

С.Ф. Коваль, В.П. Шаманин

РАСТЕНИЕ В ОПЫТЕ

Институт цитологии и генетики СО РАН, Омский Аграрный Университет.

Омск: Омскбланкиздат

1999

Содержание

	Введение
Глава 1.	Организм растения как система
Глава 2.	Адаптация к условиям среды
Глава 3.	Продуктивность и урожай
Глава 4.	Выбор объекта для эксперимента
Глава 5.	Организация опыта
Глава 6.	Истолкование результатов опыта
	Словарь терминов
	Приложения
	Список литературы

ВВЕДЕНИЕ

Боже, дай мне неутомимость, чтобы я не спал,
не слушал похвал пока не увижу, что выводы из
моих наблюдений сходятся с результатами моих
расчетов или пока в смиренной радости не
открою и не разоблачу свою ошибку.

Синклер Льюис

Любой опыт является диалогом, в котором участвует задающий вопросы экспериментатор и отвечающий на воздействие объект изучения.

В этом диалоге могут возникать досадные ошибки. Вопрос может быть недостаточно конкретным или "непонятным" для собеседника. Вы можете получить ответ не от подопытного, а от совершенно постороннего в данном случае объекта. Быстрая череда вопросов может не оставить времени для ответов; или, напротив, вы начнете прислушиваться с опозданием, когда суть вопроса уже забыта. **Получение истинного ответа обеспечивается правильной организацией опыта.**

Известный афоризм гласит, что физики работают хорошими методами с хорошими объектами, а химики хорошими методами с плохими объектами. Продолжая эту мысль можно сказать, что биология имеет дело с неудовлетворительными методами и с очень плохими объектами. Большое разнообразие биологических форм, их изменчивость в онтогенезе и в поколениях, сложная многоуровневая организация делают работу биолога-экспериментатора особенно трудной. В этом причина низкой воспроизводимости результатов многих исследований, открывающая широкое поле для спекуляций. И как результат - в биологии недостаточно, по сравнению с другими науками, представлены теоретические обобщения.

В доступной нам литературе за 40-летний период работы с растениями не попало ни одной публикации по общей методологии опытов на растениях. Горькая практика собственных ошибок и анализ литературных данных убедили в необходимости такого пособия.

Авторы считали своей целью дать некоторые общие рекомендации по грамотному выращиванию растения и подготовке его для эксперимента, корректному выбору наблюдаемых показателей и времени их регистрации, истолкованию полученных данных. Эти вопросы могут оказаться решающими для получения истинного результата, поскольку в любом опыте присутствуют как минимум 2 независимые стороны - экспериментатор и живое растение, которое воспринимает многие ситуации совсем не так как это нами предполагается. Здесь играют роль очень многие обстоятельства, которые наблюдателю могут казаться второстепенными. Многие мы не знаем, еще больше не замечаем или по своей ненаблюдательности не желаем замечать.

Глава 1. ОРГАНИЗМ РАСТЕНИЯ КАК СИСТЕМА.

Время не быстротечно, просто мы медлительны.

Сумма ДВА И ДВА не равна четырем - она больше четырех на величину И .

Житейские истинны

1.1. УРОВНИ ОРГАНИЗАЦИИ, СИСТЕМНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Центральное место в биологии занимают иерархия живых систем, взаимодействие частей в целостной системе организма. Выделение ряда последовательно подчиненных уровней в организме растения, как и любое дробление целого на части, в известной степени условно. Следуя традиции, можно выделить в порядке возрастания сложности следующие уровни организации: молекулярный, клеточный, тканевой, органный, организменный и популяционный.

Системный подход к изучению биологических объектов ведет начало от работ Бергаланфи. Со второй половины нашего века системная организация биологических объектов рассматривается как их фундаментальное свойство [Анохин, 1978; Беликова, Ляпунов, 1971; Кастлер, 1968; Шмальгаузен, 1982].

При этом постулируются наличие фиксированных связей между частями целого; исчезновение некоторых свойств у частей при включении их в систему; появление у возникшей системы новых свойств, которые отсутствуют у частей при изолированном существовании их [Маркевич, 1968; Сетров, 1966].

Растение имеет четко выраженную биполярную структуру, которую создают его полюса - верхушки побега и корня. Доминирующие центры влияют на другие части целостного организма. Это влияние осуществляется путем создания **физиологических полей** (физиологических градиентов), которые создаются градиентами концентрации гормонов и их ингибиторов, биопотенциалами живых тканей, концентрациями трофических метаболитов.

Физиология растений, имеющая своим предметом исследование взаимодействия процессов и частей в организме, является системной наукой. То же можно сказать и о науках, изучающих взаимодействие растения с внешними факторами (сельскохозяйственная биология, экология растений, биоценология и др.).

Элементарной структурой любого организма, своеобразным "квантом жизни" является клетка. Межклеточные взаимодействия наблюдаются уже в колониях микроорганизмов. У многоклеточных автотрофных организмов основную роль в регуляции высших уровней играют биоэлектрические сигналы, трофический транспорт, конкуренция между органами за метаболиты, гормональная регуляция. Известно, что фотосинтез, репарационные процессы и старение в отсеченном и прикрепленном к растению листе существенно различаются. Это очень затрудняет экстраполяцию результатов, полученных на изолированных органах, на те же структуры в системе организма.

Иерархия регулирования осуществляется на нескольких связанных уровнях [Елисеев, 1983; Ляпунов, 1963; Месарович и др., 1973]. Нижний уровень образуют

системы, которые в нормальных условиях обеспечивают постоянство биохимических параметров клетки. Вышележащий уровень оптимизирует работу первого, изменяя его гомеостатический режим в соответствии с условиями, в которых существует целостная система (организм). Каждый следующий уровень координирует работу частей на предшествующих уровнях, вступая в действие, когда ситуация во внешней среде изменяется. При этом, внешней средой для клетки является орган, для органа - организм и т.д. Напомним, что еще Г. Дришем был сформулирован тезис "судьба клетки есть функция ее положения в эмбрионе".

Характер реакции на регулирующий сигнал зависит от физиологического состояния воспринимающих клеток, т.е. от их компетенции. Благодаря этому ограниченное число гормонов растений способно вызвать широкий круг морфо-физиологических ответов: тропизмы, рост стебля и корня, апикальное доминирование, индукцию цветения, формирование плодов и запасующих органов, период покоя, опадение листьев, старение. Интересующимся системным изложением физиологии гормонов растений можно рекомендовать монографию К. Дерфлинга [1985].

Этим объясняются значительные расхождения физиологических показателей, наблюдаемых у изолированных клеток или органов по сравнению с соответствующими параметрами организма. В качестве примера приведем величину продуктивности фотосинтеза на клеточном и организменном уровнях. При определении ее на высечках листьев получают величины, во много раз превышающие фиксацию углекислого газа целым растением или посевом. В стандартных условиях определения фотосинтеза на высечках скорость ассимиляции зависит только от пропускной способности биохимических систем и диффузии газов из воздуха в клетки. Более низкие показатели фотосинтеза у целого растения обусловлены недостаточной скоростью транспорта ассимилятов, переполнением ими клеток мезофилла и торможением фотосинтеза собственными продуктами по принципу обратной связи. Депрессия фотосинтеза в целостной системе может зависеть и от других причин - недостатка воды в тканях (закрыты устьица), торможения роста (отсутствие потребления ассимилятов и др.). И напротив, стимуляция роста растения, образование различных "депо" для накопления метаболитов (плоды, семена, луковицы и т.д.), усиление транспорта веществ по сосудам способствуют быстрому оттоку ассимилятов из листьев и неизбежно приводят к повышению продуктивности фотосинтеза.

Изучая водный режим методом извлечения воды из тканей листа растворами сахарозы, исследователь определяет силу связи ее гидротированными коллоидами и осмотически активными веществами, Если же водоудержание определяется по скорости потери веса отсеченным листом (метод Ничипоровича), то полученные результаты характеризуют не только физическое водоудержание клеток, но и гидрофобность кутикулы, полноту закрытия устьиц. Водный режим растения в вегетационном сосуде в дополнение к этому будет зависеть от перераспределения воды между органами и эффективности подачи ее корневой системой. В естественной же обстановке глубина проникновения корней в почву и синхронизация онтогенеза с климатическими сезонами в оптимизации водного режима имеют большее значение, чем физическое водоудержание тканей листа.

Большинство принятых в физиологии и агрохимии методов анализа имеют в основе заимствования из классической физики, химии или биохимии, где роль системной организации объекта сравнительно мала. **Но реакции изолированных клеток и тканей на внешние воздействия значительно отличаются от поведения этих элементов, находящихся в системе организма.** И потому использование биологических методов требует от исследователя четкого представления, с каким именно уровнем сложной системы он ведет диалог. Экстраполируя результаты эксперимента на целое растение,

исследователь часто подменяет организменный уровень регуляции клеточным или молекулярным (в пределах которых его выводы справедливы). При смещении уровней организации возникает опасность неправильного выбора режимов воздействия на объект, периодичности взятия проб для анализа, ошибочного истолкования полученных результатов.

Благодаря разновозрастности органов, полярности растения и наличие вертикальных градиентов водообеспечения и снабжения минеральными веществами реакция отдельных листьев на изучаемый фактор будет развиваться не одновременно. Идеальным решением было бы единовременное проведение анализа каждого листа на побеге. Такой подход был использован нами [Коваль, Киселева, 1971], и только благодаря ему удалось выявить временной порядок торможения роста в сопоставлении с ходом обезвоживания различных органов.

В методологии естествознания существует понятие "черный ящик", которым обозначают систему неизвестного устройства, имеющую вход и выход. Конечной задачей исследователя является разделение черного ящика на ряд более мелких черных ящиков и описание законов их взаимодействия. При этом нашего наблюдателя совершенно не интересует внутреннее устройство выделенных им элементов системы (черных ящиков второго порядка). Они становятся предметом изучения других ученых. Во многих естественных науках такой метод достаточен. Биологические объекты чрезвычайно сложно организованы и их части взаимодействуют не только внутри своего уровня, но и со всеми остальными элементами системы. А это изменяет поведение элементов системы.

Непрерывный поток прямых и обратных регулирующих сигналов создает неравновесный, колебательный характер процессов жизнедеятельности [Гудвин, 1966]. Еще Э.С. Бауэр [1935] сформулировал принцип устойчивого неравновесия, который он считал одним из основополагающих постулатов биологии. Таким образом, гомеостаз, как поддержание оптимального состояния внутренней среды организма достигается непрерывной коррекцией, изменением параметров на всех уровнях организации.

Причиной многих разногласий в современной биологии является огромная трудность, связанная с необходимостью одновременно думать о явлениях молекулярного и организменного уровней. Для этого необходимо иметь минимум представлений о промежуточном между ними физиологическом уровне [Холдейн, 1966]. Следует добавить и проблему биологической целесообразности, от которой свободны физика и химия.

1.2. ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛАВНЫХ ФАКТОРОВ.

Как в заранее спланированном эксперименте, так и при наблюдениях в естественных условиях, исследователь сталкивается с одновременным влиянием на растение множества внешних факторов. Первый вопрос, на который необходимо дать однозначный ответ, - это определить, какие условия оказывают наибольшее влияние на изучаемый процесс [Кремянский, 1969]; какие органы и физиологические системы являются ведущими в наблюдаемом феномене. **Эксперимент как диалог наблюдателя с изучаемым объектом будет иметь смысл при установлении первичных связей, а не отдаленных последствий или вторичных несущественных явлений.**

Этот постулат раскрывает источник многих ошибок, особенно частых при экстраполяции результатов упрощенных экспресс-опытов на характеристики целого растения или посева. При работе с селекционным материалом желательно использовать достаточно быстрый метод, позволяющий дать массовую оценку образцов на ранних этапах отбора. Такая диагностика основана на корреляции (но не всегда на функциональной) связи наблюдаемого биохимического или биофизического параметра с

устойчивостью или продуктивностью. Но последние являются итогом многих процессов. Часто их взаимодействия настолько переплетены, что трудно выделить главенствующий фактор.

В таких случаях мы говорим о полигенной детерминации признака. Относительно низкая эффективность таких оценок селекционного материала вызывает много разочарований, причину которых мы рассмотрим на следующем примере.

Предположим, исследователь определил зимостойкость растений, фиксируя температуру гибели клеток листа по вспышке сверхслабого свечения или по необратимому разобщению дыхания от фосфорилирования. Несовпадение полевого испытания с этим экспериментом может иметь несколько причин. Растения могут успешно отрастать и при полной гибели листьев. Использование последних в качестве объекта диагностики дает заниженную оценку сортам, которые зимуют с потерей листьев, но с хорошей сохранностью узлов кущения. И дело не только в различной морозостойкости их тканей. Расположенные в почве узлы кущения зимуют при более благоприятной температуре по сравнению с надземными органами. И чем глубже они залегают, тем выше зимостойкость генотипа. В этом причина ошибок лабораторных оценок этого признака на изолированных узлах кущения. Определенную роль будет играть и ориентация листьев.

Подобные методы диагностики отражают морозостойкость клеток и тканей (но не организма), зависящую от генетически обусловленных свойств молекул биополимеров, структуры мембран и органелл. Морфологические же признаки растения относятся к организменному уровню приспособления.

