

УДК 581.1

**РАЗРАБОТКА НЕТРАВМИРУЮЩЕГО МЕТОДА
ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ
ЛИСТЬЕВ ОРХИДНЫХ (НА ПРИМЕРЕ
DACTYLORHIZA MACULATA (L.) SOÓ)**

О.А. Маракаев, Ю.В. Богомолов, А.В. Сидоров, Н.В. Загоскина

Предложен нетравмирующий метод оценки ассимиляционной поверхности у *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae), позволяющий определять площадь листьев и накопление в них сухой массы без удаления органов с растений. Используются четыре показателя – длина, максимальная ширина, площадь, отношение максимальной ширины к длине, а также содержание сухой массы. Впервые для *D. maculata* проведен детальный анализ листьев с установлением их формы, расположения на цветоносном стебле и физиологических характеристик. Площадь и сухая масса листа *D. maculata* могут быть определены косвенно – путем измерения длины и максимальной ширины листа и последующим расчетом с использованием эмпирических уравнений.

Ключевые слова: орхидные, *Dactylorhiza maculata*, площадь листа, сухая масса, регрессионный анализ.

Представители семейства Орхидные (Orchidaceae), крупнейшего среди однодольных растений и насчитывающего более 25 тыс. видов, крайне ограниченно изучены с позиций физиологии и до настоящего времени являются для нее нетрадиционным объектом исследования. Это в полной мере касается видов произрастающих как в тропических и субтропических широтах (Hew, Yong, 2004), так и в умеренном климате северного полушария (Марковская и др., 2007; Vakhrameeva et al., 2008).

В нашей стране произрастает более 130 видов орхидных, из которых многие являются редкими и внесены в Красную книгу Российской Федерации и региональные Красные книги (Горохова, Маракаев, 2004; Варлыгина, 2011), что, вероятно, и препятствует исследованию их физиологических особенностей.

Важнейшей частью работ по сохранению орхидных в природных местообитаниях должны стать мониторинговые исследования их ценопопуляций. Наряду с определением их численности и возрастного состава актуальной является оценка жизнеспособности особей. В большинстве случаев для этого используются морфометрические параметры – высота побега, число листьев, их линейные размеры, количество цветков и плодов в соцветии, семенная продуктивность и др. (Заугольнова и др., 1988). Такие морфофизиологические показатели как площадь листьев и содержание в них сухой массы, характеризующие величину ассимилирующей поверхности и уровень фотосинтетической активности, до настоящего времени

не применяются для оценки жизненного состояния особей орхидных при проведении мониторинга их ценопопуляций. Между тем именно по этим параметрам можно достаточно объективно судить о физиологическом состоянии растения.

Известно, что площадь листа и его весовые характеристики – важнейшие показатели функционирования фотосинтетического аппарата, которые свидетельствуют о потенциальной фотосинтетической продуктивности растений (Мокроносов и др., 2006). Содержание сухой массы в листьях отражает динамическое равновесие между процессами биосинтеза ассимилятов при фотосинтезе и их использования в дыхании (Головко, 1999).

Следует также подчеркнуть, что традиционные методы определения площади листьев и содержания в них сухой массы не могут в полной мере использоваться при изучении орхидных (Баславская, Трубецкова, 1964; Практикум по физиологии растений, 1990). В частности, определение площади методом отпечатков в наибольшей степени подходит для плоскостных листьев, тогда как у орхидных они часто бывают сложены продольно, либо их края приподняты у основания листовой пластинки. Кроме того, они могут вертикально отстоять от стебля под острым углом, что также вызывает методические затруднения при снятии отпечатка. Методы высечек и планиметрирования при определении площади листьев у орхидных требуют их повреждения или удаления с растений, чего нельзя допустить при работе с ред-

кими видами. По этой же причине невозможно использование сканирования листьев с последующим определением их площади с помощью графических компьютерных программ. Определение содержания сухой массы весовым методом подразумевает высушивание отобранных листьев, что трудоемко и опять же связано с травмированием растений, которое негативно скажется на их росте и развитии.

В связи с этим необходима разработка относительно простого нетравмирующего метода, обеспечивающего оценку площади и массы листьев орхидных с высокой производительностью, без отделения листьев от растений и с достаточно высокой точностью. Таким критериям удовлетворяет использование уравнений линейной регрессии, которые косвенно, на основе измерения линейных размеров листьев (длины и ширины), позволяют рассчитывать их площадь и массу. Подобные математические модели в настоящее время активно разрабатываются. Так, для хвойных растений предложены аллометрические уравнения для расчета площади листьев на одной ветви и во всей кроне, а также массы листьев (Monserud, Marshall, 1999). Линейные и полиномиальные уравнения разработаны для расчета площади листьев ряда сельскохозяйственных и технических культур, а также декоративных растений (Медведева, 2009; Pinto et al., 2004; Ramirez-Builes et al., 2008).

В большинстве математических линейных моделей для расчета площади листа (S) предлагаются уравнения следующего вида: $S = f \cdot a \cdot b$, где a – наибольшая ширина листа, b – длина листа, f – поправочный коэффициент. Такой подход в зависимости от видовой и сортовой принадлежности растений, а также формы их листовой пластинки позволяет получать более или менее адекватные результаты. Отметим, что для некоторых геометрических форм (например, для эллиптической или треугольной) поправочный коэффициент известен, однако для других форм листьев вычисление его точного значения является открытой задачей.

Необходимо также отметить, что большинство имеющихся в настоящее время математических моделей позволяют рассчитать лишь площадь ассимиляционной поверхности, и разработаны они, в основном, для двудольных растений. Что касается представителей однодольных, к числу которых принадлежат орхидные, то основное внимание среди них обращено на злаковые культуры, определение площади поверхности листьев для которых имеет первостепенное значение в связи с необходимостью оценки фотосинтетической продуктивности посевов (Беденко, 2005; Sezer et al., 2009).

У орхидных подобные работы были проведены лишь с тропическим родом *Phalaenopsis*. Для четырех его гибридов, выращиваемых в контролируемых условиях закрытого грунта, предложены формулы расчета площади листьев: $S = a \cdot K$, где a – коэффициент, K – произведение длины на максимальную ширину листа, а также содержания в них сухой массы: $\ln M = -a + b \cdot \ln K$, где a , b – коэффициенты, K – произведение длины на максимальную ширину листа (Chen, Lin, 2004). Особенности листьев растений тропического рода (их форма, толщина, фотосинтетическая продуктивность и др.) не позволяют использовать эти формулы для орхидных, произрастающих в умеренном климате России, для которых подобные математические модели до настоящего времени отсутствуют.

