-1.0X буфера (буфер может быть ТАЕ или ТБЕ, но обязательно тем же, в котором предполагается проводить электрофорез) и перемешать.

Колбу с агарозой поместить в микроволновую печь и довести до кипения. Расплавленную агарозу охладить до 50-60°C (колбу такой температуры можно держать рукой не обжигаясь) и залить в подготовленную форму для геля, предварительно установив на неё ограничивающие спейсеры, избегая образования пузырьков в геле. Сразу после этого устанавливаются гребёнки строго вертикально. Промежуток между зубцами и дном должен быть около 1 мм, чтобы гель не порвался.

Через 30-40 мин., когда гель сформируется, удалить гребёнки и спейсеры. Заливку проб в образовавшиеся карманы нужно проводить на горизонтальной тёмной поверхности (на тёмном фоне лучше видны стенки и дно карманов).

К 2 мкл буфера для нанесения (6X-буфера) добавить 10-13 мкл амплификата, тщательно перемешать пипетированием и нанести в лунки агарозного геля. Перемешивание проб можно производить на гидрофобной плёнке (типа Parafilm), или в ячейках иммуноферментных плашек с круглым дном, или внести 6X-буфер непосредственно в пробирки с амплификатом. Нанесение проб нужно производить справа налево, сначала в ближнюю дорожку, последовательно удаляясь (если используется гель с несколькими дорожками) (рис. 2). Буфер для нанесения (другие названия – 6X-буфер, Loading-буфер, Loading-Dye-Solution) содержит в своём составе глицерин и красители (чаще бромфеноловый синий и/или ксиленцианол), придающие ему насыщенную окраску. Бромфеноловый синий передвигается со скоростью, примерно равной фрагменту ДНК из 300 п.н.

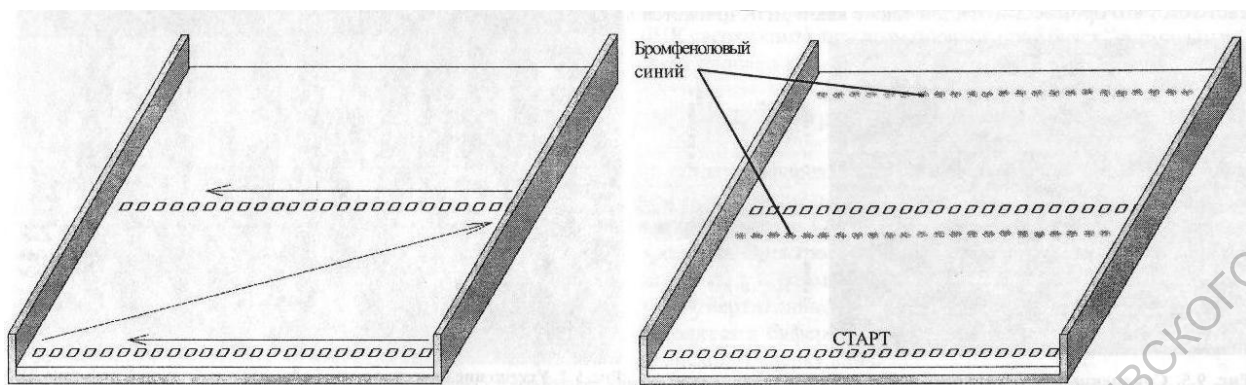


Рис. 17. Порядок нанесения проб в гель (слева) и окончание электрофореза в агарозном геле (справа) (По: Куцев, 2009)

В крайнюю лунку внести маркер молекулярной массы (DNA-Lieder), в составе которого присутствуют фрагменты различной длины с определённым шагом. После этого гель необходимо перенести в камеру для электрофореза, предварительно заполненную буфером ТБЕ или ТАЕ. Гель должен быть полностью покрыт буфером на 1-2 мм. Электрофорез проводят при напряжении, не превышающим 5 В на 1 см, до тех пор, пока краситель не дойдёт до отметки 1 см от края геля (рис. 17).

Для визуализации фрагментов амплифицированной ДНК гель помещают в водный раствор бромистого этидия (5 мг/л) и проводят окрашивание в течение 15-20 мин при периодическом покачивании. Если используется сток-раствор бромистого этидия, то необходимо взять 250 мкл на 1 л дистиллированной воды.