Углубление в эту проблему приведет к выяснению роли такого организменного процесса, как осенняя закалка и связанное с ней торможение роста [Туманов, 1979], роли рецессивного состояния генов развития (Vrn и Ppd). На каком то этапе исследователь может обнаружить, что гибель в данной зоне определяют не низкие, а повышенные (около 0⁰) температуры под толстым снежным покровом. И, значит, имеет место не вымерзание, а выпревание - процесс с другими защитными механизмами. Для неспециалистов в этой области добавим, что причиной гибели могли быть вымокание, гибель весной от заморозков, осеннее повреждение цикадкой. Устойчивость к ним, конечно же, не тестировалась в нашем эксперименте и требовала иных условий испытания.

Поэтому, **в самом начале работы необходимо изучить экологическую обстановку и выделить условия, которые играют определяющую роль в изучаемом явлении.** Предварительная экологическая проработка может дать указания, на какие процессы следует обратить главное внимание.

Экологической неграмотностью объясняется существование в литературе множества мнений по поводу физиологических механизмов того или иного процесса - будь то гетерозис, устойчивость к неблагоприятным факторам среды, морфогенез или регуляция роста. Биофизик во всех случаях будет сводить суть дела к динамике свободных радикалов; биохимик объяснит их изменением активности ключевых ферментов; специалист в области гормональной регуляции укажет в качестве главной причины соотношение в тканях гормонов и ингибиторов; агрохимик назовет уровень снабжения тканей азотом или фосфором.

Приведенная выше "схема разногласий" несколько утрирована, и, возможно, упрощена. Но она отражает реальное стремление увлеченного своей работой исследователя представить "свою" часть истины как самую основную, как истину в последней инстанции.

1.3 СКОРОСТЬ ПРОТЕКАНИЯ ПРОЦЕССОВ НА РАЗНЫХ УРОВНЯХ

Названные выше разногласия должны разрешаться исходя из различного быстродействия отдельных уровней. Поскольку следствие не может возникнуть раньше причины, динамика развития ответных реакций организма на условия опыта позволяет отделить первичные эффекты их далеких последствий.

Выше говорилось, что любой уровень организации создается взаимодействием элементов нижележащего уровня. Внешние воздействия на растения воспринимаются теми или иными молекулами в виде конформационных перестроек, путем изменения химических реакций и мембранных потенциалов. Это приведет к изменению работы органелл, а реакция многих органелл сдвинет равновесие физиологических процессов в клетке. Клеточная же реакция отразится на градиенте биопотенциалов - самой быстрой реакции органного и организменного уровней. Одновременно на клеточном уровне произойдет усиление или замедление синтетических процессов, благодаря которому в тканях создастся дефицит (или избыток) основных метаболитов. Через некоторое время изменение пула метаболитов произойдет и в других органах, получающих их из органа-донора. Это время будет определяться природой метаболита, скоростью транспорта и расстоянием между органами.

Скорость превращения субстратов в биохимических реакциях достигает 10000 молекул в секунду. Даже если в переходный процесс вовлечены все реакции в клетке, то новое стационарное состояние будет достигнуто менее чем за 15 секунд [Гудвин, 1966]. Скорость передачи волны биопотенциала в растении измеряется десятками см/мин, транспорта метаболитов по сосудам - 1,5 см/мин, транспорт ауксинов - всего от 1 до 3 см/час. Этим величинам адекватна и скорость реагирования систем различной сложности, поскольку она не может быть меньше, чем время, необходимое для передачи сигналов внутри системы.

Для дальнейшего рассуждения очень важен факт увеличения скорости процессов по мере перехода от высших уровней к более элементарным. В единицу физического времени на низших уровнях происходит больше отдельных событий, чем на высших, более сложных уровнях (организменном, популяционном, ценоотическом). **Собственное биологическое время системы измеряется числом событий, произошедших в единицу физического времени** [Холдейн, 1966; Межжерин, 1974]. Поэтому мы вправе говорить о более быстром течении биологического времени на биохимическом и клеточном уровнях и о замедленном биологическом времени на уровне организмов, популяций, ценозов.

С точки зрения медленного организменного уровня все быстропротекающие процессы регулирования на клеточном уровне уже завершились и клетка постоянно находится в наиболее оптимальном (для данных условий) режиме жизнедеятельности. С точки зрения клетки, на организменном и популяционном уровнях вообще ничего не происходит - его процессы слишком медленны, чтобы быть замеченными.

Периодичность наблюдения, взятия проб для анализа во всех случаях должна быть сопоставима со скоростью реагирования того уровня организации, который является объектом нашего исследования. Биология имеет дело с системами, для которых главным свойством является изменение и развитие - динамика во времени. И чтобы зафиксировать ее, наблюдения следует проводить достаточно часто. В противном случае мы рискуем обнаружить только два стационарных состояния - исходное и конечное, без перехода между ними. Если же интервалы между наблюдениями слишком малы, то мы не заметим существенных изменений, т.к. избранные периоды окажутся меньше, чем время реагирования данного уровня системы.

Следовательно, изучение молекулярных или клеточных процессов должно проводиться с малыми интервалами между наблюдениями (от нескольких секунд до одного часа), а при работе на уровне целостного растения - с суточными, недельными и

даже месячными интервалами. Химический анализ растения, проведенный через несколько дней после воздействия на объект, отражает не столько клеточный уровень саморегуляции, сколько корректирующее влияние организма на физиологию клеток данного органа.

Допустим, экспериментатор изучает индукцию нитратредуктазы в связи с внесением в питательную среду нитрата. При исследовании индукции на биохимическом уровне определение нитратредуктазной активности следует проводить в гомогенате или на высечках листа после различных по продолжительности экспозиций его в индуцирующей среде. В случае исследования тканевых процессов используется отсеченный лист. И в процессе индукции могут быть применены ингибиторы синтеза белка, нуклеиновых кислот, разобщители дыхания от фосфорилирования и т.д. При исследовании организменного уровня экспериментатор поместит в питательный раствор корни растения, выращенного на среде без нитратов, а потом определит количество восстановленного азота в листьях разного возраста. Для построения динамической кривой, как и в предыдущих случаях, следует провести достаточно длинный ряд определений, интервалы между ними будут измеряться уже не минутами, а многими часами и сутками.

Полная характеристика индукции этого фермента может быть получена только в том случае, когда определение скорости восстановления нитратов будет проведено в одни сроки во всех органах. В этом случае можно рассчитать баланс активности всего организма и установить долю отдельных его частей. Часто практикуется определение активности фермента только в наиболее молодом листе, но такой опыт ни в коей мере не может дать характеристик растения.

Более или менее полный охват органов растения химическими анализами, да еще при изучении временной динамики, очень трудоемок. По этой причине исследователь обычно определяет только те показатели, которые интегрально отражают общее состояние данного уровня организации. Применительно к целостному организму такими показателями являются сухой и сырой вес растения, площадь листьев, линейные размеры органов и др. Часто приходится сталкиваться с неуважительным отношением к подобным "несовременным" характеристикам как к чему-то мало серьезному, недостойному науки. Здесь уместно заметить, что **ценность представляет не применение в опыте того или иного метода, а те новые мысли, которые экспериментатор извлекает из своих цифровых результатов.**

Глава 3. ПРОДУКТИВНОСТЬ И УРОЖАЙ

Природа снова и снова оказывается гораздо богаче наших представлений о ней, а бесчисленные "сюрпризы", которые она преподносит исследователям делают ее изучение захватывающе интересным.

В. Амбарцумян

3.4 ФОРМИРОВАНИЕ УРОЖАЯ

3.4.1 Фотосинтез посева.

Выше отмечалось, что в клетке максимально возможный потенциальной фотосинтез достигает до 4,5-5,0 % общей энергии падающего света. Это соответствует

получению потенциального урожая сухой биомассы от 90 до 200 тонн на гектар, что во много раз превышает реальные урожаи [Эдвардс, Уокер, 1986]. А.А. Ничипорович [1977] исходя из иных расчетов приходит к тем же 4-5 % потенциального КПД использования света в фотосинтезе. Исходя из этого он определяет потенциальный суточный прирост сухой биомассы в пределах 500-1000 кг на гектар. Реальное суточное накопление биомассы в большинстве случаев не превышает 150-300 кг/га. Рассмотрим формирование урожая и факторы ограничивающие его реальную величину.

В настоящее время точно установлено отсутствие прямой связи интенсивности фотосинтеза с количеством хлорофилла и числом хлоропластов в палисадной паренхиме [Багаутдинова, Иванова, 1973] или фотосинтеза с урожаем того или иного сорта [Кумаков, 1967; Ильиных, Кондратьева, 1970; Голик, Гуляев, 1981; Патуринский, Кумаков, 1989]. В естественном травостое реальная продукция фотосинтеза зависит не от его удельной интенсивности, а от суммарной площади зеленых органов на 1 кв. метре почвы. А урожай зависит от минерального питания и водного режима не меньше, чем от биохимических процессов фотосинтеза.

Конкуренцию в посевах за свет можно уменьшить за счет изменения ориентации листьев, что может дать до 30 % прибавки урожая [Тооминг, 1967]. Некоторые современные сорта за счет рецессивных аллелей **lg1**, **lg2** имеют вертикальные (эректоидные) листья. Свет лучше проникает в глубину такого агроценоза и урожай оказывается выше по сравнению с обычными формами [Lambert, Johnson, 1978]. Благодаря лучшей освещенности эректоидные формы допускают большее загущение посева [Sarca et al., 1984]. Показано, что завешивание небольших грузиков на концы листьев таких сортов приводит к ухудшению освещенности в глубине посева и снижению урожая [Wallace et al., 1972].

3.4.2 Фитоценоз.

Совокупность совместно произрастающих растений образует фитоценоз, наиболее примитивной формой которого является загущенный посев одной линии или сорта. В ценозе действуют новые биологические законы, которые мы никоим образом не можем вывести из биологии клетки или отдельного растения.

Биологическое время ценоза протекает более медленно по сравнению с организменным временем. Поэтому **с позиции ценологического уровня все составляющие его организмы статичны и постоянно находятся в режиме, наиболее оптимальном для данных экологических условий. С позиции же организма ценологические процессы протекают настолько медленно, что его изменения не заметны для более быстрых реакций нижележащих уровней.**

Генетико-физиологические системы засухоустойчивости дают существенный вклад в урожай на фоне лимита влаги и не влияют на него при оптимальном водообеспечении. Напротив, все гены, увеличивающие число цветков и соцветий могут увеличить урожай только при условии обильного питания или в разреженном посевах. В генетике это явление обозначено тяжеловесным термином "экологическое переопределение генетической формулы признака". Именно оно вынуждает нас проводить многолетние экологические испытания новых сортов до передачи их в производство.

Возникающие в фитоценозе новые признаки носят название групповых [Малецкий, 1982]. На отдельных растениях мы не можем оценить устойчивость посева к полеганию, процент погибающих в процессе вегетации растений, взаимное затенение листьев в нижних ярусах травостоя, конкуренцию за влагу и минеральные элементы. На отдельно стоящем растении или на одно-двухрядковых делянках невозможно оценить и величину урожая в сомкнутом посевах. И следует взять за правило: **никогда не судить об урожае по отдельным растениям и однорядковым делянкам.** Подчеркиваем это особо, поскольку многие селекционеры при отборе ориентируются на "урожай" с однорядковой делянки.

В ценозе на долю одного растения приходится ограниченный объем воздуха и почвы. Этот объем вместе с приходящимися на долю каждого индивида ресурсами биотических и абиотических факторов жизни образует экологическую нишу. Расширение своей экологической ниши за счет соседей мы определяем как внутривидовую и межвидовую конкуренцию. Размеры экологической ниши уменьшаются по мере увеличения числа растений на единице площади или при снижении запасов экологических факторов. Соответственно этому, по мере загущения продуктивность падает. Оптимальная густота посева выбирается по признаку полного освоения растениями наиболее лимитированного экологического фактора. В засушливых зонах это запасы влаги, а во влажных - количество элементов минерального питания или света, проникающего в глубину травостоя.

Высокая продуктивность отдельного растения еще не свидетельствует о большом урожае, который зависит от числа растений на единице площади и от "ценотического взаимодействия", т. е. степени снижения продуктивности отдельных растений по мере загущения травостоя (Рис. 3.5).

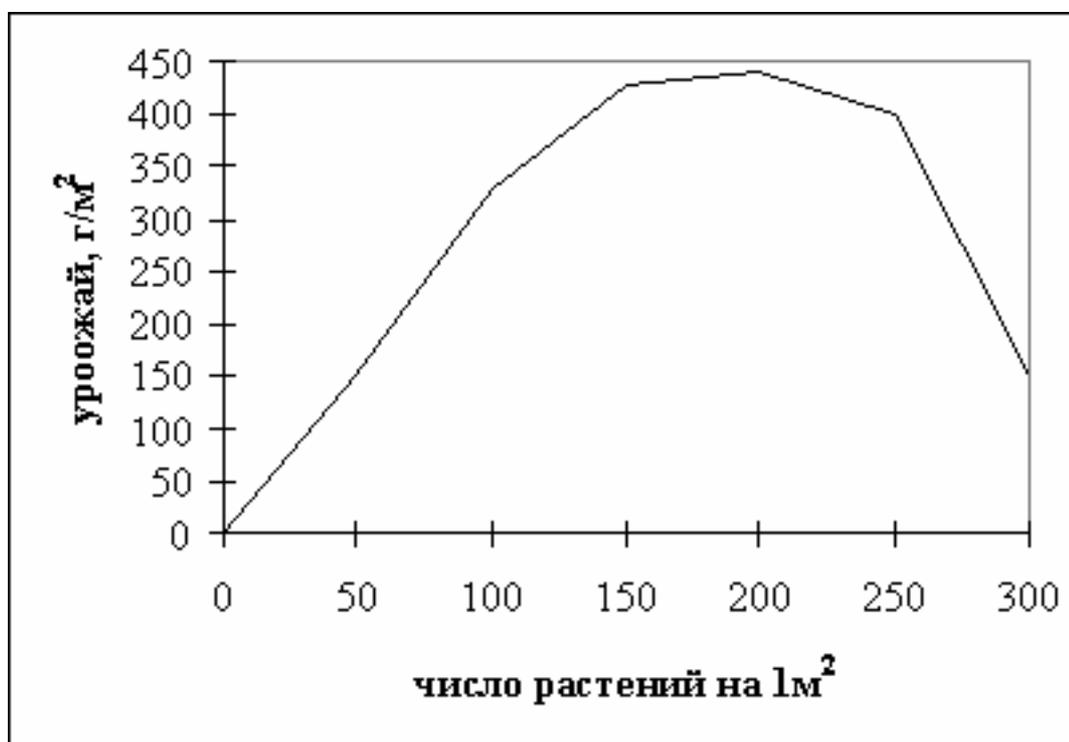


Рисунок 3.5. Изменение урожая в зависимости от плотности посева.