Цель настоящего исследования – разработка нетравмирующего метода определения площади и сухой массы листьев *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae), основанной на измерении их линейных размеров. В связи с этим рассматривается возможность построения линейных регрессионных уравнений зависимости площади поверхности и сухой массы листа от произведения его длины на максимальную ширину. Для оценки площади поверхности и сухой массы листа предлагается линейная регрессионная модель следующего вида: $X = K \cdot L \cdot W$, где K – коэффициент линейной регрессии, L – длина листа, W – максимальная ширина листа. Параметр K представляет собой поправочный коэффициент, являющийся оценкой отношения площади листа к площади описанного около него прямоугольника длины L и ширины W . Этот коэффициент может различаться для каждой формы листа, что требует построения соответствующих регрессионных моделей.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись генеративные растения пальчатокоренника пятнистого – *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (семейство Orchidaceae), произрастающие в естественных условиях центрально-европейской части России (Ярославская обл.). Этот вид достаточно широко распространен на территории России (Вахрамеева, 2000). Характеристики его листьев во многом схожи с таковыми у ряда других тубероидных орхидных (например, у представителей родов *Dactylorhiza*, *Orchis*, *Gymnadenia*, *Platanthera*, *Herminium* и др.), что позволяет использовать их в качестве модельных при разработке математических способов определения площади и содержания сухой

массы. Растения для исследования были собраны в третью декаду июня 2007 г. в фазу цветения растений, когда их листовая аппарат был полностью сформирован. Генеративные особи имели хорошо развитые срединные нормальные зеленые листья (Смирнова, 1990). Среди них выделяли нижний, средние и верхний листья. Низовые (чешуевидные, влагищные) и верхушечные (брактеи) листья в работе не учитывали. Интенсивность естественного освещения на уровне срединных листьев в полуденные часы не превышала 25 000 лк.

Определяли длину (L) и максимальную ширину (W) листьев, местонахождение наибольшей их ширины – ближе к основанию, посередине или ближе к верхушке. Выделение форм листовых пластинок осуществляли по отношению их длины к ширине и расположению максимальной ширины (Васильев и др., 1988). Всего было проанализировано 56 особей и 195 листьев. Размеры выборок листьев каждой формы представлены в табл. 1.

Определение площади поверхности листьев (S) проводили методом отпечатков (Практикум по физиологии растений, 1990), который обеспечивал высокую точность благодаря отделению ассимиляционных органов от стеблей растений.

Сырую массу листьев определяли через три часа с момента сбора растений в природе. Сухую массу (M) устанавливали после их высушивания до постоянного веса в течение двух-трех часов при температуре 100–105°C (Баславская, Трубецкова, 1964). Рассчитывали содержание воды, а также поверхностную массу листьев как отношение массы (г) к площади (дм²), а

их удельную поверхность как отношение площади (дм²) к массе (г).

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили по стандартным методикам (Зайцев, 1984). Для численных расчетов применяли программу Excel'2007. Использовали встроенные статистические функции для вычисления выборочного коэффициента корреляции, коэффициентов линейной регрессии, двустороннего обратного t -распределения Стьюдента, а также базовые алгебраические функции. В таблицах представлены средние арифметические величины (x), их средние квадратические отклонения (σ), ошибки средней арифметической (m) и коэффициенты вариации (C_v). Достоверность различий между вариантами устанавливали с помощью критерия Стьюдента (при уровне значимости $p \leq 0,05$).

Для построения регрессионной математической модели использовали следующие параметры листьев: длина (L), максимальная ширина (W), площадь поверхности (S) и сухая масса (M). Для установления зависимости площади и сухой массы листовой пластинки от ее длины и ширины использовали линейные регрессионные модели. Их параметры (линейные коэффициенты моделей) получены стандартным для регрессионного анализа методом наименьших квадратов (Зайцев, 1984; Дрейпер, Смит, 2007). После нахождения параметров моделей рассматривали нулевую гипотезу о независимости результативных переменных (площади и сухой массы листа) от факторной переменной (параметра LW). Значимость полученных коэффициентов проверяли

Т а б л и ц а 1

Распределение листьев разных форм на стебле *D. maculata* (шт.)

Форма листа	Нижний лист	Средние листья	Верхний лист	Число листьев
Широколанцетный	20	3	0	23
Обратнойцевидный	10	2	0	12
Продолговато-ланцетный	8	17	0	25
Продолговато-обратнойцевидный	9	8	0	17
Продолговато-линейный	3	43	27	73
Линейный	6	12	3	21
Линейно заостренный	0	0	24	24
Число листьев	56	85	54	195

с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $p \leq 0,01$.

Результаты

Пальчатокоренник пятнистый принадлежит к орхидным с тубероидной жизненной формой. Для него характерна большая изменчивость размеров, формы и окраски листьев, что может быть следствием генетической неоднородности особей в ценопопуляциях, возможностью образования многочисленных гибридных форм, возрастным состоянием растений, условиями произрастания и др. В связи с этим разработка математических моделей для расчета площади поверхности листьев *D. maculata* и содержания в них сухой массы потребовала критического подхода к выделению форм листовых пластинок, поскольку разработанные шкалы для данного вида до настоящего времени отсутствуют.

На основе соотношения линейных размеров (длины и ширины) и расположения их максимальной ширины нами были выделены семь форм срединных нормальных зеленых листьев у генеративных особей *D. maculata*: широколанцетные, продолговато-ланцетные, продолговато-линейные, обратнойцевидные, продолговато-обратнойцевидные, линейные и линейно заостренные листья (табл. 2). Изучение

их расположения на стебле показало, что широколанцетные, обратнойцевидные, продолговато-ланцетные и продолговато-обратнойцевидные листья, длина которых превышает ширину в 2–5 раз, занимают нижнее и среднее положения (табл. 1). Листья с длиной более чем в 5 раз превышающей ширину (продолговато-линейные и линейные) могут быть нижними, средними и верхними. Листья линейно-заостренной формы располагаются исключительно в верхней части стебля. При этом форма нижнего листа *D. maculata* сильно варьирует, но преобладающей является широколанцетная. Средние листья также существенно различаются по форме, хотя наиболее часто среди них встречается продолговато-линейная. У верхнего листа отмечено три формы – линейно заостренная, линейная и продолговато-линейная, с преобладанием последней.