**Внимание! Бромистый этидий является канцерогеном, поэтому с его раствором и окрашенным гелем необходимо работать в перчатках.**

После окрашивания необходимо поместить гель на фильтр трансиллюминатора и просмотреть в проходящем УФ излучении через защитный экран и специальные защитные очки. Фрагменты амплифицированной ДНК после обработки бромистым этидием будут флюоресцировать оранжевым цветом. RAPD или ISSR-спектры фотографируют через оранжевый или красный светофильтр с помощью обычного цифрового фотоаппарата или специальной геле-документирующей системы. Полученные фотоснимки обрабатывают с помощью программного обеспечения для обработки изображений

(Paint, Adobe Photoshop и др.), повышая яркость, контраст, удаляя дефекты. Фотоотпечатки, выполненные на принтере, должны быть подписаны и вклеены в лабораторный журнал. Фотоснимки принято размещать «стартом» вверх, при этом порядок проб будет «нормальным» - слева направо и сверху вниз (рис. 18).



(короткие фрагменты передвигаются быстрее, чем более длинные); б – образец оформления фотоснимка геля (М – маркёр молекулярного веса, пустая дорожка – отрицательный контроль, jun+gr, brev, amb – условные обозначения исследуемых объектов, UBC 810 – название праймера, с которым проходила амплификация)

При амплификации одного фрагмента ДНК для последующего секвенирования электрофорез используется для очистки ПЦР-продукта. При приготовлении агарозного геля в этом случае используется гребёнка с широкими и толстыми зубьями для пробных карманов, чтобы в полученный карман поместился весь амплификат. Смесь разгоняют в 0.8% агарозном геле с последующим вырезанием одного единственного фрагмента из геля и выделяют с помощью специальных коммерческих наборов, большинство из которых работает на основе гель-силикатных фильтров, встроенных в специальные пробирки-колонки. При отсутствии специальных наборов возможно использование прямого осаждения ДНК для очистки от праймеров и других компонентов ПЦР-реакции.

#### Бромистого этидия раствор, 10 мг/мл

Растворить 1 г бромистого этидия в 100 мл воды (сток-раствор). Для визуализации ДНК в агарозном геле используется раствор в

концентрации 2.5 мкг/мл, т.е. для приготовления 1 л рабочего раствора необходимо взять 1 л воды и 250 мкл сток-раствора. **Внимание! Все манипуляции с бромистым этидием и его растворами проводить в перчатках.**

Буфер для нанесения образца

0.25% бромфеноловый синий; 0.25% ксиленцианол; 30% глицерин; 10 мМ трис-HCl; 1 мМ ЭДТА. Для приготовления 10 г буфера требуется: 2.5 мг бромфенолового синего; 2.5 мг ксиленцианола; 3 г глицерина; 0.1 мл 1М трис-HCl; 20 мкл 0.5 М ЭДТА pH 8.

50X ТАС (пятидесятикратный трис-ацетатный буфер)

Трис-HCl (242.2 г) и ЭДТА (37.2 г) взвесить и растворить в 500 мл дистиллированной воды, с помощью уксусной кислоты откалибровать значение pH до 8.0 и затем довести водой объем раствора до 1 л.

Приготовленный раствор хранится при комнатной температуре, если его профильтровать через 0.4 мкм фильтр (для стерилизации).

10X ТБЕ (Десятикратный трис-боратный буфер)

Трис-HCl – 107.8 г; ЭДТА – 37.2 г; борная кислота – 55 г.

Для приготовления 1 л буфера в 800 мл деионизованной воды растворяют трис-HCl, ЭДТА и немного меньше требуемого количества борной кислоты. После полного растворения компонентов доводят pH до 8.3 остатками борной кислоты. Затем доводят объем раствора до 1 л деионизованной водой. Приготовленный раствор устойчиво хранится при комнатной температуре, если его профильтровать через 0.4 мкм фильтр.

1X и 0.5X ТАС и ТБЕ (Рабочие растворы трис-боратного и трис-ацетатного буфера)

Для приготовления 1 л 1X ТБЕ разбавить 100 мл 10X ТБЕ 900 мл деионизованной воды. Для приготовления 1 л 0.5X ТБЕ растворить 50 мл 10X ТБЕ в 950 мл деионизованной воды.

Для приготовления 1 л 0.5X ТАС растворить 10 мл 50X ТАС в 990 мл деионизованной воды.