Из всего сказанного выше следует, что **урожай лимитируется в жестких экологических условиях устойчивостью к неблагоприятным факторам среды, а в близких к оптимуму - конкурентоспособностью растений.**

Таким образом, первичным источником формирования растительной биомассы является процесс фотосинтеза. Потенциальная интенсивность фотосинтеза огромна, но на пути реализации его в продуктивность и урожай происходят потери, связанные с низкой величиной конкуренции растений в ценозе (посеве), торможением фотосинтеза и роста растения неблагоприятными экологическими факторами, потерей части биомассы при повреждении болезнями и вредителями.

Глава 4. ВЫБОР МОДЕЛЬНОГО ОБЪЕКТА

Знание принципов легко возмещает незнание некоторых фактов.

Гельвеций

Естествознание занимается изучением воспроизводимых явлений природы. Это означает, что первым требованием к эксперименту будет возможность достаточно точного повторения его другими исследователями с получением тех же результатов. А для этого необходимо фиксировать в лабораторных журналах не только условия постановки опыта и методику наблюдений, но и точную характеристику объекта и его происхождение.

Но биологические объекты, в отличие от таковых в физике и химии, с трудом поддаются стандартизации. Дисперсия их свойств имеет как генетические, так и паратипические (экологические) причины. Влияние экологических факторов на объект эксперимента рассматривается в других главах этой книги. Предметом данной главы будут технические и генетические аспекты проблемы.

Итак, главные критерии выбора объекта, на котором будет проводиться запланированное исследование, это **удобство** для работы и **воспроизводимость** получаемых результатов.

4.1 УДОБСТВО МОДЕЛЬНОГО ОБЪЕКТА.

Сошлемся на общеизвестный факт. Если бы финансовые затруднения не заставили Т. Моргана отказаться от опытов на морских свинках и обратить внимание на дрозофилу, генетика возможно, не стала бы лидером современной биологии. Дело в том, что последний объект давал возможность получить новое поколение в течение месяца и тем самым резко ускорить работу. И напротив, именно использование неудобных для генетики плодовых культур Мичуриным и Бербанком помешало этим великим ученым понять глобальное значение законов Менделя.

Необходимо, чтобы выбранный нами модельный объект не затруднял, а облегчал решение поставленной задачи. В то же время, полученные результаты должны без натяжки экстраполироваться на возможно более широкий круг иных объектов и явлений. Поэтому, избранная модель должна иметь как можно меньше специфических свойств, делающих ее несравнимой с другими интересующими нас растениями. С другой стороны, модели необходимы некоторые характеристики, облегчающие постановку эксперимента. Из этого следует, не существует универсального модельного объекта на все случаи жизни. В каждой конкретной ситуации экспериментатор, взвешивая все *pro* и *contra*, находит оптимальный вариант. Поэтому все приведенные ниже соображений носят рекомендательный характер и возможность их воплощения зависит от конкретной цели исследования.

4.2 ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ.

Суть этого раздела состоит в том, что **при повторении эксперимента или его продолжении мы должны использовать тот же самый объект**. Это, казалось бы, азбучное требование на деле совсем не просто выполнить. Большинство не линейных образцов имеют сложную популяционную структуру и частоты отдельных генотипов в них могут сильно изменяться по поколениям [Агаев, 1987; Коваль, 1993]. При репродукции в различных регионах частоты генотипов в коммерческих сортах настолько изменяются, что спустя 8-10 лет под единой этикеткой оказываются совершенно

различные образцы. Из этого следует, что семенной материал районированных сортов нужно получать только от их создателей. Многие селекционные центры постоянно высевают демонстрационные коллекции своих старых сортов.

4.2.1 Полиморфные образцы.

Показано, что частоты отдельных аллелей в популяции сорта изменяются как с возрастом сорта, так и в зависимости от места репродукции. Причины изменения структуры популяций следующие:

1. неодинаковое давление естественного отбора на различные биотипы популяции,
2. перекрестное опыление, имеющее место у большинства видов-самоопылителей,
3. возникновение мутаций,
4. и, конечно, механическое засорение.

Последнее случается гораздо чаще, чем принято думать. По этой причине, вновь полученные образцы не следует сразу же запускать в работу. Их надо пересеять, оценить на типичность и, если требуется, прочистить от засорения.

При многолетней работе исследователь обычно не получает ежегодно свежий запас семян со стороны, а пользуется семенами своего урожая. Такие образцы семян по необходимости малы и редко превышают 100-500 г. **Здесь возникает еще один источник изменения структуры популяций, который называется "эффект основателя"**. Дело в том, что даже очень редкий в популяции биотип может случайно попасть в малый (например - 50 зерен) образец, где его процентное содержание при последующем размножении окажется непропорционально высоким. Но более вероятен противоположный случай - полное выпадение редких генотипов при формировании малого образца.

К сожалению, это не учитывалось при формировании наиболее старой части коллекций ВИРа - популяционная теория тогда еще не существовала. Сохраняемые в ней живые образцы в результате изменения частот биотипов при пересевах и механического засорения часто имеют мало общего с уникальными сортами-популяциями 1920-х годов. Сами же эти популяции погибли необратимо. В настоящее время корректному сбору и сохранению генофонда во всех странах уделяется большое внимание [Матвиенко, 1982; Смирнов, Соснихина, 1983; Витковский, Кузнецов, 1989; Свамнатан, 1989; Штуббе и др., 1989; Kilpatrick, et al., 1985].

При анализе отдельных растений полиморфизм образца может привести к тому, что в последовательном ряду проб или в парах контроль - опыт будут взяты различные по своим свойствам генотипы. **В этом случае исследователь рискует принять различия между генотипами за эффекты изучаемых в опыте факторов**. Поэтому настоятельно рекомендую во всех работах, связанных с анализом отдельных растений или небольших объемов биомассы, использовать только чистые линии.

Несмотря на предупредительные меры засорение и изменение образцов все же происходит. В доступной авторам литературе нигде не оговариваются классы чистоты образцов, подобно установленным в химии характеристикам реактивов. Чистоту образцов по засорению и направление их использования можно стандартизировать по аналогии с индексацией в химии [Коваль, 1993]:

1. "**Эталон**" образец, сохраняемый без посева в том виде, как он был получен исследователем со стороны (от создателя образца, из другого учреждения или банка, собран в дикой природе или создан самим исследователем). Сохраняется даже после потери всхожести для возможных анализов маркеров. Все присутствующие в нем генотипы не считаются засорением, а относятся к полиморфизму образца. Линейные образцы фактически имеют нулевое засорение.

2. "**Для генетического анализа**". Получен посевом "эталона" и в дальнейшем репродуцируется только при изоляции соцветий (индивидуальной или групповой в зависимости от биологии опыления). Используется в генетических исследованиях и при

анализе малого количества биомассы в биохимии и клеточной биологии. Засорение: возможны мутанты с частотой 1/100000.

3. "**Для физиологии**". Получен в первой репродукции без изоляторов образца предыдущего класса, на семена, как правило, не оставляется, а возобновляется из семян "для генетического анализа". Используются в лабораторных, вегетационных и микроделяночных (рядковых) полевых опытах при количестве сырой биомассы, потребной для одного анализа от 10 до 50 г. Засорение: мутанты и примеси до 1/500.

4. "**Для полевых опытов**". Получен 1-2 кратным пересевом образца 3-го класса, дальнейшее репродуцирование нежелательно кроме случаев специальных популяционных исследований. Допустимо возобновление непосредственно из крупной партии образца 1-го класса (эталона). Используются в полевых опытах по сортоиспытанию, агрохимии, земледелию и т.д. Допустимое механическое и гибридогенное засорение: до 1 %.

В заключение этой главы сформулируем несколько основных правил:

1. Никогда не пользоваться случайно подвернувшимися под руку растениями или семенами.
2. Постоянно поддерживайте коллекцию наиболее интересных образцов. Это экономит время, необходимое для получения материала из ресурсных банков.
3. Прежде чем приступить к самостоятельному созданию объектов для эксперимента узнайте, не имеется ли подобный материал в ресурсных банках.
4. Если это возможно, получайте семена коммерчески сортов и селекционные образцы непосредственно от их создателей, а не от пользователей-посредников.
5. Не включайте в опыты только что полученные образцы. Даже в наиболее солидных учреждениях возможна путаница с названием образцов или их засорение. Все вновь полученные образцы следует пересевать для проверки на чистоту и соответствие их фенотипа сопроводительным документам.
6. Если работа предполагает анализ отдельных растений, следует использовать только генетически однородный материал (чистые линии или межлинейные гибриды первого поколения).
7. Будьте осторожны в уничтожении казалось бы ненужных образцов (даже если они потеряли всхожесть). Возможно, через несколько лет вам потребуется изучить некоторые их характеристики. Следует помнить, что смешать и выбросить семена никогда не поздно.

Глава 6 НАБЛЮДЕНИЯ И ИСТОЛКОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хочешь быть умным, научись разумно спрашивать, внимательно слушать, спокойно отвечать и переставать говорить, когда нечего сказать.

И. Лафотер

Экспериментатор обязан ставить такие опыты, которые бесят теоретиков.

П.Л. Капица

6.1 ЗНАЧЕНИЕ ИСХОДНОЙ ГИПОТЕЗЫ В ВЫБОРЕ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ НАБЛЮДЕНИЯ

6.1.1 Немного теории.

Любой опыт должен планироваться и выполняться в рамках, каких то теоретических **концепций**. Концепциями называются идеи или обобщенные понятия, направляющие наши размышления и исследования в определенном направлении. К концепциям относятся:

- определения, т.е. полезные понятия, получаемые из экспериментов (клеточное строение биологических объектов, зональное распространение растительности по земному шару, пищевые цепи в экологии, гомеостаз и др.). **В частности одной из концепций этой книги является постулат о различной скорости биологических процессов на разных уровнях организации;**

- классификации объектов по тому или иному признаку;

- понятия, придуманные для облегчения анализа и осмысливания результатов наблюдений (полулетальная доза, К/хоз как доля ценной для нас части в общей биомассе, интенсивность фотосинтеза, транспирационный коэффициент);

Концептуальные идеи служат основой для выведения из них простой схемы изучаемого явления - т.е. построения **теории**, что и является конечной целью любой области естествознания. Таким образом, теории представляют собой мысленные схемы с допущениями, которые подбираются так, чтобы получилось согласие с результатами экспериментов. Но слишком большое число умозрительных идей и предположений в теории противопоказано. **Теория будет хорошей, если она наиболее простая, доступная для проверки, плодотворна в плане предсказания результатов наблюдений и возможности новых теоретических построений.** При ее оценке, прежде всего, следует спросить: настолько ли она проста, как это только возможно, и насколько хорошо она позволяет предсказать явления и дальнейшие события. Но **вопрос о том, насколько она правильна - не вполне справедливое требование.**

В основе теории лежат **законы** - т.е. удобные соглашения, позволяющие привести в систему имеющиеся факты. Законом считается положение, которое имеет применение в наибольшем числе случаев и наилучшим образом соответствует теории, связывающей воедино огромное многообразие наших знаний о природе. Большинство законов это отражение явлений природы, которые мы рассматриваем, абстрагируясь от случайных факторов. Другой основой теории является набор **аксиом** - условий, которые не поддаются проверке и принимаются на веру в качестве отправного пункта наших рассуждений.

Любая теория может быть справедливой только по отношению к лежащим в ее основе допущениям и аксиомам. При построении новой теории или при проверке существующей создаются **гипотезы** в качестве удобных предположений, которые, в отличие от аксиом, поддаются проверке. Основное назначение гипотезы служить отправной точкой для экспериментальной проверки теории.

Для чего ставят опыты? Опыт, как искусственная упрощенная модель какой то реальной ситуации, может преследовать две цели. Прежде всего, проверку тех или иных гипотез, их уточнение и совершенствование. Именно к этой категории относится большинство экспериментальных работ в академических лабораториях. Но наибольшее число экспериментов проводится в плане разработки каких-то технологий, будь то испытание новых машин, лекарств или схем агротехники. При всей практической направленности эти опыты так же являются проверкой теоретических предпосылок и уточнением наших знаний в данной области. **Любой опыт на растении является вопросом, заданным**

нами объекту, на который мы желаем получить ответ. А этот вопрос должен быть поставлен с учетом всех наших знаний по данной проблеме.