Морфометрические характеристики листьев *D. maculata* свидетельствуют о том, что наибольшая их длина характерна для продолговато-линейной и линейной их форм, а наименьшая – для широколанцетных и обратнойцевидных (табл. 3). При этом ширина широколанцетных, обратнойцевидных, продолговато-ланцетных и продолговато-обратнойцевидных листьев практически одинакова и на 21–62% превышает значения, установленные для листьев

Т а б л и ц а 2

Параметры форм листьев у генеративных особей *D. maculata*


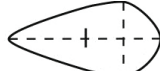
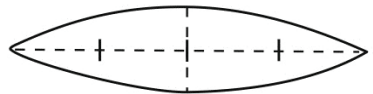
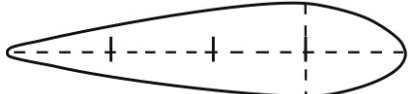

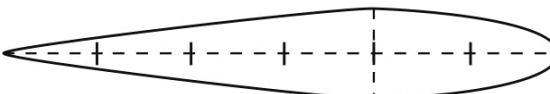
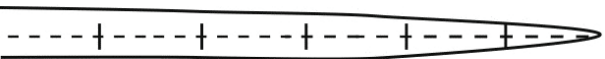
Длина превышает ширину	Максимальная ширина находится	
	посередине листа	ближе к верхушке листа
в 2,0–3,5 раза	 Широколанцетный	 Обратнойцевидный
в 3,6–5,0 раза	 Продолговато-ланцетный	 Продолговато-обратнойцевидный
более чем в 5 раз	 Продолговато-линейный	 Линейный
	 Линейно заостренный	

Таблица 3

Морфобиологические параметры листьев *D. tunicata*

Форма листа	Параметры*	Длина, см	Ширина, см	Площадь, см ²	Сырая масса, г	Сухая масса, г	Содержание воды, г	Содержание воды, %
Широко-ланцетная	x	8,7	2,9	20,9	0,45	0,05	0,40	87,0
	σ	2,75	0,64	10,12	0,315	0,032	0,284	3,97
	m	0,56	0,13	2,07	0,074	0,008	0,067	0,94
	$C_{1,2}$, %	31,5	22,2	48,5	69,5	61,5	70,8	4,56
Обратно-яйцевидная	x	8,6	2,9	20,3	0,42	0,05	0,37	86,4
	σ	1,82	0,56	7,40	0,218	0,025	0,194	2,20
	m	0,53	0,16	2,14	0,073	0,008	0,065	0,73
	$C_{1,2}$, %	21,1	19,0	36,4	52,0	45,9	53,2	2,6
Продолговато-ланцетная	x	12,4	2,9	27,6	0,63	0,07	0,56	88,3
	σ	2,50	0,48	10,29	0,331	0,032	0,300	2,08
	m	0,49	0,09	2,02	0,075	0,007	0,068	0,47
	$C_{1,2}$, %	20,2	16,4	37,2	52,3	45,4	53,3	2,35
Продолговато-обратно-яйцевидная	x	11,2	2,8	22,8	0,48	0,06	0,43	88,1
	σ	1,56	0,47	5,23	0,152	0,018	0,135	1,13
	m	0,38	0,11	1,27	0,044	0,005	0,039	0,33
	$C_{1,2}$, %	14,1	16,8	23,0	31,6	32,3	31,8	1,3
Продолговато-линейная	x	13,6	1,9	20,5	0,46	0,05	0,41	88,7
	σ	2,85	0,57	9,09	0,315	0,026	0,291	1,86
	m	0,33	0,07	1,05	0,042	0,004	0,039	0,25
	$C_{1,2}$, %	21,0	30,6	44,3	68,2	53,0	70,6	2,1
Линейная	x	14,5	2,3	24,2	0,54	0,06	0,47	88,5
	σ	2,48	0,41	6,29	0,175	0,018	0,159	1,552
	m	0,54	0,09	1,37	0,042	0,004	0,039	0,377
	$C_{1,2}$, %	17,1	18,1	26,0	32,7	29,2	33,5	1,8
Линейно-заостренная	x	11,0	1,1	10,0	0,18	0,02	0,16	88,8
	σ	1,84	0,22	2,27	0,064	0,004	0,061	2,21
	m	0,38	0,04	0,46	0,014	0,001	0,013	0,47
	$C_{1,2}$, %	16,8	19,9	22,8	36,0	21,7	38,8	2,5

* x – средняя арифметическая; σ – среднее квадратическое отклонение; m – ошибка средней арифметической; $C_{1,2}$ – коэффициент вариации (%).

остальных форм. Самыми узкими на растении являются верхние линейно заостренные листья, за ними по увеличению ширины располагаются продолговато-линейные и линейные.

Что касается площади ассимилирующей поверхности, то наибольшие показатели отмечены для продолговато-ланцетных и линейных листьев *D. maculata*, тогда как достоверных различий для широколанцетных, обратно-яйцевидных, продолговато-обратнояйцевидных и продолговато-линейных не обнаружено (табл. 3). Минимальные параметры имеют линейно заостренные листья. По сравнению с другими морфометрическими показателями площадь ассимилирующей поверхности листьев имеет высокий коэффициент вариации (от 22,8% у линейно заостренных до 48,5% у широколанцетных листьев).

Определение сырой массы листьев *D. maculata* показало, что она выше у продолговато-ланцетных и линейных листьев, имеющих наибольшую площадь, но по содержанию сухой массы достоверных различий не отмечено (табл. 3). У верхних листьев, имеющих линейно заостренную форму, сырая и сухая массы в 2,3–3,5 раза ниже, чем у других ассимиляционных органов. Содержание воды во всех листьях колеблет-

ся от 86% (у листьев обратно-яйцевидной формы) до 89% (у листьев продолговато-линейной, линейной и линейно заостренной форм).

Показателем потенциальной активности фотосинтетического аппарата служит поверхностная масса листа, связывающая процессы роста и фотосинтеза. Для *D. maculata* при расчете на сырую массу она составляет от $1,79 \pm 0,082$ (линейно заостренный) до $2,15 \pm 0,068$ г/дм² (продолговато-ланцетный, линейный), а при расчете на сухую массу от $0,20 \pm 0,007$ (линейно заостренный) до $0,25 \pm 0,015$ г/дм² (обратно-яйцевидный, продолговато-ланцетный). Что касается показателя удельной поверхности листа, то при расчете на сырую массу он составляет от $0,48 \pm 0,020$ (продолговато-ланцетный, линейный) до $0,58 \pm 0,020$ дм²/г (линейно заостренный), а на сухую массу – от $4,06 \pm 0,256$ (обратно-яйцевидный) до $5,24 \pm 0,169$ дм²/г (линейно заостренный). Максимальные его значения указывают на меньшую массу листа, приходящегося на единицу площади.