Протокол прямого переосаждения ДНК в мягких условиях (ЦКП «Геном» РАН)

Смесь  $\text{NH}_4\text{Ac}$  + EtOH (конечная концентрация ацетата аммония – 0,125 М, этанола – 70%):

Реактив	На 1 пробу (10 мкл)
Деионизованная вода	4.7 мкл
NH <sub>4</sub> Ac 5 M	1.5 мкл
EtOH 96%	43.8 мкл
<b>Всего:</b>	<b>50 мкл</b>

Примечание: смесь следует заранее достать из холодильника, чтобы она нагрелась до комнатной температуры.

Добавить по 50 мкл смеси ацетата аммония с этанолом на 10 мкл амплификата, перемешать на вортексе или переворачиванием. Осаждение проводить при комнатной температуре в течение 20 минут, затем центрифугировать при 14000 об./мин в течение 20 минут, удалить супернатант, осадок промыть 250-500 мкл 70% этанола комнатной температуры и высушить в термостате или вакуумной центрифуге. При осаждении ДНК из большего объёма ПЦР-смеси, количество этанола для промывки необходимо увеличить. Подсушенный осадок растворить в деионизованной воде, определить концентрацию и использовать аликвоту для сиквенсной реакции.

#### 7.1.4. Секвенирование амплифицированного фрагмента (проведение терминирующих реакций)

В настоящее время существует довольно большое количество методов секвенирования, большинство из которых подробно описаны в литературе (Чемерис и др., 1999). Мы коротко остановимся на методе Сэнгера и Коулсона (Sanger, Coulson, 1975; Sanger, Niclein, Coulson, 1977), чаще всего используемый для автоматического прочтения в ДНК-сексенаторах.

В 1977 году авторы «плюс-минус» метода предложили способ ферментативного сексенирования, получивший название метода терминирующих аналогов трифосфатов. В основе метода лежало ферментативное копирование с помощью фрагмента Кленова ДНК полимеразы I из *E. coli*. В качестве праймеров использовали синтетические олигонуклеотиды. Специфическую терминацию синтеза обеспечивали добавлением в реакционную смесь помимо четырёх типов dNTP (один из которых был радиоактивно мечен по альфа положению фосфата) ещё и одного из 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатов



(ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP), который не способен обеспечивать дальнейшее копирование из-за отсутствия 3'-ОН группы. Отношение концентраций dNTP/ddNTP авторы подбирали экспериментально, так, чтобы в итоге получить набор копий ДНК различной длины. Таким образом, для определения первичной структуры исследуемого фрагмента ДНК требовалось четыре реакции копирования: по одному типу терминаторов в каждой реакции. Полученные продукты терминирующих реакций разгоняли в полиакриламидном геле на соседних дорожках, и по расположению полос определяли последовательность нуклеотидов.

#### **7.1.4.1. Считывание последовательности**

Как и классический вариант Сэнгера, автоматическое секвенирование включает две стадии: проведение терминирующих реакций и разделение продуктов этих реакций с помощью элетрофореза. Как правило, автоматизирована лишь вторая стадия, т.е. разделение меченных фрагментов ДНК в ПААГ, получение спектра эмиссии флуорофоров и последующий обсчёт собранных данных. Таким образом, автоматическое секвенирование по сути отличается только типом используемой метки.

Флуоресцентную метку включают либо в праймер, либо в терминатор транскрипции согласно следующим схемам: меченный праймер (четыре разных красителя) и немеченные терминаторы; меченный праймер (один краситель) и немеченные терминаторы; меченные терминаторы (каждый тип терминатора своим красителем) и немеченный праймер. Использование меченых праймеров предполагает проведение четырёх независимых реакций (отдельно с каждым из терминаторов) для каждого секвенируемого образца. Использование меченых терминаторов позволяет совместить все четыре реакции в одной пробирке. Если используется один краситель, то разделение продуктов реакции в геле проводят на четырёх разных дорожках. Использование четырёх различных красителей позволяет разгонять продукты реакции на одной дорожке.

Конкретные протоколы терминирующих ПЦР-реакций прилагаются ко всем типам секвенаторов, поэтому здесь они обсуждаться не будут.

#### **7.1.4.2. Выравнивание**

При анализе нуклеотидных последовательностей в качестве отдельных признаков выступают отдельные нуклеотидные позиции. А поскольку принцип филогенетического анализа предполагает сравнение гомологичных признаков, то необходимо установить позиционную гомологию нуклеотидов в разных последовательностях. К этому и сводится следующий этап обработки данных после того, как определены последовательности ДНК.