Таким образом, цель эксперимента - проверка какой то гипотезы с целью уточнения или опровержения теории. Замысел и планирование эксперимента должны быть полностью подчинены этой цели. Полученные в опыте результаты должны указать дальнейшее направление исследования и потому корректно полученный результат не может допускать двусмысленного толкования. Но каждый факт нуждается в комментариях (критическом анализе степени точности, пределов применимости, воспроизводимости результатов, в новых гипотезах). По мере накопления фактов мы начинаем все больше зависеть от теории, в рамках которой рассматриваются результаты эксперимента. Из этого следует, что **любой опыт должен планироваться и осуществляться только в рамках определенных гипотез, истинность которых он проверяет.**

6.1.2 Выбор наблюдаемых параметров.

Выше отмечалось наличие у растений неспецифичной реакции на самые разнообразные экологические факторы. Но в любом случае мы можем обнаружить в пределах нормы реакции и специфические для данной группы воздействий изменения. Они в первую очередь и являются объектом наблюдения. Исследователь, выбирая для наблюдения тот или иной физиологический показатель, исходит из поставленной задачи. Параметр, по изменению которого предполагается контролировать состояние целого растения или отдельных физиологических систем, должен отвечать ряду условий. Важнейшими из них будут следующие:

1. данный показатель должен иметь, возможно, меньшее генетическое варьирование внутри изучаемой популяции или сорта. В ряде случаев это условие достигается использованием чистых линий;
2. при исследовании специфической реакции желателен выбор показателя, который мало зависит от колебания тех фоновых экологических условий, которые плохо поддаются стандартизации. В противном случае будет иметь место широкое варьирование и статистическая достоверность опыта снизится;
3. важным условием является удобство измерения наблюдаемого параметра и однозначное истолкование полученных результатов.

Последний пункт нуждается в дополнительном рассмотрении. Существует много физиолого-биохимических показателей, которые исследователи без долгих размышлений включают в свои наблюдения, но столь же дружно оказываются не в силах истолковать полученные результаты. Лет 30 назад работы "украшались" многочисленными определениями активности каталазы (единственная причина тому была простота измерения активности этого фермента). Это придавало работе определенный биохимический оттенок, хотя для читателя оставалось непонятным, какое отношение имеет каталаза к выбору оптимального режима активного вентилирования семенного зерна, установлению доз фосфорных подкормок или к отбору урожайных гибридов капусты. Роль каталазы в физиологии на уровне организма не изучена до настоящего времени. Понятно, что изменение активности фермента, роль которого не ясна, не поддается истолкованию, и автор вынужден ограничиться спекулятивными предположениями. При большой добросовестности в выводах статьи просто отмечается, что в таком-то варианте активность фермента была на столько-то выше, а в таком-то на столько-то ниже, чем в контроле.

Я не намерен отрицать роль определения изоферментного спектра каталазы (или любого другого фермента) при изучении белкового синтеза, активации генов и в ряде других биохимических и генетических работ. Но следует со всей решительностью возразить против бессмысленного набора не поддающихся толкованию наблюдений.

Можно предвидеть контр аргумент - необходимо накапливать факты, которые позднее будут использованы другими исследователями для теоретических обобщений. Такое использование чужого цифрового материала возможно только при хорошем знакомстве с условиями постановки опыта, а в большинстве работ этот вопрос освещается недостаточно. Поэтому подобные не интерпретированные результаты очень редко цитируются последующими авторами и оказывают мало влияния на теоретические построения. **Задачей науки является построение удобной модели для объяснения и предсказания явлений природы** и в этом плане неистолкованные результаты работы - признак ее неудачи.

В настоящее время инструменты такой сложности, как электронный микроскоп или масс-спектрометр, чрезвычайно модны в биологическом исследовании и мы наблюдаем много примеров, когда использование их в научной работе диктуется не логикой замысла исследователя, а наличием в институте соответствующих приборов. В итоге, развилась своеобразная “приборная болезнь”, выразившаяся в лавине публикаций, например, по аминокислотному составу зерна, листьев, корней, по большей части не связанных с проблемой улучшения пищевого качества белка или контроля за его синтезом.

Аналогичная картина наблюдалась и в связи с широким распространением хроматографии регуляторов роста. Не ставя под сомнение техническую корректность этого метода, отметим, что установление наличия различных гормонов и ингибиторов в каком-то органе, химическая идентификация их и определение активности еще ничего не говорит о гормональной обстановке в других органах и в организме в целом. Хроматография усредненного образца из всей массы растения так же не решает вопроса, поскольку действие гормонов имеет локальный, местный характер. Различия в активности гормонов, соотношение их с ингибиторами значительны даже в тканях одного органа. При анализе же образцов органов и целых растений эти различия могут теряться. Все это снижает познавательную ценность хроматографического определения регуляторов роста в опытах с целым растением. И не случайно наибольшие успехи в изучении физиологии гормонов с использованием хроматографии достигнуты на культуре изолированных клеток, отрезках coleoptилей, гипокотилей, каллусах, мало дифференцированных проростках, т.е. на клеточном и тканевом уровнях организации.

Если учесть, что стандартным биотестом на многие регуляторы роста являются coleoptили злаков, чувствительность которых к гормону может сильно отличаться от реакции тканей изучаемого растения (например, яблони, огурцов, люцерны), а так же взаимодействие различных компонентов, то очевидными будут ограниченные возможности данного метода.

Всегда следует помнить, что **с увеличением технической сложности метода или прибора возрастает и число возможных ошибок** от некорректной подготовки образца, неправильной калибровки прибора, нарушения регулировки или в связи с недостаточным техническим уходом за установкой. Точность современного научного оборудования весьма притягательна, как и быстрота выполнения анализов. Возможности исследователя при этом возрастают во много раз, но он никогда не должен забывать, что самый совершенный прибор не исправит артефакта, возникшего от неправильного выращивания растений, служащих объектом опыта, или несоответствия запланированного и фактического режимов воздействия на объект. Поэтому следует принять за правило: **никогда не пользоваться приборами и аналитическими методами, более сложными, чем это необходимо для достижения замысла исследователя.**

Рассмотрим один пример. Допустим, исследователь занят изучением явления гигантского роста, характерного для травянистой растительности Сахалина, высокотравья черневой тайги Салаирского кряжа и для ряда других местообитаний. Если планируется

изучить механизмы стимуляции роста в этих условиях, то в арсенал методов войдут: исследование скорости деления и растяжения клеток, гормонального режима тканей, синтеза нуклеиновых кислот и белка. По всем этим показателям исследователь, безусловно, получит превышение высокорослых образцов по сравнению с их аналогами из других местообитаний. Но они ничего не скажут о внешних факторах, породивших гигантизм трав в этих регионах. Неясной останется и первичная физиолого-биохимическая причина стимуляции роста, т.к. сравнивая высокорослые растения с контролем, мы наблюдаем картину, в которой первичные изменения затерялись среди вызванных ими вторичных изменений.

В данном случае физиолого-биохимический подход оказывается бессильным решить вопрос о внешней причине стимуляции роста. Проведя анализы почвы, измерения освещенности и водного режима растений, организовав гидрометеорологические наблюдения можно обнаружить по всем этим показателям существенные отличия в местах произрастания высокотравья от других территорий. Далее, в зависимости от склонности исследователя, можно называть в качестве главной причины повышенное содержание в почве марганца, усиление ультрафиолетовой радиации или любой другой фактор.

Но если осуществить технически простой вегетационно-полевой опыт по выращиванию высокорослого сахалинского гороха на сахалинской же почве, но перевезенной в иную климатическую зону, то легко убедиться, что как обычные, так и высокорослые образцы растут на местных почвах (того же типа) лучше, чем на сахалинской. На Сахалине же гигантизм наблюдается и на инорайонной почве. Для недвусмысленного заключения о том, что не почвенный фактор создает явление сахалинского гигантизма, оказалось достаточно регистрировать только два параметра: сухой вес и высоту растения.

Остановимся на вопросе о выборе параметров наблюдения в зависимости от изучаемого уровня организации. В предыдущих главах отмечалась необходимость учета скорости протекания процессов на исследуемом уровне. В самом общем виде можно сказать следующее: чем выше уровень организации живой системы, являющейся объектом исследования, чем больше пестрота условий, тем более интегральными должны быть методы наблюдения и регистрируемые параметры.

В лабораторном опыте при работе на клеточном или тканевом уровне организации для исследования водного режима широко применяется определение связанности воды, диэлектрической проницаемости и коэффициента самодиффузии. При исследовании на уровне организма (вегетационный опыт) с этой целью используют показатели интенсивности транспирации и водного дефицита органов растения. А в случае изучения посева или естественного фитоценоза основными показателями водного режима становятся гидрометеорологические наблюдения, определение баланса поступления и испарения воды, а также исследование водного потенциала в системе почва - растение.

Уже на этапе планирования эксперимента необходимо составить четкое представление о том, какие уровни организации играют основную роль в интересующем нас явлении и, в соответствии с этим, выбрать наблюдаемые параметры и методы их регистрации.

В качестве иллюстрации приведем еще один пример. При отборе среди гибридов или мутантов по быстроте усвоения нитратного азота в качестве измеряемого параметра можно пользоваться определением *in vivo* или *in vitro* активности нитратредуктазы. В зависимости от генетических особенностей образца величины ее активности могут различаться в 5-30 раз. Фермент, обнаруживающий высокую активность в экстракте, дает в интактной ткани более слабое восстановление NO_3 из-за наличия в листе каких-то ингибиторов. Уровень этого ингибирования по сортам сильно колеблется. Значит, при

селекционном отборе по активности экстрагированного фермента, мы дадим высокую оценку многим растениям, которые фактически слабо усваивают азот. Поскольку при селекционном отборе исследователя интересовала оценка на уровне организма и посева, следовало в качестве измеряемой величины выбрать параметр того же уровня.

6.2 ДОЗИРОВКА ВОЗДЕЙСТВИЯ И ДИНАМИКА НАБЛЮДЕНИЯ

Ранее мы отмечали, что главная трудность в проведении количественных измерений в биологии связана с высокой изменчивостью всех параметров во времени. Отсюда ясно значение правильного выбора момента проведения наблюдений, их периодичности. В разделе 1.3 был уже рассмотрен вопрос о соответствии момента наблюдения скорости реагирования на изучаемом уровне организации.

6.2.1 Эффект дозы.

Действие любого внешнего фактора в зависимости от его дозы (силы воздействия) графически выражается одновершинной кривой. Это справедливо независимо от того будем обозначать этим термином концентрацию, продолжительность экспозиции или абсолютную величину (градусы, калории) действующего фактора. Кривая доза-эффекта распадается на: а) подпороговую зону, когда доза фактора слишком слаба для того, чтобы ее воздействие проявилось; б) зону стимуляции физиологических процессов; в) зону угнетения; г) летальную зону.

На рисунке 6.1 представлены кривые доза-эффекта для трех категорий веществ: ядов (А), гормонов (Б) и элементов минерального питания (В). Они различаются по амплитуде стимулирующих концентраций и углу наклона восходящей и нисходящей ветвей кривых. Для гормонов, элементов минерального питания и многих экологических факторов характерно наличие плато в средней части кривой, означающее, что изменение дозы в этом интервале не влияет на наблюдаемый эффект. Это связано с высокими регуляторными возможностями растения в отношении этой группы факторов. Характеристика ширины плато или, напротив, заостренности пика кривой могут быть использованы в качестве показателя адаптационных возможностей живой системы по отношению к изучаемому воздействию.

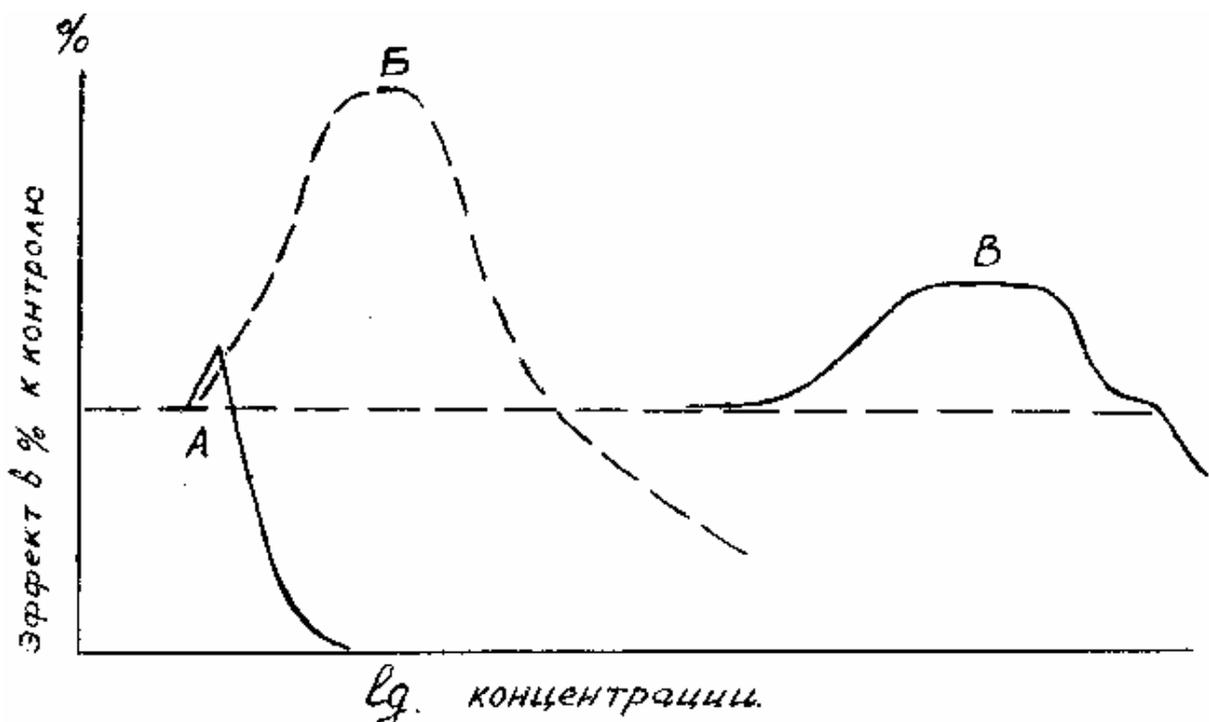


Рисунок 6.1. Кривые доза-эффекта для трех категорий веществ: ядов (А), гормонов (Б) и элементов минерального питания (В).