Коэффициент корреляции между площадью поверхности листовой пластинки и произведением длины листа на его максимальную ширину превышает 0,95, что свидетельствует о сильно выраженной

Т а б л и ц а 4

Линейные коэффициенты регрессионных уравнений для площади поверхности и сухой массы листа

Форма листа	K	m_K	R^2	$T_{набл}$	$T_{крит}$
Широколанцетная	$\frac{0,7797}{2,0220}$	$\frac{0,0115}{0,0571}$	$\frac{0,9751}{0,9712}$	$\frac{28,7057}{22,4734}$	$\frac{2,8314}{2,9467}$
Обратно-яйцевидная	$\frac{0,7682}{1,9660}$	$\frac{0,0122}{0,0996}$	$\frac{0,9810}{0,8908}$	$\frac{22,7217}{7,5579}$	$\frac{3,1693}{3,4995}$
Продолговато-ланцетная	$\frac{0,7411}{1,8936}$	$\frac{0,0126}{0,0538}$	$\frac{0,9436}{0,9294}$	$\frac{19,6170}{14,9623}$	$\frac{2,8073}{2,8982}$
Продолговато-обратно-яйцевидная	$\frac{0,6934}{1,7876}$	$\frac{0,0186}{0,0499}$	$\frac{0,8647}{0,9122}$	$\frac{9,7912}{10,1936}$	$\frac{2,9467}{3,1693}$
Продолговато-линейная	$\frac{0,7755}{1,8620}$	$\frac{0,0061}{0,0281}$	$\frac{0,9759}{0,9487}$	$\frac{53,6148}{31,0171}$	$\frac{2,6469}{2,6737}$
Линейная	$\frac{0,7286}{1,7786}$	$\frac{0,0081}{0,0399}$	$\frac{0,9661}{0,8996}$	$\frac{23,2566}{11,5930}$	$\frac{2,8609}{2,9467}$
Линейно заостренная	$\frac{0,8237}{1,5397}$	$\frac{0,0162}{0,0722}$	$\frac{0,8782}{0,4167}$	$\frac{12,5961}{3,7802}$	$\frac{2,8188}{2,8453}$
Универсальная (без учета формы)	$\frac{0,7554}{1,8664}$	$\frac{0,0043}{0,0184}$	$\frac{0,9679}{0,9442}$	$\frac{76,2292}{50,2272}$	$\frac{2,6015}{2,6095}$

П р и м е ч а н и е. В числителе приведены значения для площади поверхности, в знаменателе – для сухой массы листа. Основные параметры: K – коэффициент линейной регрессии (для сухой массы в мг/см²), m_K – стандартная ошибка коэффициента линейной регрессии (для сухой массы в мг/см²), R^2 – коэффициент детерминации, $T_{набл}$ – наблюдаемое значение критерия Стьюдента, $T_{крит}$ – критическое значение критерия Стьюдента.

прямой зависимости этих показателей (рис. 1, а), в отличие от корреляционной связи между площадью поверхности и длиной или максимальной шириной. Это подтверждает допустимость предложенной рабочей гипотезы о возможности построения линейного регрессионного уравнения зависимости площади поверхности листа от произведения его длины на максимальную ширину ($S = K \cdot L \cdot W$). Следует подчеркнуть, что при оценке площади листа параметр K является безразмерным, и в этом случае площадь поверхности листа выражается как квадрат линейных параметров.

Эмпирические оценки параметров K регрессионного уравнения для каждой выделенной формы листа приведены в табл. 4. Показателями значимости и точности оценок линейных коэффициентов являются значения стандартной ошибки линейного коэффициента регрессии (m_K) и коэффициента детерминации (R^2). Коэффициент R^2 является показателем доли вариации площади поверхности листа, вычисленные значения которого позволяют качественно оценить величину связи между площадью поверхности и линейными размерами листа по шкале Чеддока как высокую (от 0,7 до 0,9) и весьма высокую (более 0,9). Стандартная ошибка (m_K) мала по отношению к значению самого коэффициента, что является показателем его точности.

На основе оценок коэффициентов регрессии для вычисления площади поверхности листа ($S = K \cdot L \cdot W$) рассчитаны коэффициенты линейной регрессии (K). Их значения определяются формой листовой пластинки. Полученные коэффициенты линейной регрессионной модели значимы, поскольку $T_{\text{набл}}$ (наблюдаемые значения критерия Стьюдента при $p = 0,01$) превышают $T_{\text{крит}}$ (критические значения).

Для оценки площади поверхности листа без учета его формы или в случае затруднения при отнесении к какой-либо форме целесообразно использовать универсальную формулу. С этой целью был проведен регрессионный анализ общей выборки листьев без отнесения их к определенным формам. При этом, если значение R^2 находится между величиной площади поверхности листа и произведением его линейных размеров, можно считать величину связи между данными показателями очень высокой.

По результатам оценки коэффициентов регрессии для расчета площади поверхности листа независимо от формы получено универсальное регрессионное уравнение: $S = 0,7554 \cdot LW$. С учетом погрешности измерения линейных размеров, допустимо также использовать упрощенную эмпирическую формулу для оценки площади поверхности листа: $S = 3/4 \cdot LW$. В

этом случае $T_{\text{набл}}$ значительно превышает $T_{\text{крит}}$ (при $p = 0,01$), что позволяет сделать вывод о значимости полученной оценки коэффициента линейной регрессии, а следовательно и об адекватности предложенной математической модели.

Для сухой массы (M) листа также был проведен корреляционный анализ с линейными параметрами (табл. 4). Выявлена выраженная корреляционная связь сухой массы листа с произведением его длины на максимальную ширину (более 0,95). Это позволяет рассматривать для расчета сухой массы листа линейную регрессионную модель: $M = K \cdot L \cdot W$, где K – коэффициент линейной регрессии, L – длина листа, W – максимальная ширина листа (рис. 1, б). В этом случае параметр K не является безразмерным и его значения приведены в $\text{мг}/\text{см}^2$. Отсутствие в регрессионной модели для расчета сухой массы листа значения его толщины представляется допустимым с учетом соотношения массы и площади листьев, поскольку принципиальных различий по толщине листьев, занимающих на *D. maculata* нижнее и среднее положения, не было выявлено. Кроме того, точное измерение толщины листа в природных условиях затруднено, а изготовление для этих целей анатомических срезов потребовало бы повреждения растений.