Процесс выравнивания подразумевает выстраивание последовательностей наиболее близких к исследуемому объекту видов друг под другом с таким расчётом, чтобы они совпадали как можно более полно, тогда одни консервативные участки будут располагаться под другими.

Например, получив нуклеотидную последовательность интрона рибосомальной ДНК какого-нибудь растения, необходимо сравнить экспериментальные данные с уже известными выравненными последовательностями других растений.

Более вариабельные участки необходимо выравнивать до тех пор, пока идентичные нуклеотиды по вертикали не будут максимально соответствовать друг другу. При этом возможно включение пропусков, поскольку в некоторых последовательностях могут быть как делеции, так и вставки. Участки блока последовательностей, которые не могут быть достоверно выровнены, чаще всего исключаются из анализа, чтобы не приносить систематических ошибок. В настоящее время этот этап работы компьютеризирован, но, тем не менее, компьютерную версию часто необходимо корректировать вручную. Некоторые исследователи предпочитают с самого начала выравнивание «вручную», которое, с их точки зрения, более надёжное. Наиболее эффективен всё-таки смешанный метод: сначала компьютерная, затем ручная корректировка.

Имеется несколько способов оценки качества выравнивания последовательностей.

Коэффициент сходства Needleman & Wunsch (1970)

$$S = X - \sum_k w_k z_k$$

$X$  – число нуклеотидов в сравниваемых последовательностях,  $w_k$  – фактор для вставок/делеций длины  $k$  и  $z_k$  – число вставок/делеций длины  $k$ . Целью является нахождение такого выравнивания, где значение  $S$  будет максимальным.

#### Логарифмическая система

Исследования Gu & Li (1995) показали, что линейная gap-penalty-система слишком переоценивает длинные включения/делеции. Они предложили более подходящую систему:

$$W_k = a + b \ln(k)$$

Здесь gap opening penalty параметр ( $a$ ) имеет в сравнении с параметром gap extension ( $b$ ) больший вес, чем в линейной системе.

#### Генетические дистанции

$P$  – дистанция (p-Distanz)

Простым измерением дистанции между двумя нуклеотидными сиквенсами является  $p$ -дистанция:

$p$  = количество отличающихся нуклеотидов/длина ДНК последовательности

Нуклеотидные последовательности с пробелами (Gaps) или с сомнительными нуклеотидами (Wobbles) при этом не учитываются. В целом  $p$  не показывает реальное число замещений (Substitutionen), которые произошли в сиквенсах за период изолированной эволюции.

#### Jukes-Cantor-Distanz

Является простой моделью для определения количества замещений, которые произошли в сиквенсах за период изолированной эволюции видов в изучаемом фрагменте ДНК:

$$d = -\frac{3}{4} \ln(1 - \frac{4}{3} p)$$

#### Kimura-2-Parameter-Distanz

$P$  и  $Q$  являются частью транзиций или трансверсий между двумя нуклеотидными последовательностями по отношению к длине последовательности, при этом генетическая дистанция определяется по следующей формуле (Kimura, 1980):

$$K = -\frac{1}{2} \ln((1 - 2P - Q) \sqrt{1 - 2Q})$$

Эта дистанция редуцируется до Jukes-Cantor-Distanz, если транзиции встречаются с одинаковой вероятностью с трансверсиями (тогда  $P = \frac{1}{2} p$  и  $Q = \frac{2}{3} p$ ).

Алгоритмы для выравнивания более двух последовательностей (например, Clustal-Алгоритм) часто используют комбинацию выравнивания двух последовательностей с определением генетических дистанций.

Алгоритм можно запустить on-line с веб-страницы: [www.ebi.ac.uk/Clustal Omega](http://www.ebi.ac.uk/Clustal Omega)

Программа Clustal (Higgins & al., 1992) основана на следующих шагах:

1. Каждые две последовательности ДНК выравниваются при помощи коэффициента Needleman & Wunsch.
2. Вычисляют генетические дистанции.
3. На основе генетических дистанций рассчитывается UPGMA-древо.
4. На основе полученного древа составляется множественное выравнивание.

#### **7.1.5. Статистическая обработка результатов**

Филогенетический анализ молекулярных данных является неотъемлемой частью изучения эволюционной истории на любом классификационном уровне – от порядка и семейства до видов и внутривидовой изменчивости.