Эффект дозы можно оценить и по углу наклона кривой. На значительном участке как восходящей, так и нисходящей ветвей обнаруживается прямо пропорциональная зависимость эффекта от логарифма дозы. Угол наклона в этой части выражает коэффициент пропорциональности между изменением дозы и наблюдаемым эффектом.

На этом основан принцип составления шкалы изучаемых концентраций при работе с веществами неизвестной активности. В подобных случаях для рекогносцировочных опытов следует использовать ряд дозирок, в котором логарифм каждой последующей превышает логарифм предыдущей примерно в два раза. Физические концентрации в таком ряду выражаются цифрами: 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000. В полулогарифмической системе координат восходящая и нисходящая ветви эффектов описанной шкалы дозирок близки к прямой линии. Полулогарифмическая шкала используется на практике для калибровки дозовых эффектов фитогормонов (рис 6.2).

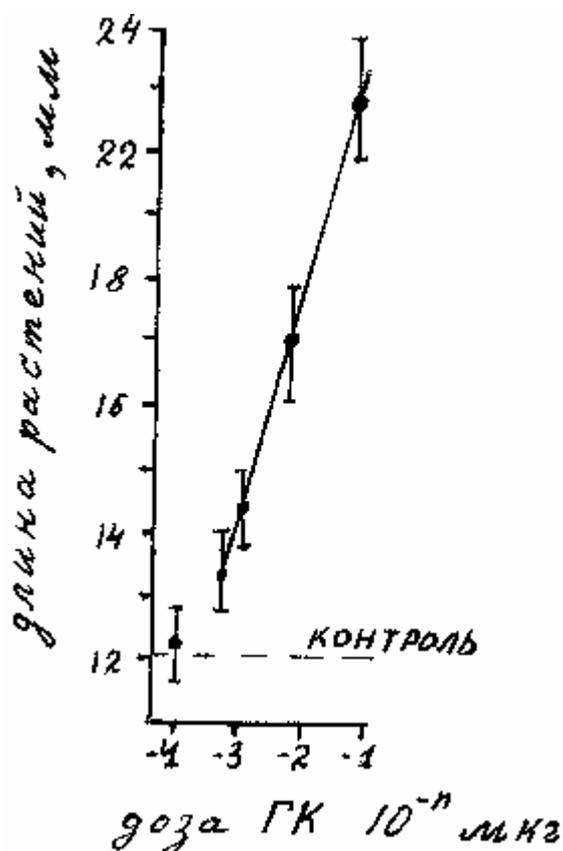


Рисунок 6.2. Полулогарифмическая кривая для гибберелловой кислоты.

Предлагаемая шкала концентраций позволяет достаточно полно охватить все характерные участки кривой доза-эффекта. На наш взгляд она более экономна, чем ряд в арифметической прогрессии дозирок изучаемого вещества. Понятно, что изучение фактора в этой шкале может дать только общее представление об особенностях реакции растения. Изучение доза-эффекта в экстремальных зонах кривой потребует дополнительных опытов с использованием более подробной, но ограниченной по диапазону шкалы.

Установление характера кривой доза-эффекта может иметь самостоятельное значение, но чаще всего опыты такого рода используются для калибровки и установления

оптимальной дозы для последующих опытов. Если желательно получить максимальный эффект, то надо пользоваться дозами, соответствующими началу или середине плато на кривой доза-эффекта. При работе на восходящей и нисходящей ветвях кривой удобно пользоваться той дозой, которая дает половину стимуляции или угнетения от их максимальной величины. Такая доза, обозначаемая D_{50} , очень удобна при работе с различными регуляторными и защитными системами растения. Так при изучении лучевого поражения, действия радиопротекторов, ядов используется доза, вызывающая гибель пятидесяти процентов подопытных особей (L_{50}).

6.2.2 Парадоксальный эффект.

Описанная выше одновершинная кривая доза-эффекта наблюдается не всегда. В некоторых случаях кроме главного максимума могут появляться дополнительные. При работе в узком диапазоне концентраций, с малым числом градаций редко удается заметить дополнительные зоны эффективного действия. Экспериментатор обычно использует в качестве минимальной ту дозу (концентрацию, продолжительность воздействия и др.), эффект которой не отличим от фона, и тем самым исключает из наблюдения более низкие дозировки. Но именно они могут дать значительный по силе и неожиданный по характеру эффект.

Это явление, названное парадоксальным эффектом [Schftz et al., 1964], проявляется при обработке различными химическими веществами. Имеются сведения о проявлении этого эффекта при радиоактивном облучении [Иванов, 1974]. Он наблюдался нами на проростках пшеницы и ячменя [Коваль, 1972]. На рисунке 6.3 приведен результат опыта по влиянию гиббереллина ГК₃ на рост эпикотили всходов. При замачивании семян в растворе с концентрацией 100 мг/л кроме основного пика стимуляции при экспозиции в растворе 24 часа обнаружился дополнительный - при 1-часовой инкубации. Шестичасовая инкубация в этом же растворе приводила к уменьшению длины эпикотили по сравнению с контролем.

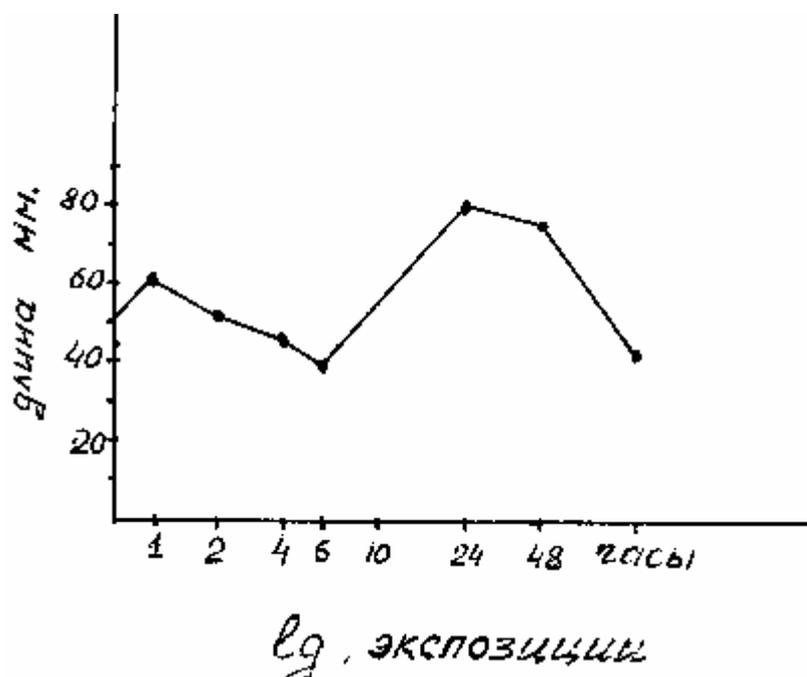


Рисунок 6.3. Парадоксальный эффект роста эпикотили (мм) от продолжительности инкубации в растворе гибберелловой кислоты (100 мг/л).

Сейчас нет общепринятого объяснения парадоксального эффекта. Мы подробно остановились на этом мало известном явлении, поскольку пренебрежение возможными

эффектами доз подпороговой зоны может стать причиной недоразумений, особенно в экологических исследованиях при установлении предельно допустимых антропогенных загрязнений среды.

6.2.3 Динамика наблюдений.

Сроки проведения наблюдений и их периодичность определяются скоростью развития физиологических процессов. Последняя, в свою очередь, зависит от дозы действующего фактора и условий предшествующего выращивания подопытных растений. В ряде областей исследования (например, при изучении адаптации растений) временная динамика развития реакции на внешний фактор может быть самостоятельным объектом исследования. Но во многих случаях развитие физиологических процессов во времени интересует исследователя только в связи с вопросом выбора момента регистрации изучаемого эффекта.

На рисунке 6.4 приведены наблюдения П. Илиева [1969] над изменением скорости роста (% к контролю) молодых растений в связи с двухминутным повышением температуры воздуха до + 45 °С. Растения предварительно выращивались при температуре: 1 - 12-14°; 2 - 16-18°; 3 - 20-22°; 4 - 20-22 °С.

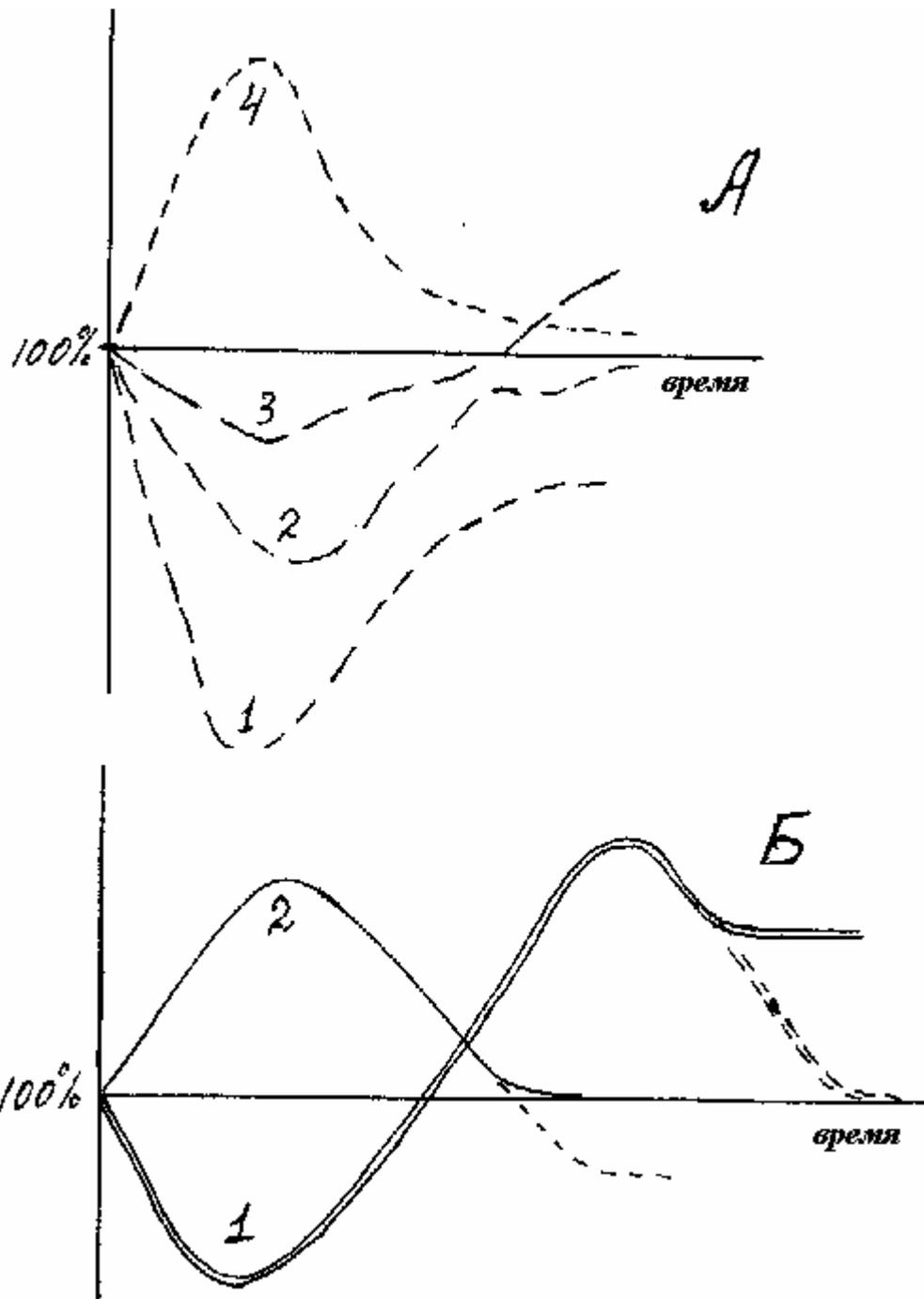


Рисунок 6.4. Динамика стимуляции и угнетения роста при различных типах воздействия (по Иллиеву).

На нашем рисунке варианты обозначены соответствующими цифрами около кривых. Растения первого варианта, для которого перепад температуры был наибольшим, показали сильную депрессию роста, которая не компенсировалась в ходе опыта. Варианты два и четыре имели противоположные по форме кривые угнетения (2) и стимуляции (4) роста, которые к концу опыта затухали. В третьем варианте незначительная депрессия первых дней после воздействия далее сменилась стимуляцией роста.