Линейные коэффициенты (K) регрессионного уравнения, описывающего для каждой выделенной формы листовой пластинки зависимость сухой массы через произведение длины на максимальную ширину листа, и их эмпирические оценки (m_K , R^2 , $T_{\text{набл}}$, $T_{\text{крит}}$) приведены в табл. 4. Полученные значения R^2 позволяют качественно оценить величину связи между сухой массой листа и произведением его линейных размеров как высокую (0,7–0,9) и весьма высокую (более 0,9).

Для расчета сухой массы листа ($M = K \cdot L \cdot W$, $\text{мг}/\text{см}^2$) рассчитаны коэффициенты линейной регрессии (K), которые представлены в табл. 4. Для выделенных форм листьев вычисленные значения $T_{\text{набл}}$ превышают соответствующие значения $T_{\text{крит}}$ (при $p = 0,01$), что позволяет сделать вывод об адекватности полученных коэффициентов линейного регрессионного уравнения для оценки сухой массы листа.

Регрессионный анализ общей выборки листьев без отнесения их к определенным формам был проведен для построения универсального регрессионного уравнения, позволяющего оценивать сухую массу листа без учета его формы или при затруднении в определении формы (табл. 4). Значение R^2 между сухой массой листа и его линейными размерами, полученное по общей выборке, позволяет качественно

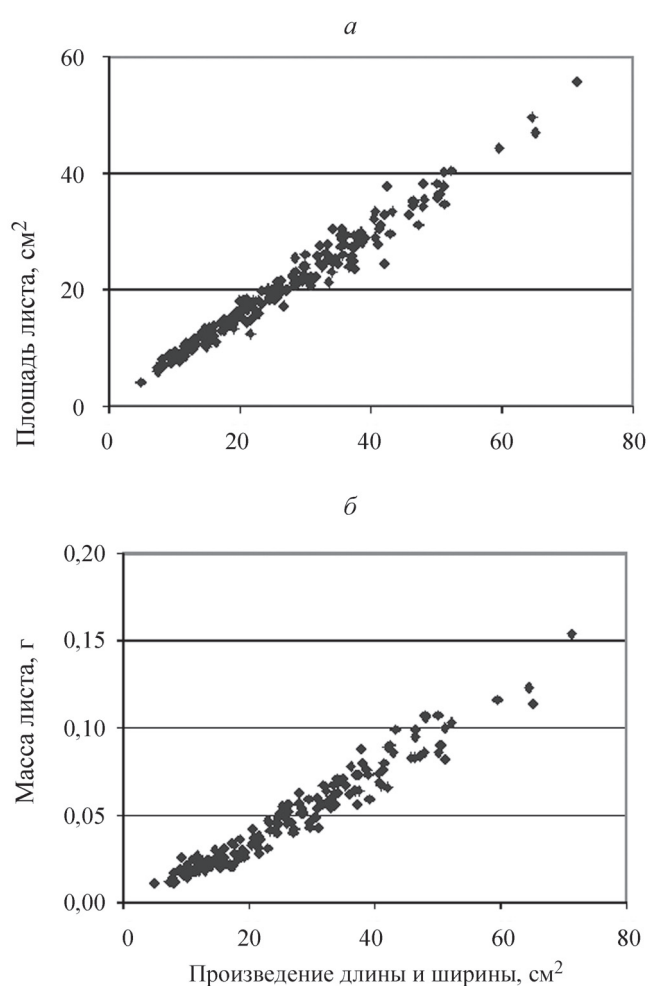


Рис. 1. Статистическая зависимость площади (а) и сухой массы (б) листа от произведения его длины на максимальную ширину

оценить величину связи между данными показателями как весьма высокую.

По результатам оценки коэффициентов регрессии для расчета сухой массы (M , мг) листа на основе всей выборки получено универсальное регрессионное уравнение: $M = 1,8664 \cdot LW$. С учетом погрешности измерения линейных размеров, допустимо также использование упрощенной эмпирической формулы для оценки сухой массы листа: $M = 1,87 \cdot LW$. В этих уравнениях длина (L) и ширина (W) листа выражены в сантиметрах. Значимость полученной оценки коэффициента линейной регрессии для универсального уравнения показана с помощью критерия Стьюдента для уровня значимости $p = 0,01$.

Обсуждение

Ранее отмечалось, что листья *D. maculata* могут иметь линейную, широколинейную, ланцетную, широколанцетную, продолговато-ланцетную и шило-

видно-линейную формы (Vakhrameeva et al., 2008). Нами выделены семь форм срединных листьев – широколанцетные, продолговато-ланцетные, продолговато-линейные, обратнойцевидные, продолговато-обратнойцевидные, линейные и линейно заостренные, что в целом согласуется с данными литературы. Проведенный подробный анализ листьев, длина которых превышает ширину более чем в 5 раз, позволил наряду с линейной формой выявить еще продолговато-линейную (с максимальной шириной посередине) и линейно заостренную (сужающуюся к верхушке). Кроме того, отмечены обратнойцевидная и продолговато-обратнойцевидная формы листьев, в большей степени характерные для *D. fuchsii* – близкородственного вида, с которым *D. maculata* может образовывать гибридные формы (Вахрамеева, 2000).

Линейные размеры листьев *D. maculata* (длина и ширина) зависят от формы листовой пластинки и ее расположения на цветоносном стебле. По нашим данным, длина листьев исследуемого вида меняется от 8,6 до 14,5 см, а ширина – от 1,1 до 2,9 см (табл. 3). Эти значения согласуются с приведенными в литературе линейными размерами нижнего и средних листьев орхидных (Вахрамеева, 2000) и на 39–64% превышают длину средних листьев *D. maculata*, растущих на северной границе ареала (Блинова, 1998). В нашем случае коэффициент вариации, позволяющий судить о степени изменчивости линейных размеров листьев *D. maculata*, был достаточно высоким – 14,1–31,5% (табл. 3). Наиболее изменчивыми признаками у генеративных особей в исследуемой нами ценопопуляции являются длина широколанцетных (31,5%) и ширина продолговато-линейных (30,6%) листьев.