Для построения филогенетической схемы необходимо сравнение молекулярных маркеров (признаков) по определённому алгоритму. Математический аппарат и основы анализа достаточно хорошо описаны в литературе, поэтому мы не будем заострять на этом внимание. Достаточно указать, что все программы реализуют достаточно известные алгоритмы и те же самые вычисления возможно сделать вручную (что неоправданно трудозатратно), так и с использованием общераспространённых программ.

В любом случае при обработке RAPD или ISSR данных принимается теория доминантного наследования признаков, т.е. определённый бэнд в гетерозиготе и гомозиготе будет одинаково

проявляться на электрофореграмме. Специальное программное обеспечение, поставляемое с системами гель-документирования позволяет автоматизировать процесс заполнения матриц признаков, однако при невысоком качестве снимка возможны ошибки и, в конечном счёте, необходима ручная правка матриц. В простейшем варианте необходимо распечатать фотографию геля на принтере и заполнить матрицу признаков вручную путём проведения параллельных стартов линий, пересекающих все бэнды. Соответственно при пересечении в паттерне фрагмента в ячейку таблицы (например, Microsoft Excel) вносится «1», при отсутствии фрагмента – «0» (рис. 19).

При анализе нуклеотидных последовательностей в качестве отдельных признаков выступают отдельные нуклеотидные позиции после процедуры выравнивания, рассмотренной выше.

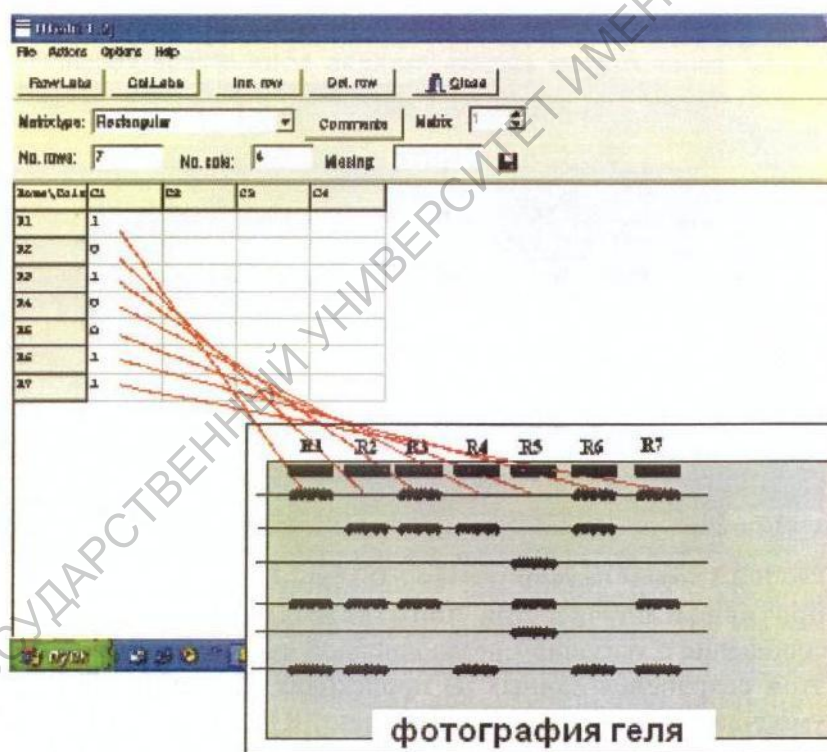


Рис. 19. Порядок заполнения матрицы данных в электронной таблице  
(По: Куцев, 2009)

#### Программы для анализа молекулярно-генетических данных:

**Arlequin** — <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/> — анализ популяционно-генетических данных

**BEST** — <https://www.stat.osu.edu/~dkp/BEST> — Байесовые вероятности филогенетических деревьев

**GenAlEx** – <http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx> – анализ популяционной структуры

**GENEPOP** – <http://genepop.curtin.edu.au/> – анализ популяционно-генетических данных

**MrBayes** – <http://mrbayes.sourceforge.net/> – программа для Байесовой оценки филогении

**NTSYS** – <http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html> – филогенетический анализ, кластерный анализ, одна из базовых программ, используемая при решении множества задач

**PAUP\*** – <http://paup.csit.fsu.edu/> – филогенетический анализ, одна из базовых программ, используемая при решении множества задач

**STRUCTURE** – <http://pritchardlab.stanford.edu/structure.html> – анализ популяционной структуры

**TFGA** – <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga> – популяционно-генетический анализ

### Рекомендуемая литература

Вайнагий И.В. О методике изучения семенной продуктивности растений // Ботан. журн. - 1974. -Т. 59, № 6. - С. 826–831.