На чертеже (Б) того же рисунка изображены две формы реакции растений (по П. Иллиеву) на всевозможные внешние воздействия: секундная (1), начинающаяся с фазы угнетения и переходящая со временем в стимуляцию; стартовая (2), начинающаяся сразу

со стимуляции без фазы депрессии. Секундная реакция может сохраняться длительное время или угаснуть, что изображено на рисунке (Б) штриховой линией. Стартовая стимуляция регистрируется сразу после воздействия, но интенсивность реакции растения быстро снижается до уровня контроля.

Сравнивая схемы (А) и (Б) данного рисунка легко установить, что кривая 3 на схеме (А) является секундной реакцией, а кривая 4 - стартовой. Таким образом, один и тот же внешний фактор в зависимости от состояния растения способен вызвать некомпенсируемое подавление процессов (1), временную депрессию их (2), секундную (3) или стартовую (4) стимуляцию. При одинаковой физической дозе воздействия (+ 45° x 2 мин.) различия в реакции объекта создавались неодинаковой температурной адаптацией.

Позднее П. Илиев показал, что при воздействии повышенной температурой и хлористым натрием, второй фактор усиливает торможение роста, вызванное первым, если в промежутке между ними не закончились переходные процессы и не установилось новое стационарное [Пасынский, Дечев, 1961] состояние.

Из этого следует практический **вывод о непригодности переходного периода между стационарными состояниями для регистрации наблюдений.** Если накануне эксперимента с растениями, выращенными в факторостатных условиях, из-за неисправности регулирующих механизмов произойдет резкое повышение или понижение температуры, исследователь должен отложить опыт на несколько дней для восстановления равномерного течения физиологических процессов. В таких случаях не надо успокаивать себя тем, что скачек условий был кратковременным, или ссылаться на соблюдение равенства условий в опыте - все варианты подверглись незапланированному воздействию. **Варианты опыта потому так и называются, что они разные, и, следовательно, будут различно реагировать на дополнительный фактор.**

Аналогично, не следует начинать эксперимент, если у подготовленных для него растений появились хотя бы слабые признаки минерального голодания. Реакция обеспеченных минеральным питанием растений отличается от реакции голодающего по всем физиологическим параметрам. Задержка опыта в последнем случае будет более длительной, т.к. исправление баланса минеральных питательных веществ требует до 10-15 дней. В таком случае рациональнее не заниматься исправлением возникших нарушений, а заложить опыт заново.

Пренебрежение временным развитием процессов часто приводит к ложным выводам. И.Г. Завадская и Г.Г. Шухтина [1974] пришли к выводу, что при обезвоживании неспецифическое повышение устойчивости к последующему нагреву наблюдается у засухоустойчивых сортов и не имеет места у влаголюбивых. У обеих групп сортов в ходе опыта создавался одинаковый водный дефицит, что и считалось равной мерой воздействия. Последующее тестирование жарой проводилось одновременно, что вроде бы соответствует принципу соблюдения равенства условий в эксперименте. Авторы не указывают, на основании чего был выбран интервал между двумя воздействиями. Скорее всего, временная динамика формирования устойчивости ими не изучалась в предварительных опытах. Именно здесь и кроется методическая ошибка. Засухоустойчивый сорт не только с меньшими физиологическими нарушениями переносит обезвоживание, но и быстрее восстанавливает стационарное состояние. Мы вправе предположить, что переходный период у этих групп сортов различен и, следовательно, повторное воздействие на них надо было проводить не в один календарный срок, а по достижении каждым из них одинакового физиологического состояния. Возможен и другой вариант - тестирование в одни сроки, но с меньшей нагрузкой первым обезвоживанием для незасухоустойчивых сортов.

Этот пример показывает, что **постановка любого эксперимента на целом растении требует предварительных опытов по уточнению дозы и временного**

интервала между воздействием и регистрацией результата. Объем предварительных опытов может быть сокращен, а убедительность результатов значительно повышена при проведении в ходе эксперимента не однократного замера, а ряда наблюдений. Только в последнем случае будет достигнута полная уверенность, что экспериментатор не пропустил интересующие его эффекты.

В качестве иллюстрации разберем такой случай. Четыре экспериментатора поставили одинаковые опыты. В одном и том же возрасте они подвергали опытные растения 5-дневному воздействию, а потом восстановили нормальные условия. О продуктивности фотосинтеза судили по накоплению растением сухого веса. На рисунке 6.5 представлены их результаты. Исследователь “А” определил сухой вес в конце периода неблагоприятного воздействия и пришел к выводу о крупной депрессии чистой продуктивности фотосинтеза. Исследователь “Б” произвел учет сухого веса через 10 дней после его окончания и не нашел разницы с контролем. Наконец “В” производил наблюдения через 20 дней после возврата растений в нормальные условия и пришел к твердому убеждению о положительном влиянии изучаемого фактора.

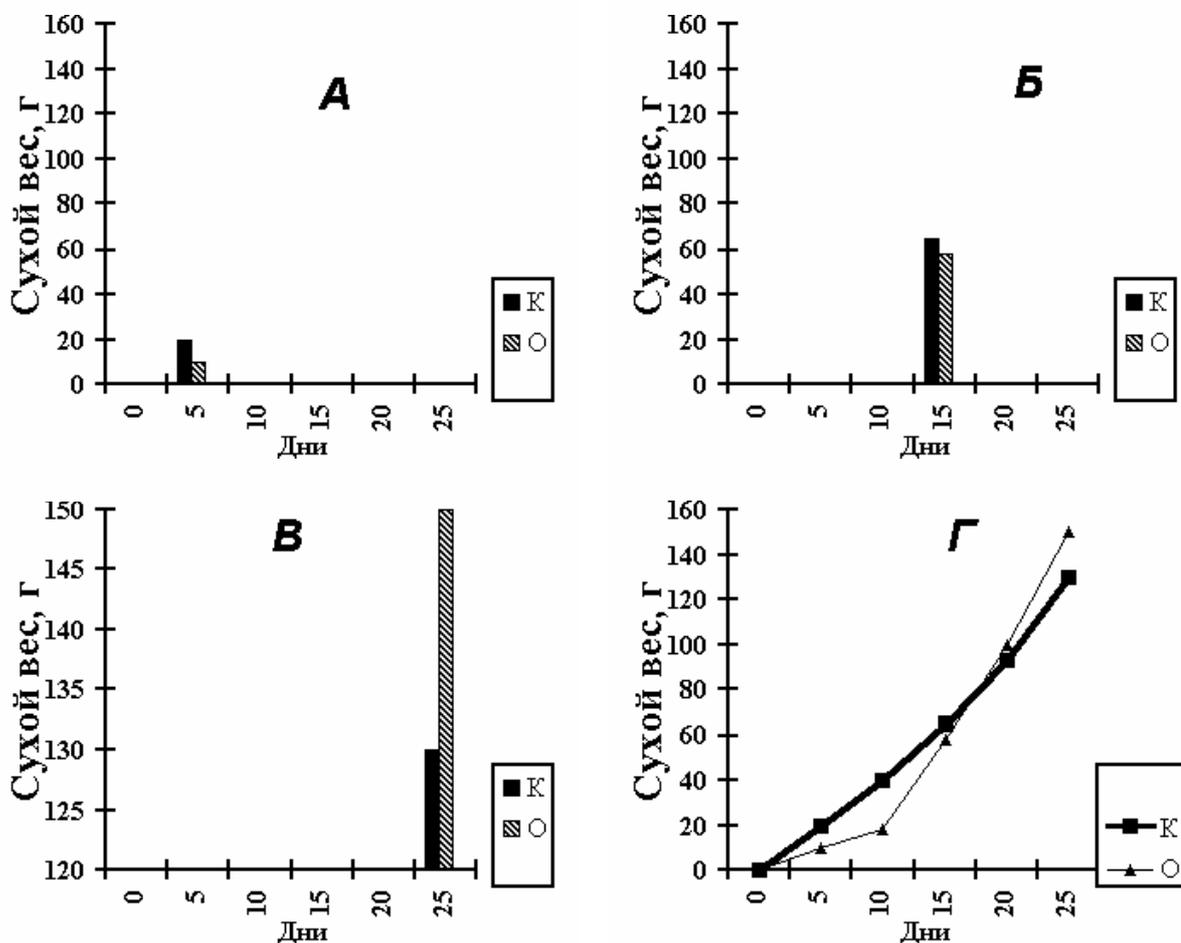


Рисунок 6.5. Результаты наблюдений четырех исследователей (А, Б, В, Г) в одном и том же опыте

Идеальный исследователь “Г” провел серию замеров сухого веса. Он убедился, что “А”, “Б” и “В” были по своему правы. Но спорить им не следовало, т.к. каждый из них зарегистрировал только отдельный элемент общей картины. По данным исследователя “Г” вначале наблюдалась депрессия накопления сухого веса, которая после нормализации условий постепенно компенсировалась. Затем опытные растения (О) обогнали контроль

(К) и наступила стимуляция роста и повышение валовой продуктивности фотосинтеза, что и отразилось на приросте сухого веса.

Наш идеальный исследователь правильно решил, что наиболее быстрые изменения происходят в начале переходного состояния, и ввел дополнительную точку замера сухого веса через пять дней после окончания опытного воздействия. Для регистрации динамики процесса во времени такое введение дополнительных замеров весьма желательно, но в зависимости от характера опыта уменьшение интервала может производиться не в начале, а в конце ряда наблюдений. Исследователь "Г" справедливо полагал, что имеет дело с затухающей депрессией, это и определило время проведения дополнительного замера. Если бы изучаемый процесс был ускоряющимся (длительный минеральный голод, нарастающая засуха), то уменьшение интервала между замерами следовало произвести в конце ряда наблюдений.

Увеличение числа замеров повышает убедительность полученного результата, но, в качестве неприятного приложения, приводит к значительному увеличению объема работы. Поэтому можно только приветствовать самое широкое использование самопишущих приборов, например ауксанографов [Ермаков, 1973; Шевелуха, 1992; 1977].

6.3 ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОСТОЯНИЯ РАСТЕНИЯ.

Мы отмечали, что в зависимости от предыдущих условий произрастания, растения могут различно реагировать на одни и те же факторы. Изменение физиологической восприимчивости растения к условиям эксперимента и к фоновым экологическим факторам ставит вопрос о необходимости контроля за тем, насколько комфортны или неблагоприятны условия выращивания и создаваемая в опыте обстановка.

Для подобного контроля больше всего подходят неспецифические ответы растения, выражающиеся в изменении скорости роста и размеров органов, проницаемости клеток, изменении фонда некоторых метаболитов, удобных для быстрого определения. Эти показатели позволяют судить, о благоприятности обстановки опытных вариантов по сравнению с контролем или с другими образцами. **Безусловно, неспецифические изменения, в силу самой природы их, не дают указания, какой из факторов вызвал зарегистрированные нами изменения. Здесь должны приходиться на помощь наблюдательность и опыт экспериментатора, которые не могут быть заменены никакими рецептами.** С другой стороны, только использование неспецифических характеристик интегрального состояния растения позволит нам сравнить эффекты несопоставимых по физической природе факторов: холода и засоления, обезвоживания и жары или затенения и минерального голода.

В естественной обстановке молодые растения чаще всего подвергаются быстрым, ударным нагрузкам. Это зависит от небольшого размера их листового аппарата и корневой системы, отсутствия значительных запасов метаболитов, которые могли бы обеспечить компенсацию неблагоприятного воздействия. К началу стеблевания корневая система охватывает настолько большой объем почвы, что последний ни при каких условиях не может быть иссушен за несколько дней, а увеличенный размер надземной части растения гарантирует достаточные фонды разнообразных метаболитов, вовлекаемых в реакции адаптации. Благодаря этому, **равное по физической величине нарастающее воздействие воспринимается молодым растением как ударная нагрузка, а более взрослым - как постепенное нарастание неблагоприятного фактора.**

Длительные неблагоприятные воздействия в природной обстановке характерны для минерального голодания, уплотнения почвы и нарушения водообмена. В качестве примера рассмотрим рост пшеницы, выросшей на поле, вспаханном на 25 см (контроль), на мелко вспаханной обочине (угнетенный рост) и на полевой дороге (подавленный рост).

Близкое расположение точек взятия пробы (5-7 м) и выровненный рельеф исключают ошибки, связанные с пестротой почвенного покрова. Высота растений в фазу колошения равнялась: в контроле - 100 см, при угнетенном росте - 40 см и при подавленном росте - 22 см. С ухудшением условий произрастания уменьшалась длина всех органов, но для междоузлий стебля и пластинок листьев эта тенденция выражена более резко, чем для листовых влагалищ (рис 6.6).