Площадь листьев, в отличие от их линейных размеров, позволяет с физиологических позиций оценить ассимилирующую поверхность, величина которой характеризует их потенциальную фотосинтетическую продуктивность (Мокроносов и др., 2006). По-видимому, у *D. maculata* значительный вклад в поглощение солнечной радиации вносят продолговато-ланцетные и линейные листья, занимающие преимущественно среднее положение на стебле и имеющие наибольшую площадь (табл. 3). Площадь широколанцетных, обратно-яйцевидных, продолговато-обратнойцевидных и продолговато-линейных листьев незначительно меньше (на 19–25%) по сравнению с площадью продолговато-ланцетных и линейных листьев, но им также отводится важная роль в поглощении света. Это подтверждается более высокой поверхностной массой этих листьев, обусловленной увеличением их толщины. Известно, что данное

обстоятельство может способствовать более полному поглощению и использованию световой энергии при сокращении площади ассимиляционной поверхности (Мокроносов и др., 2006). В листе происходит сильное рассеивание света и многократно изменяются его направления, что связано с наличием в толще листа множества поверхностей раздела с разными коэффициентами преломления.

Накопление сухого вещества в листьях является достаточно объективным отражением ассимиляционной деятельности и интенсивности дыхания у растений (Головки, 1999). Так, у *D. maculata* они содержат от 20 до 70 мг сухой массы (табл. 3). Накопление примерно равного количества сырого и сухого вещества в единице площади листьев разной формы, о чем свидетельствуют показатели их поверхностной массы, характеризует высокий уровень адаптационной способности фотосинтетического аппарата этого вида.

Степень оводненности листьев растений является важнейшим показателем их водного режима, определяющим концентрацию клеточного сока, водный потенциал, транспирацию, транспорт веществ и др. В нашем случае содержание воды в листьях *D. maculata* является высоким и составляет 86–89% (табл. 3), что характерно для гигрофитов, к которым может быть отнесен исследуемый вид (Vakhrameeva et al., 2008). Для большинства растений средней полосы России этот показатель составляет 65–82% и зависит от погодных условий, этапов онтогенеза и физиологического состояния (Практикум по физиологии растений, 1990). Как известно, *D. maculata* растет на сырых и очень влажных почвах, избегая сухих участков (Вахрамеева, 2000), т.е. «требователен» к увлажнению. Показатель обводненности листьев у исследуемого вида не проявляет видимых зависимостей от формы и расположения ассимиляционного органа на стебле, поскольку наряду с морфофизиологическими особенностями растения на него оказывает влияние водообеспеченность конкретного местообитания.

Необходимо отметить, что верхние листья *D. maculata*, имеющие линейно заостренную форму, существенно отличаются по всем морфофизиологическим параметрам от ассимиляционных органов, расположенных ниже на цветоносном стебле. Наряду с минимальной ассимиляционной поверхностью они характеризуются более низким (в 2,3–3,5 раза) содержанием сырой и сухой массы (табл. 3), а также высоким показателем удельной поверхности. По-видимому, эти листья имеют недостаточно развитую паренхиму и небольшую толщину, что способствует проникновению света, но сокращает длину его опти-

ческого пути в толще листа, снижая вероятность поглощения лучей пигментами и приводя к менее эффективному использованию энергии в фотосинтезе (Мокроносов и др., 2006).

Анализ параметров коэффициентов регрессионных моделей (табл. 4) позволяет сделать вывод, что для линейных коэффициентов предложенных нами формул вычисления площади поверхности листа через его линейные размеры стандартная ошибка заметно ниже, нежели для коэффициентов регрессии при расчете сухой массы. Однако стандартная ошибка регрессии при оценке сухой массы остается в пределах, допускающих достаточно точное вычисление интересующих физиологических параметров. Вероятно, причиной такого соотношения погрешностей является более сложная связь между сухой массой листа и его линейными размерами, а также отсутствие в предлагаемой регрессионной модели показателя толщины листовой пластинки.

Точность предложенных моделей характеризует средняя относительная погрешность аппроксимации. При оценке площади листа с помощью отдельных регрессионных уравнений для выделенных форм листьев она меняется от 4,1% (линейная форма) до 8,6% (продолговато-обратнояцевидная форма), а при использовании универсального уравнения – от 4,9% (линейная форма) до 11,3% (линейно заостренная форма). Для всей выборки средняя относительная погрешность аппроксимации при использовании универсального уравнения составляет 7,4% (рис. 2, а). Использование отдельных регрессионных уравнений для выделенных форм листьев дает меньшую погрешность по сравнению с универсальным уравнением (рис. 2, б). Для большинства форм листовых пластинок эта разница невелика. Заметное отклонение наблюдается только для продолговато-обратнояцевидной (8,6 и 10,2% при использовании отдельного и универсального уравнений соответственно) и линейно заостренной (7,9 и 11,3% соответственно) форм.

Отметим, что абсолютная ошибка инструментальных измерений линейных размеров листьев позволяет оценить для существующей выборки относительную погрешность определения длины (0,5–3,7%) и ширины (2,4–14,3%). Относительные погрешности при измерении базовой переменной регрессионной модели (LW) складываются из относительных погрешностей измерения длины и максимальной ширины листа и находятся в диапазоне от 2,9 до 18,0%. Таким образом, погрешность регрессионной модели для оценки площади листьев сопоставима с погрешностью инструментального измерения.

Одновременно со средней относительной погрешностью аппроксимации показателем точности предложенных моделей является средняя квадратическая погрешность. При оценке площади листьев с использованием отдельных регрессионных уравнений она меняется от 0,96 до 2,49 см², а при расчете с помощью универсального регрессионного уравнения составляет 1,79 см². Это значительно меньше средней площади листа по общей выборке (20,76 см²), что также свидетельствует о достаточно высокой предсказательной способности модели (рис. 2).

При оценке сухой массы листа с помощью отдельных регрессионных уравнений для выделенных форм листьев средняя относительная погрешность аппроксимации меняется от 8,1 до 15,0%, а при использовании универсального уравнения – от 9,8 до 23,1% (продолговато-обратнояцевидная и линейно заостренная формы соответственно). При использовании универсального уравнения для всей выборки она составляет 13,3%. Для большинства форм листовых пластинок

эта разница невелика, поэтому при расчете сухой массы листьев целесообразно использовать универсальное регрессионное уравнение (рис. 3). Заметное отклонение погрешностей наблюдается для линейно заостренной формы (15,0 и 23,1% при использовании отдельного и универсального уравнений соответственно), что требует расчета с помощью предложенного для этих листьев специального уравнения.