Воронов А.Г. Геоботаника. Учеб. Пособие для ун-тов и пед. ин-тов. Изд. 2-е, испр. и доп. - М.: Высшая школа, 1973. - 384 с.

Гланц С. Медико–биологическая статистика. - М.: Практика, 1999. - 459 с.

Горин В.И. Новые способы определения общих ступеней по шкалам Л.Г. Раменского для конкретных фитоценозов // Бюлл. Ботан. сада Саратов. гос. ун-та. – 2002. - Вып. 1. - С. 35-38.

Горин В., Болдырев В. Расширение шкал Раменского. Дополнение шкал данными по экологии видов флоры Саратовской области. - Saarbrücken, Deutschland: LAPLAMBERTAcademicPublishing, 2013. - 62 с.

Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

Ермолаева Н.Н., Шилова И.В., Кашин А.С., Петрова Н.А. Состояние ценопопуляции *Delphinium pubiflorum* (DC.) Turcz. ex Huth) из Татищевского района Саратовской области // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. - 2015. - Т. 15. Вып. 3. - С. 64-75.

Животовский Л.А. Онтогенетические состояния, эффективная плотность и классификация популяций растений // Экология. - 2001. - № 1. - С. 3-7.

Жукова Л.А. Динамика ценопопуляций луговых растений в естественных фитоценозах // Динамика ценопопуляций травянистых растений. - Киев: Наук. думка, 1987. - С. 9–19.

Заугольнова Л.Б. Типы возрастных спектров нормальных ценопопуляций растений // Ценопопуляции растений.- М.: Наука, 1976. - С. 81-91.

Заугольнова Л.Б., Жукова Л.А., Комаров А.С. и др. Ценопопуляции растений (очерки популяционной биологии). - М., 1988. - 184 с.

Злобин Ю.А. Принципы и методы изучения ценологических популяций растений: Учебно-методическое пособие. - Казань: Изд-во Казанского ун-та, 1989. - 146 с.

Злобин Ю.А., Скляр В.Г., Клименко А.А. Популяции редких видов растений: теоретические основы и методика изучения. - Сумы: Университетская книга, 2013. - 439 с.

Ишбирдин А. Р., Ишмуратова М. М. Адаптивный морфогенез и экологические стратегии выживания травянистых растений // Методы

популяционной биологии: Материалы докладов VII Всероссийского популяционного семинара (часть 2). - Сыктывкар, 2004. - С. 113 – 120.

Ишбирдин А.Р., Ишмуратова М.М., Журнова Т.В. Стратегии жизни ценопопуляции *Cephalanthera rubra* (L.) Rich. на территории Башкирского государственного заповедника // Вест. Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского. Сер. Биология. - 2005. - Вып. 1(9). - С. 85-98.

Каменский К.В. Методика исследований качества посевного материала. - Л., 1935. - 144 с.

Кашин А.С., Шишкинская Н.А., Апомиксис. - Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1999. - 102 с.

Кашин, А.С. Березуцкий М.А., Шилова И.В. и др. Методы полевого изучения лекарственных растений. - Саратов: ИЦ «Наука», 2007. - 24 с.

Кашин А.С., Петрова Н.А., И.В. Шилова, и др. Структура ценопопуляций *Tulipa gesneriana* L. в Саратовской области // Биоразнообразие аридных экосистем. - Москва: Планета, 2014. - С. 86-105.

Кияк В. Г. Малі популяції рослин: проблеми і перспективи досліджень / В. Г. Кияк // Ботаніка та мікологія: проблеми і перспективи на 2011—2020 рр. - К., 2011. - С. 18-20.

Клонирование ДНК. Методы: Пер. с англ. / Д. Гловер. - М.: Мир, 1988. - 538 с.

Куприянов П.Г. Диагностика систем семенного размножения в популяциях цветковых растений. - Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1989. - 160с.

Куцев М.Г. Фрагментарный анализ ДНК растений: RAPD, DAF, ISSR. - Барнаул: ARTIKA, 2009. - 164 с.

Мамаев С.А. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений. - М.: Наука, 1972. - 283 с.