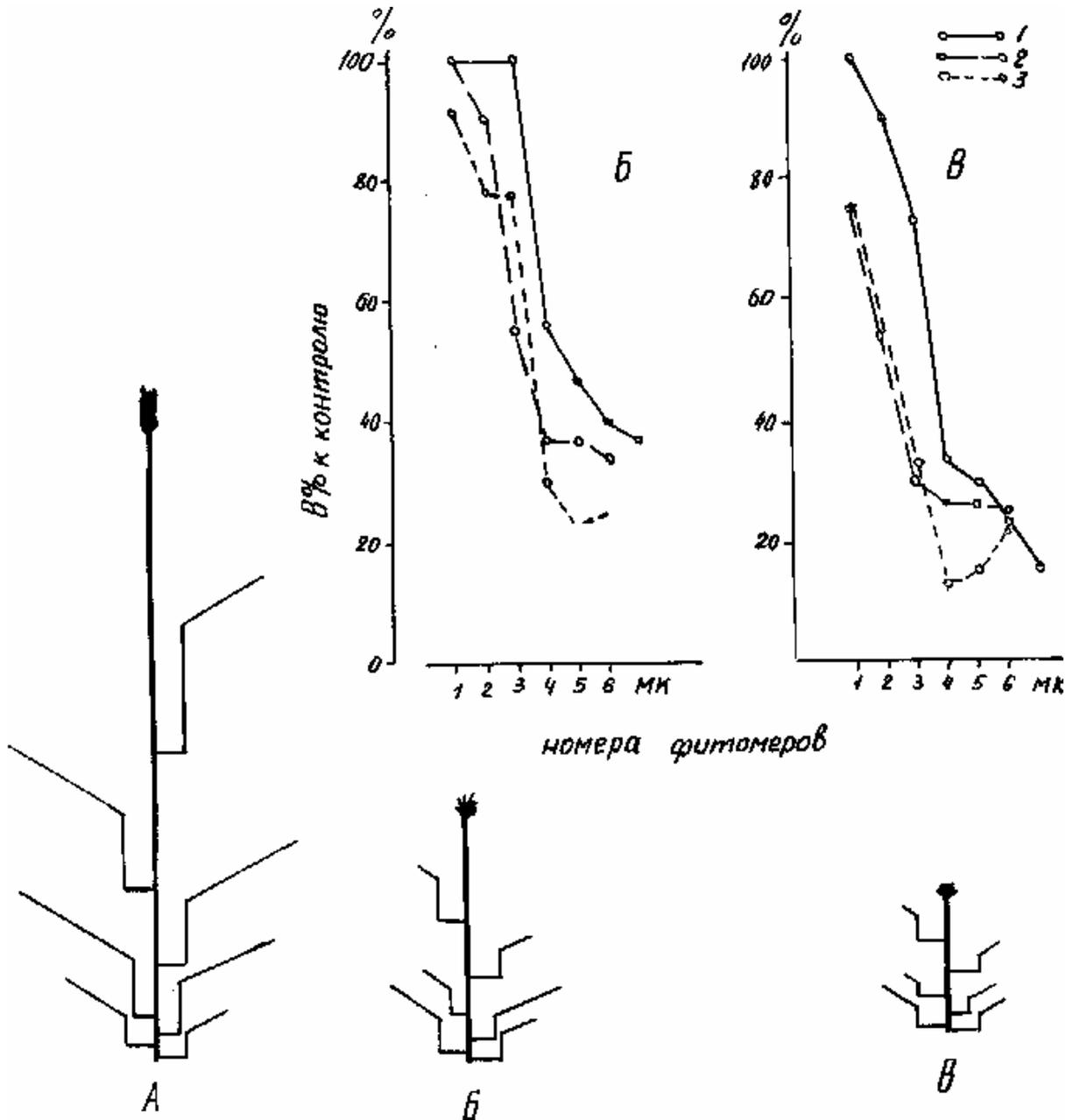


Рисунок 6.6. Изменение длины в последовательном ряду междоузлий (1), влагалищ (2) и пластинок листьев (3) у растений с интенсивным (А), угнетенным (Б) и подавленным (В) ростом.

Часто в опытах, связанных с изучением устойчивости растений, отрицательное действие того или иного фактора принимается априорно, забывая, что один и тот же физический уровень фактора (температуры, освещения, водного режима) может восприниматься устойчивым генотипом как раздражение, а неустойчивым - как

значительное повреждение. Поскольку норма реакции генотипа и уровень его адаптированности связаны не с физической, а с физиологической нагрузкой неблагоприятного воздействия, то для его оценки оказаться полезным сравнение вариантов по изменению роста в последовательном ряду органов.

Когда ботаники на основании толщины годичных колец на стволах деревьев делают вывод о засушливом периоде столетней давности, они превышают возможности данного метода. С таким же успехом эффект уменьшения толщины годичных колец мог быть результатом похолодания климата или стойкого уменьшения прозрачности атмосферы в результате катастрофического события (извержения вулканов, падения большого метеорита и др.).

6.3.3 Вымываемость электролитов.

В литературе много раз отмечалось, что изменение физических свойств макромолекул и субклеточных структур - это первая реакция клетки на любое внешнее воздействие [Александров, 1975]. Одно из проявлений этой реакции состоит в изменении проницаемости внешней мембраны клетки и увеличении диффузии органических и минеральных веществ во внешнюю среду. Контроль изменения проницаемости можно вести по выходу из клетки органических веществ при помощи интерферометра или по электроразряженным ионам по изменению электропроводности бидистиллированной воды, в которой инкубируется навеска. Мы рассмотрим более подробно этот метод, поскольку на его примере удобно показать характерные технические ошибки и порядок осмысливания полученного результата.

Обычно скорость выхода электролитов определяют по изменению электрического сопротивления воды, в которой находится образец. Результаты для удобства выражают в обратных омах ($1/\text{Ом}$) - т.е. в электропроводности. Последняя молча принимается нами как пропорциональная концентрации электролитов. Если во всех случаях для инкубации использовалось одинаковое количество бидистиллята, то электропроводность последнего будет зависеть от веса навески и исходного количества электролитов в ней.

Для различных образцов простое сравнение электропроводности некорректно. Более информативно выражение результатов измерения в процентах от суммы электролитов в образце [Коваль, 1974-б]. Для этого, после проведения измерений, образец убивают замораживанием в жидком азоте или нагревом в той же порции бидистиллята. Затем проводят новое измерение сопротивления, результаты которого соответствуют общей сумме электролитов в образце.

Вторая проблема состоит в введении поправки на неодинаковый вес навесок, поскольку аналитически точное выравнивание их слишком трудоемко. И здесь возникает вопрос о том, в каком соотношении находятся концентрации электролитов и зависящая от них электропроводность.

Для низких концентраций, с которыми мы имеем дело в этом эксперименте, прямая пропорциональность концентрации и электропроводности отмечается не у натуральных величин, а у их логарифмов, в чем легко убедиться, определив электропроводность эксудата убитых листьев при разведении их в 10, 100 и 1000 раз (рис 6.7). Точность определения вымываемости по логарифмическому графику в значительной степени зависит от близости фактического $\text{tg } \alpha$ к приведенному на рисунке, где $\text{tg } \alpha = 1$. Поэтому при переходе на новые объекты исследования необходимо уточнить значение этого тангенса, измерив сопротивление в шкале разведения эксудатов убитого образца.

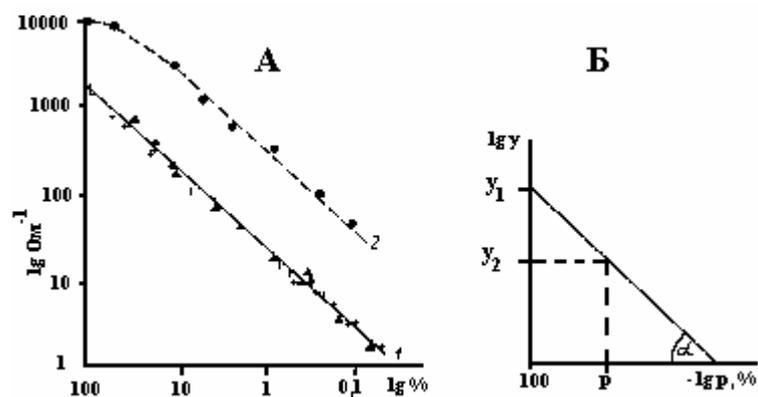


Рисунок 6.7. А - изменение электропроводности ($\lg \text{ Ом}^{-1}$) по мере разведения ($\lg \%$);
 1. - кипяченный экстракт гороха и пшеницы, 2. - 0.1 М раствор NaCl/
 Б. - логарифмический график, иллюстрирующий вычисление вымытых электролитов (p) по электропроводности эксудата убитого (y_1) и живого (y_2) образцов.

Из уравнения прямой для зависимости $\log p = f(\log y)$ мы имеем:

$$\ln y_2 = a \ln p + b$$

где: $b = \ln y_1$ - отсчет электропроводности эксудата убитых тканей; $\ln y_2$ - отсчет электропроводности живого образца, $a = \text{tg } \alpha$ - угол наклона прямой пропорциональности концентрации и электропроводности; p - процент вымытых электролитов. Подставив эти значения, получим:

$$a \ln p = \ln y_2 - \ln y_1$$

$$p^a = e^{(\ln y_2 - \ln y_1)}$$

$$p = (y_2 / y_1)^{1/a}$$

или для частного случая угол a равен 45° :

$$p = y_2 / y_1$$

Таким образом, процент вымытых электролитов может быть определен как отношение электропроводности эксудата испытуемого образца к электропроводности эксудата убитого в степени $1/a$. Ошибка, возникающая в связи с отклонением знаменателя в показателе степени от 1,0, не является постоянной величиной. С увеличением процента вымываемости ошибка резко возрастает, но при работе с однородными объектами и при различии вымываемости в пределах одного порядка она не существенна. Здесь же решается и проблема выравнивания измеряемых образцов. Если отсчеты электропроводности эксудатов живого и убитого образца взяты в одной и той же порции бидистиллята, то вес навески и объем воды попадают и в числитель и в знаменатель и, таким образом, сокращаются.

Подобные рассуждения всегда выполняет создатель методики, но углубиться в них следует и пользователю. Очень часто приходится адаптировать существующий метод к своим конкретным задачам, а бездумные новации иногда приводят к неожиданным результатам, Так в одной солидной публикации автор для выравнивания размеров образца разделил измеренную электропроводность на вес навески. **Но деление логарифмов является математической операцией извлечения корня. В итоге получилась нелепая величина: “корень степени веса навески из электропроводности”.**

Измерение динамики выхода электролитов может дать дополнительную ценную информацию. На рисунке 6.8 приведены результаты измерения выхода электролитов из листьев пшеницы. Быстрый выход электролитов в первые 40-60 минут инкубации сменяется далее более слабым, но стабильным в течение следующих трех часов. Кривая

суммарного выхода состоит из двух последовательно соединенных ветвей, каждая из которых в некотором приближении представляется прямой линией с плавным переходом между ними. Следовательно, мы имеем дело с двумя различными процессами. У пораженного экологическим стрессом образца возрастает не только угол наклона первой ветви к горизонтальной оси, но и соответствующий угол второй ветви.

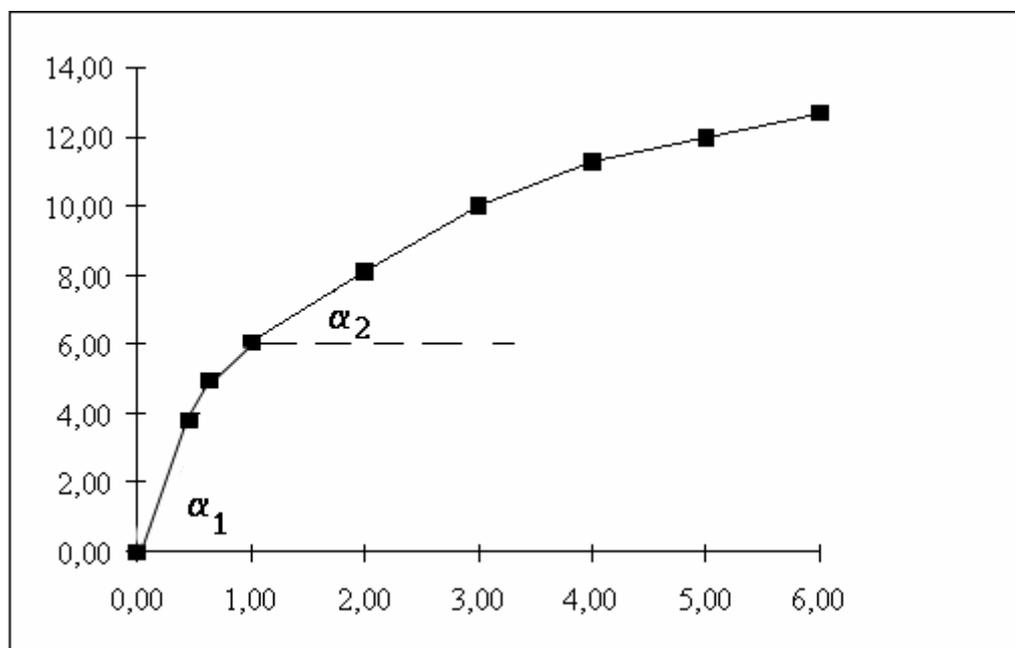


Рисунок 6.8. Динамика вымываемости электролитов из листа пшеницы. Угол α_1 отражает скорость выхода ионов из кажущегося свободного пространства, угол α_2 - проницаемость мембраны клетки.

Первая ветвь характеризует выход электролитов из кажущегося свободного пространства [Коваль, 1974-б], в котором ионы перемещаются в соответствии с законами диффузии и адсорбции. Вторая, с меньшим углом наклона, отражает в чистом виде функциональную активность плазмалеммы; ее сопротивление диффузионному проникновению электролитов, когда концентрация в свободном пространстве становится близкой к нулю. Концентрация электролитов в свободном пространстве определяется равновесием диффузии из клетки и обратным закачиванием их против градиента концентраций, которое может происходить только с затратами энергии. Логичным объяснением пониженного поглощения ионов и связанного с этим роста их концентрации в свободном пространстве будет предположение о дефиците АТФ, необходимого для принудительного транспорта против градиента концентраций.