Высокие значения погрешностей при оценке массы линейно заостренных листьев через длину и ширину связаны с их специфической формой (рис. 3, б). Погрешность инструментального измерения максимальной ширины узких листьев значительно выше, чем более широких. Это обуславливает высокую относительную погрешность при вычислении базовой переменной (LW) и рост погрешности при нахождении сухой массы листьев. Кроме того, высокая погрешность при оценке сухой массы линейно заостренных листьев с использованием универсального регрессионного уравнения обусловлена их незначительной толщиной по сравнению с другими формами листьев. Тем не менее погрешность регрессионной модели для оценки сухой массы листьев независимо от их формы имеет тот же порядок, что и погрешность инструментального измерения.

Высокую предсказательную способность модели оценки сухой массы также можно подтвердить с помощью анализа средней квадратической погрешности. При использовании отдельных регрессионных уравнений она меняется от 4,06 до 9,25 мг, а при расчете с помощью универсального регрессионного уравнения составляет 6,92 мг, что намного меньше значения средней сухой массы по общей выборке (50,40 мг).

Использование математических уравнений для расчета площади и сухой массы листьев *D. maculata* позволяет проводить определения без срезания с растений ассимиляционных органов, что обеспечивает нетравмирующую технологию мониторинговых исследований физиологических параметров у редких видов, нуждающихся в охране. Предлагаемый математический метод простой, быстрый, недорогой и удобен для применения в полевых условиях, поскольку требует измерения лишь двух показателей – длины и максимальной ширины листа. С его помощью возможно определение физиологических параметров на живых экземплярах *D. maculata* в ценопопуляциях и неоднократное повторение этих определений для конкретных особей в течение вегетационного сезона в целях установления динамики изменений.

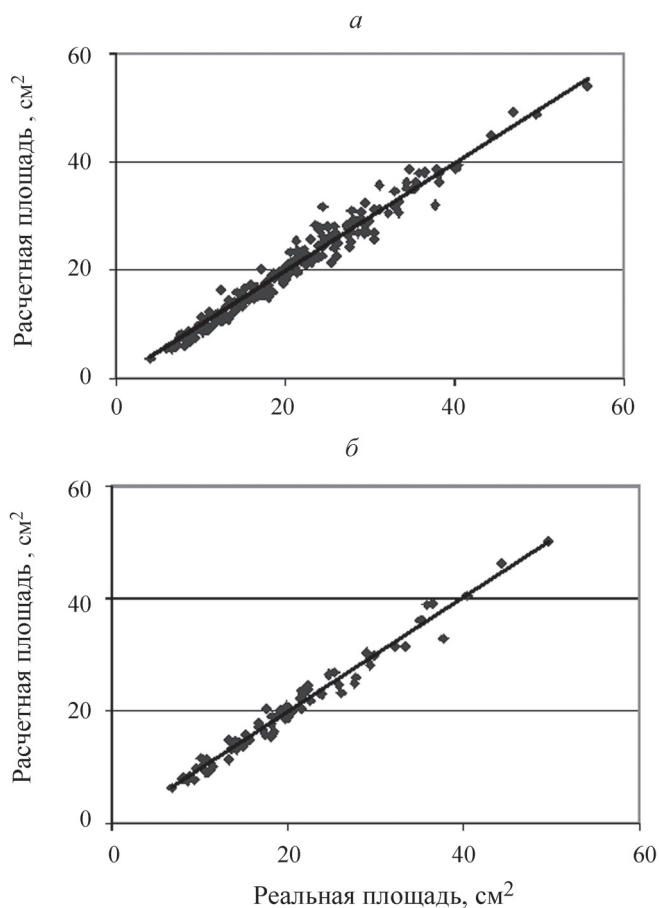


Рис. 2. Оценка погрешности математической модели для площади листа в случае инвариантной (а) и продолговато-линейной (б) форм

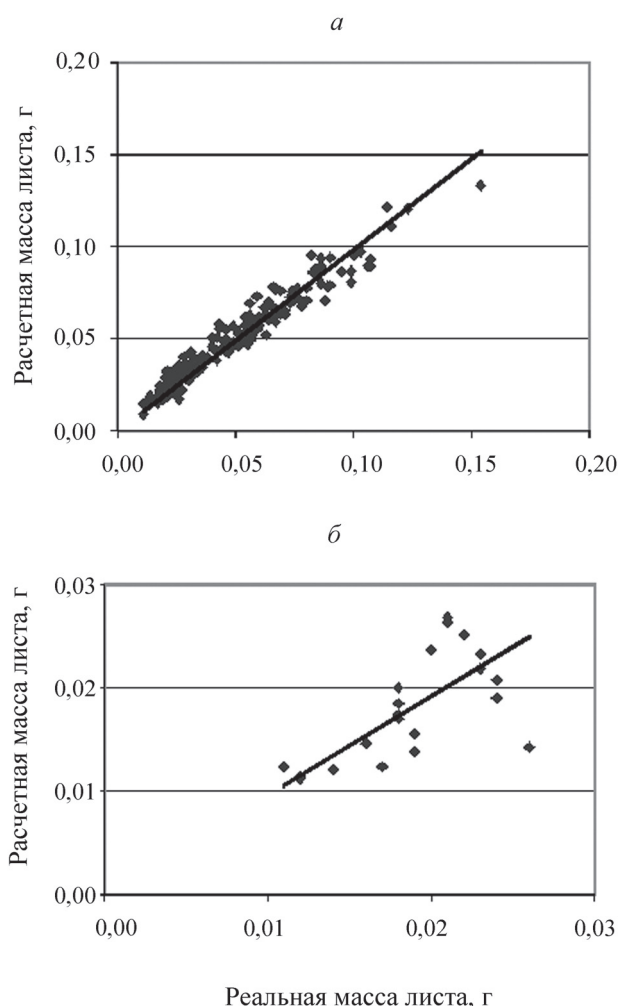


Рис. 3. Оценка погрешности математической модели для сухой массы листа в случае инвариантной (а) и линейно заостренной (б) форм

Разработанные на примере *D. maculata* уравнения могут быть использованы для определения площади ассимиляционной поверхности и у ряда дру-

гих орхидных, имеющих аналогичные формы листьев (*Dactylorhiza*, *Orchis*, *Gymnadenia*, *Platanthera*, *Herminium* и др.). При этом расчет площади возможен с применением уравнений для конкретных форм листовых пластинок или универсальной математической модели. Использование уравнений для расчета сухой массы листьев других видов орхидных целесообразно в случае установления их одинаковой толщины с листьями *D. maculata*, что потребует предварительного определения поверхностной массы листьев у исследуемых объектов.