Матвеев Н.М. Количественные оценки экоморфного состава лесонасаждений в степной зоне // Проблемы устойчивого функционирования лесных экосистем. - Ульяновск: Изд-во Ульяновского гос. ун-та, 2001. - С. 118-122.

Матвеев Н.М. Оптимизация системы экоморф растений А.Л. Бельгарда в целях фитоиндикации экотопа и биотопа // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія. - 2003. - Т. 2, вип. 11. - С. 105-113.

Матвеев Н.М. Биоэкологический анализ флоры и растительности (на примере лесостепной и степной зоны): учебное пособие. - Самара: Изд-во СамГУ, 2006. - 311 с.

Миркин Б.М., Наумова Л.Г. Наука о растительности (история и современное состояние основных концепций). - Уфа, 1998. - 413 с.



Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. - Л.: Наука, 1985. - 348 с.

Одум Ю. Экология: в 2 т. - М.: Мир, 1986. - Т. 2. - 376 с.

Остапко В.М. Эйдологические, популяционные и ценоотические основы фитосозологии на юго-востоке Украины / В. М. Остапко. - Донецк: Лебедь, 2005. - 408 с.

Пархоменко В.М., Кашин А.С. Состояние ценопопуляций *Hypericum perforatum* L. в Саратовской области: Изменчивость морфометрических признаков и стратегия выживания // Растительные ресурсы. - 2011. - Т. 47, вып. 4. - С. 1-18.

Паутов А.А. Структура листа в эволюции тополей. - СПб.: СПбГУ, 2002. - 164 с.

Правила сбора редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений (для ботанических садов) / Комиссия по охране растений Совета ботанических садов СССР // Бюллетень Главного ботанического сада. - 1981. - Вып. 119. - С. 94-96.

Работнов Т.А. Вопросы изучения состава популяций для целей фитоценологии // Проблемы ботаники. - Вып. 1. - М.-Л.: АН СССР, 1950 - С. 465-483.

Раменский Л.Г., Цаценкин И.А., Чижиков О.Н., Антипин Н.А. Экологическая оценка кормовых угодий по растительному покрову. - М.: Сельхозгиз, 1956. - 472 с.

Ростова Н.С. Корреляции: структура и изменчивость. - СПб: Изд-во С.-Петербургского ун-та, 2002. - 308с.

Серебряков И.Г. Экологическая морфология растений (жизненные формы покрытосеменных и хвойных). - М.: Высшая школа, 1962. - 377 с.

Сукачёв В.Н. Терминология основных понятий фитоценологии // Советская ботаника. - 1935. - №5. - С. 11-21.

Тарасов А.О., Руководство к изучению лесов Юго-Востока европейской части СССР. - Саратов Изд-во Сарат. ун-та, 1981 - 100 с.

Томилова Л. И. Возрастные изменения семенной продуктивности уральских эндемичных гвоздик при интродукции на Среднем Урале // Биология семян интродуцированных растений.- М.: Наука, 1985. - 158с.

Уранов А.А. О методе Друде // Бюлл. Моск. о-ва испыт. природы, отд. биол. - 1935. - Т. 44. вып. 1-2. С. 18-31.

Уранов А.А. Возрастной спектр фитоценопопуляций как функция времени и энергетических волновых процессов // Биологическая наука. - 1975. - № 2. - С. 7-33..

Фризен Н. Молекулярные методы, используемые в систематике растений. – Барнаул: АзБука, 2007. – 64 с.

Хохлов С.С., Зайцева М.И., Куприянов П.Г. Выявление апомиктичных растений во флоре цветковых растений СССР. - Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1978. - 224 с.

Цыганов Д.Н. Фитоиндикация экологических режимов в подзоне хвойно-широколиственных лесов. – М.: Наука, 1983. – 198 с.

Чемерис А.В., Ахунов Э.Д., Вахитов В.А. Секвенирование ДНК. – М.: Наука, 1999. – 427 с.

Экологическая оценка естественных кормовых угодий с помощью шкал Л.Г. Раменского: Учебно-методическое пособие для студентов факультетов: защиты растений, агрономического и агролесомелиорации / Составители: Горбунов В.С., Горин В.И., Маевский В.В., Баяков Д.А. – Саратов: Изд-во ФГНУ РосНИИСК «Россорго», 2010. – 82 с.

Юдакова О. И., Гуторова О. В., Беляченко Ю. А. Методы исследования репродуктивных структур и органов растений: Учебно-методическое пособие для студентов биологического факультета. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2012. - 44 с.

Braun-Blanquet J., Pavillard I. Vocabulaire de sociologie végétale. 2<sup>e</sup> éd. – Montpellier, 1925. - 22 p.

Drude O. Die Ökologie der Pflancen. - Braunschweig, 1913.

Gu X., Li W.-H. The size distribution of insertions and deletions in human and rodent pseudogenes suggests the logarithmic gap penalty for sequence alignment // J. Mol. Evol. - 1995. – V. 40. – P. 464-473.

Higgins D.G., Bleasby A.J., Fuchs R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment // Comput. Appl. Biosci., 1992. – V.8 (2). – P. 189-191.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotides sequences // J. Mol. Evol. - 1980. – V. 16. – P. 111-120.

Needleman S.B., Wunsch C.D. A general method applicable to the search for similarities in the amino-acid sequence of two proteins // J. Mol. Biol. - 1970. – V. 48. – P. 443-453.

Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // J. Mol. Biol. - 1975. – V. 94. – P. 444-448.

Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1977. – V. 74. – P. 5463-5467.

Бланк описания лесного фитоценоза

№ \_\_\_\_\_ Дата \_\_\_\_\_ Исследователь \_\_\_\_\_

Географическое положение (Область, район, село) \_\_\_\_\_

Рельеф \_\_\_\_\_

Экспозиция \_\_\_\_\_

Угол склона \_\_\_\_\_

Механический состав почвы (П, СП, СГ, Г) \_\_\_\_\_

Условия увлажнения \_\_\_\_\_

Окружение \_\_\_\_\_

Тип леса \_\_\_\_\_

Подстилка (мощность, состав, пр. покрытие) \_\_\_\_\_

Формула состава древостоя \_\_\_\_\_

Возраст \_\_\_\_\_

Сомкнутость крон \_\_\_\_\_

Доминанты \_\_\_\_\_

Влияние человека и животных \_\_\_\_\_

Состояние растительности \_\_\_\_\_

### Описание древостоя

Порода	Ярус	Покры- тие ствола- ми	Диаметр ствола, см		Высота, м		Возраст средний	фено- фаза	Жиз- нен- ность	ПП, %
			сред- ний	макси- маль- ный	сред- няя	макси- мальная				

### Описание подлеска (кустарников)

Порода	Покры- тие стволами	Высота		Фенофаза	Жизнен- ность	Примечание
		средняя	макси- мальная			

### Описание возобновления

Порода	Покры- тие стволами	Обилие	Высота (см)	Возраст	Происхождение	Жизнен- ность	ПП, %

**Описание напочвенного покрова**  
**(кустарнички, полукустарники, травы)**  
**Общий характер (доминанты, распределение растений)**

Общее покрытие: проективное \_\_\_\_\_  
 истинное \_\_\_\_\_

Ярусность (высота, облик, проективное покрытие) \_\_\_\_\_

I ярус \_\_\_\_\_

II ярус \_\_\_\_\_

III ярус \_\_\_\_\_

Микрогруппировки и связь с условиями (микрорельеф, степень освещения, развитие подстилки и т.д.), состав всех ярусов \_\_\_\_\_

Название растения	Ярус	Обилие (по Друде)	Проективное покрытие (%)	Фенофаза	Жизненность

**Бланк описания степного фитоценоза**

№ \_\_\_\_\_ Дата \_\_\_\_\_

Исследователь \_\_\_\_\_

Географическое положение (область, район, село) \_\_\_\_\_

Местообитание:

Рельеф (мезо и микро) \_\_\_\_\_

Экспозиция \_\_\_\_\_

Угол склона \_\_\_\_\_

Механический состав почвы (П, СП, СГ, Г) \_\_\_\_\_

Условия увлажнения \_\_\_\_\_

Наименование ассоциации \_\_\_\_\_

Влияние человека и животных \_\_\_\_\_

Состояние растительности \_\_\_\_\_

Аспект \_\_\_\_\_

Окружение \_\_\_\_\_

Покрытие \_\_\_\_\_

Размер пробной площади \_\_\_\_\_

## Использование \_\_\_\_\_

№	Наименование растения	Обилие	Ярус	Фаза развития	Жизненность	ПП, %
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						
32						
33						
34						
35						
36						
37						
38						