Таким образом, составление схемы разнообразия листьев *D. maculata*, анализ их линейных размеров (длины и ширины), площади и массы позволили разработать математические модели расчета их площади поверхности и содержания сухой массы отдельно для каждой выделенной формы листовых пластинок и в целом по выборке.

Полученные в работе эмпирические уравнения будут способствовать оценке физиологического состояния орхидных в естественных местообитаниях и развитию функционального подхода при организации природоохранных мероприятий. Результаты определений площади и сухой массы листьев *D. maculata* традиционными методами не имеют существенных отклонений от данных, получаемых с помощью математического метода. При использовании универсальных регрессионных моделей погрешность при расчете площади листьев составляет 7,4%, а сухой массы – 13,3%, что является вполне допустимым при определении этих физиологических параметров. Отмеченные условия применимости универсальных моделей позволяют получать адекватные оценки площади и сухой массы листьев *D. maculata* с максимальным приближением к их реальным значениям для выделенных форм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баславская С.С., Трубецкова О.М. Практикум по физиологии растений. М., 1964. 328 с.
- Беденко В.П. Пшеница // Частная физиология полевых культур / Под ред. Е.И. Кошкина. М., 2005. С. 50-87.
- Блинова И.В. Особенности онтогенеза некоторых корнеклубневых орхидных (Orchidaceae) Крайнего севера // Ботанический журнал. 1998. Т. 83. С. 85–94.
- Варлыгина Т.И. Охрана орхидных России на государственном и региональном уровнях // Охрана и культивирование орхидей. М., 2011. С. 76–80.
- Васильев А.Е., Воронин Н.С., Еленевский А.Г., Серебрякова Т.И., Шорина Н.И. Ботаника: морфология и анатомия растений. М., 1988. 207 с.
- Вахрамеева М.Г. Род Пальчатокоренник // Биологическая флора Московской области. М., 2000. Вып. 14. С. 55–86.
- Головко Т.К. Дыхание растений (физиологические аспекты). СПб., 1999. 204 с.
- Горохова В.В., Маракаев О.А. Семейство Орхидные (Orchidaceae) // Красная книга Ярославской области. Ярославль, 2004. С. 85–108.
- Дрейнер Н., Смит Г. Прикладной регрессионный анализ. М., 2007. 912 с.
- Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М., 1984. 424 с.
- Зяугольнова Л.Б., Жукова Л.А., Комаров А.С. Ценопопуляции растений (основные понятия и структура). М., 1988. 184 с.

- Марковская Н.В., Дьячкова Т.Ю., Марковская Е.Ф., Шредерс М.А. Орхидные Заонежья. Петрозаводск, 2007. 82 с.
- Медведева З.Н. Сравнительная оценка методов определения площади листьев сои // Вестн. Новосибирского государственного аграрного университета. 2009. № 9. С. 23–25.
- Мокроносов А.Т., Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. М., 2006. 448 с.
- Практикум по физиологии растений / Под ред. Н.Н. Третьякова, Т.В. Карнауковой, Л.А. Паничкина и др. М., 1990. 271 с.
- Смирнова Е.С. Морфология побеговых систем орхидных. М., 1990. 208 с.
- Chen C., Lin R.-S. Nondestructive estimation of dry weight and leaf area of *Phalaenopsis* leaves // Applied Engineering in Agriculture. 2004. Vol. 20. P. 297–303.
- Hew C.S., Yong J.W.H. The Physiology of tropical orchids in relation to the industry. Singapore, 2004. 370 p.
- Monserud R.A., Marshall J.D. Allometric grown relations in three northern idaho conifer species // Can. J. For. Res. 1999. Vol. 29. P. 521–535.
- Pinto A.R., Rodrigues T.D., Barbosa J.C., Leite I.C. Leaf area prediction models for *Zinnia elegans* Jacq., *Zinnia haageana* Regel and 'Profusion Cherry' // Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.). 2004. Vol. 61. P. 47–52.
- Ramirez-Builes V.H., Porch T.G., Harmsen E.W. Development of linear models for estimation of leaflet area in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // J. Agric. Univ. P.R. 2008. Vol. 92. P. 171–182.
- Sezer I., Oner F., Mut Z. Non-destructive leaf area measurement in maize (*Zea mays* L.) // Journal of Environmental Biology. 2009. Vol. 30. P. 785–790.
- Vakhrameeva M.G., Tatarenko I.V., Varlygina T.I., Torosyan G.K., Zagulskii M.N. Orchids of Russia and adjacent countries (within the borders of the former USSR). Konigstein, 2008. 690 p.

Поступила в редакцию 29.11.13

NONTRAUMATIC METHOD FOR DETERMINING THE MORPHOPHYSIOLOGICAL PARAMETERS IN LEAVES OF ORCHIDS (FOR EXAMPLE *DACTYLORHIZA MACULATA* (L.) SOÓ)

O. A. Marakaev, Y. V. Bogomolov, A. V. Sidorov, N. V. Zagoskina

The non-traumatic method of assessing the assimilative surface in *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae) has been proposed, which allows to determine the leaf area and the accumulation of dry weight in them without the removal of organs from plants. Four indicators – the length, the maximum width, the area ratio of the maximum width to length and the dry matter content have been used. For the first time the detailed analysis of the leaves with the establishment of their shape, orientation on the flowering stems and physiological characteristics of *D. maculata* have been did. Area and leaf dry weight of *D. maculata* can be determined indirectly – by measuring the maximum length and width of the sheet and subsequent calculation using empirical equations.

Key words: orchids, *Dactylorhiza maculata*, leaf area, dry weight, regression analysis.

Сведения об авторах: *Маракаев Олег Анатольевич* – декан факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова, доцент, канд. биол. наук (marakaev@uniyar.ac.ru); *Богомолов Юрий Викторович* – ст. преподаватель кафедры дискретного анализа Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова (mathematics@inbox.ru); *Сидоров Андрей Владимирович* – аспирант Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова (sidan43@yandex.ru); *Загоскина Наталья Викторовна* – заведующая группой фенольного метаболизма растений ФГБУН Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, докт. биол. наук, профессор (nzagoskina@mail.ru).