Следовательно, если отсчет электропроводности взят после короткой экспозиции (до 40 минут), он отражает не выход электролитов через плазмалемму, а их концентрацию в кажущемся свободном пространстве. Она зависит от обратной закачки в клетку (против градиента концентраций) ионов, диффундирующих в свободное пространство. Для получения характеристики проницаемости плазмалеммы в чистом виде нужно взять разность между процентами вышедших электролитов после одного и после двух часов инкубации и выразить как процент от общей суммы электролитов в клетке.

6.3.4 Прочность связи хлорофилла с белком.

Этот показатель отражает состояние мембран в хлоропластах, которые более консервативны по сравнению с внешней мембраной клетки. Еще раз подчеркнем, что количество хлорофилла не связано с продуктивностью фотосинтеза и в этом плане

определение его не информативно. Но по мере старения листа или при повреждении его теми или иными неблагоприятными факторами возрастает доля хлорофилла, извлекаемого неполярными растворителями - т.е. ослабляется его связь с белково-липоидным комплексом хлоропласта.

Если воздействие было достаточно слабым, то на первых этапах наблюдается сокращение фракции слабо связанного хлорофилла, тогда как выход электролитов уже начинает увеличиваться. При последующем нарастании стресса связь хлорофилла в тилакоидах ослабевает быстрее по сравнению со скоростью нарушения полупроницаемости клетки. Одновременно уменьшается общее количество хлорофилла, т.к. слабо связанная фракция его легко окисляется. При сильном, длительном повреждении, когда начинается окислительная деструкция систем клетки, исследователь может обнаружить снижение слабо связанной доли этого пигмента.. Внешне это производит впечатление упрочнения связи хлорофилла с мембранами, но общее количество его при этом убывает (таблица 6.4).

Таблица 6.4

Физиологические показатели листа пшеницы при воздействии жарой и засухой

Воздействие дней	Вариант	Водный дефицит, %	Выход электролитов, %	Хлорофилл	
				мг/г сух. веса	слабо связанный, %
2	Контроль	5,9	3,4	6,75	1,7
	Жара	10,8	4,6	6,24	1,7
	Жара + засуха	14,2	2,7	5,68	24,0
5	Контроль	15,8	3,1	5,60	3,1
	Жара	22,2	9,4	4,96	2,7
	Жара + засуха	37,7	14,2	4,10	6,2
7	Контроль	16,0	2,9	6,88	6,8
	Жара	24,7	17,7	3,73	2,7
	Жара + засуха	лист погиб			

Из этой таблицы вытекает, что не следует ограничиваться регистрацией одного или немногих, тесно связанных между собой параметров. Любой показатель позволяет делать недвусмысленные выводы в ограниченном диапазоне условий. **И только регистрация ряда независимых друг от друга физиологических показателей, отражающих различные стороны жизнедеятельности растения, может гарантировать от ложных выводов.**

6.3.4 Фонда метаболитов

Мы твердо убеждены, что химическое определение количества сахаров, белка, аминокислот, нуклеотидов, гормонов или других метаболитов без исследования их динамики относится к физиологии в такой же степени, как анализ железной руды. Исследователь, обнаружив, что сорт А содержит в листьях больше сахаров, чем сорт Б, еще не может сделать какого либо конструктивного вывода. Подобная регистрация фактов химического состава имеет значение для специалистов в области переработки сырья или для биогеохимиков, да и то только в качестве материала для планирования дальнейшей работы.

Фонды любых метаболитов являются подвижным равновесием поступления и расходования, промежуточным резервуаром, через который протекает поток веществ. Увеличение размеров фонда может быть следствием как усиления синтеза, так и уменьшения траты вещества при неизменном поступлении. И, напротив, низкое содержание метаболита в равной степени может быть результатом слабого синтеза или очень быстрой мобилизации его в последующих реакциях (даже на фоне интенсивного

поступления). Видимое уменьшение или увеличение фонда может происходить не только от изменения скорости реакций в различных звеньях метаболизма, но и в связи с транспортом интересующих нас продуктов в другие органы.

При вычислении скорости обновления нужно помнить, что фонд может быть гетерогенным по происхождению и локализации внутри клетки, органа. Некоторые части его могут представлять собою запасные подфонды и обмениваться достаточно медленно, другие же будут иметь высокую скорость обмена. Способ изучения обновления фонда по разбавлению изотопной метки требует использования сложных методик и значительного объема вычислений. Но, с другой стороны, он позволяет сделать заключение о подвижности фонда метаболитов на основе однократного определения. Некоторые другие приемы исследования подвижности метаболитных фондов, напротив, основаны на регистрации временной динамики.

При изучении динамики фонда ассимилятов и направления их оттока необходимо учитывать возраст органа, т.к. на ранних этапах его жизни основная часть фотоассимилятов остается на месте, а с возрастом все большая доля их транспортируется в другие органы. В соответствии с этим должны изменяться и интервалы между пробами.

Удобным методом для отслеживания динамики фондов метаболитов является сравнение их количества в органе, находящемся в системе организма, и в аналогичном органе, отделенном от растения. При экспозиции в несколько часов и, даже, 1-2 суток в изолированном органе можно сохранить нормальное течение физиологических процессов. Прекращение транспорта веществ в связи с отделением органа приведет к увеличению фонда синтезируемых в нем метаболитов и к уменьшению фондов тех веществ, которые поступают из других органов.

В качестве примера рассмотрим изменение суммарного фонда восстановленных веществ, которые определялись титрованием гомогената ткани 0,05 N раствором йода. Такое титрование определяет сумму всех веществ (в т.ч. редуцирующих моносахаров, аскорбиновой кислоты, HS- соединений и др.), имеющих окислительно-восстановительный потенциал ниже, чем у I₂. Поскольку концентрация этих соединений в пересчете на единицу сухого веса всегда увеличена в молодых или в интенсивно растущих тканях, то данный показатель позволит нам судить о физиологической активности исследуемого объекта.

Рассмотрим изменение восстановительной активности при завядании листа до потери им 18-20% исходного количества воды. Данные таблицы 6.5 показывают, что контрольный лист имел достаточно стабильный уровень восстановительной активности. У завядшего листа спустя 24 часа произошло резкое уменьшение фонда йод-редуцирующих веществ. Если бы мы ограничились только наблюдением целого растения, то мог возникнуть ложный вывод о сокращении образования в листе интересующих нас веществ. Но сравнение с отсеченным листом показывает обратное.

Таблица 6.5

Динамика восстановительной активности (0,05 N I₂, мл/г сухого веса) 3-го листа пшеницы в связи с предварительным обезвоживанием

Экспозиция, часы	В системе растения		Изолированный	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
0	15,3	13,5	-	-
3	15,3	13,3	16,6	13,8
9	16,5	14,9	15,5	12,3
24	14,6	10,5	14,8	15,5

НСР₉₅ = 0,7

Во многих случаях мобильность фонда метаболита может быть выявлена и путем сопоставления его с другим относительно стабильным фондом. Обратимся к приведенной выше таблице 6.5 и выразим восстановительную активность обезвоженного листа в виде ее отношения к активности контрольного. Такое оформление результатов приведет нас к прежнему выводу, но резкое увеличение активности обезвоженного листа в отсеченном состоянии проявляется более наглядно.

Экспозиция, часы	В системе растения	Изолированный
0	0,88	0,88
3	0,87	0,83
9	0,90	0,82
24	0,72	1,05

Все это еще раз подтверждает положение о том, **что интерпретация результатов наблюдений может быть правильной лишь в том случае, когда исследователь учитывает состояние своего объекта, временную динамику показателей и не ограничивается единовременной регистрацией ограниченного круга параметров.**

6.4 ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ.

Обычно под обработкой результатов молодые исследователи подразумевают вычисление средних величин, определение размеров ошибки и доверительности полученного результата. Мы предполагаем, что читатель знаком с основами опытной статистики и сосредоточим свое внимание на некоторых аспектах оформления результатов эксперимента, нетрадиционных для методической литературы.

6.4.4 Лукавые цифры.

Значительная часть вычислений при обработке опытов имеет целью сделать результат наглядным, более доступным для осмысливания. На этом пути кроется немало подводных камней. Есть поговорка о том, что математика подобна жерновам - она перемелет все, что в нее подадут, но результат будет зависеть от качества вложенного. Неграмотная подача материала “на математику” часто приводит к удивительным результатам. Возникающие из этого казусы зависят не от математики, а от отсутствия здравого смысла.

В качестве примера приведем задачу на уровне средней школы. На складе лежит партия огурцов. В процессе хранения они теряли влагу и спустя некоторое время содержание воды в огурцах уменьшилось с 99% до 98%. Вопрос: насколько уменьшился вес партии огурцов. Цифры 99 и 98 различаются мало и далеко не каждый спрошенный догадается, что при полном сохранении сухого вещества вес всей партии уменьшится в два раза. Скептикам предлагаю самостоятельно провести вычисления.

Следует помнить, что абсолютное значение признака, принимаемое за 100 процентов, в различных вариантах не одинаково и, следовательно такие близкие процентные отношения получены от разных величин. **Процентное выражение показательно только в близи средней части шкалы. Близ нуля или около 100% такой шкалой пользоваться не следует.**

В свое время, изучая водообмен при засухе, один из авторов этой книги пришел к выводу, что более наглядно представлять результаты определения воды и сухого вещества в растении не в процентах об общего веса навески, а в виде количества воды на единицу сухого веса. При этом предполагается, что количество сухого вещества остается постоянным и что мы можем пренебречь транспортом веществ и потерями на дыхание. Поясним это примером (таблица 6.6).

Таблица 6.6

Изменение оводненности листа пшеницы при 3-часовом завядании.

Вариант	Условия завядания	Содержание воды в листе	
		% от общего веса листа	воды на 1 г сухого веса
Контроль		73,1 ± 0,9	2,7
Завядание	лист с побегом	67,2 ± 0,5	2,0
" - "	лист отделен	60,5 ± 1,6	1,5

В листе, который завядал не отделенным от стебля, процентное содержание воды уменьшилось на 5,9 процента, но при этом он потерял четвертую часть первоначального количества воды. При завядании отсеченного листа влажность его уменьшилась на 12,6 процента за счет потери 44 процентов исходного количества воды в нем.

Из эффектов неправильного расчета возникли попытки создать высоколизиновые кормовые ячмени путем гибридизации местных сортов с Хайпроли. Проблема состоит в том, что растения, имея мощную систему переамминирования, не накапливают в запасном белке незаменимые аминокислоты. Обогащенный ими белок можно получить из зеленой вегетативной массы или из зерна сои, но оба пути не удовлетворяют нас с точки зрения технологии. Отсюда и возникла в Швеции заманчивая идея получения зерновой культуры с полноценным запасным белком путем гибридизации коммерческих сортов с Хайпроли, имеющим аномально высокий процент белка и лизина в зерне.

Только в СССР существовало три программы по созданию высоко лизинового ячменя. Но ни в одной из них не были получены искомые производственные сорта. Оказалось, что ген *lis* подобных доноров создает высокий процент белка и незаменимых аминокислот в зерне не дополнительным синтезом их, а депрессией накопления эндосперма. В щуплом зерне Хайпроли доля зародыша и айлеронового слоя, а значит высоко переваримого белка и лизина, оказывается увеличенным при абсолютном снижении их в расчете на одно зерно. И никакое беккроссирование не может изменить этого феномена - урожайные крупнозерные потомки имеют обычное содержание белка, а высоколизиновые мелкое зерно и низкий урожай. Показательно, что ни один из участников этих программ не дал себе труд в начале работы пересчитать количество лизина и белка из расчета на 1 зерно - все они находились под гипнозом процентных величин.

Это справедливо при любой селекции на повышение содержания тех или иных веществ в зерне. При отборе мы обычно руководствуемся процентным содержанием, вычисленным по результатам анализа навески зерна, но отнюдь не количеством вещества в расчете на одно зерно.

Точно так же, когда мы регистрируем увеличение числа устьиц или клеток эпидермиса в поле зрения микроскопа (т.е. на единице площади листа) следует поинтересоваться: имело ли место абсолютное увеличение числа их. Или растяжение клеток эпидермиса было подавлено и, в результате в поле зрения попадает большое число мелких клеток. **Следует запомнить, что для проверки выводов бывает полезно пересчитать результаты анализа на одну биологическую структуру - клетку, зерно, лист.**

Неправильно проведенные вычисления по результатам наблюдений часто встречаются в опытах с определением водоудерживающей способности. Такие работы строятся на измерении потери воды растительной навеской в растворах сахарозы [Генкель, 1982; Гусев, 1974] или при завядании различной продолжительности в эксикаторе над хлористым кальцием [Ничипорович, 1928]. При этом исходят из концепции о том, что в клетке существует несколько фондов воды с различным

химическим потенциалом. Подробнее о химическом потенциале можно прочитать в монографии А.А. Зялалова[1984].

Сейчас же нам достаточно помнить, что вода движется в сторону уменьшения химического потенциала (из слабо концентрированных растворов в более насыщенные; от более высокого давления в сторону меньшего; из жидкости в ненасыщенную парами атмосферу и т.д.). На основании этого, каждая порция воды, отнимаема у клеток более высокой концентрацией сахарозы или в следующую экспозицию времени над хлористым кальцием, считается связанной более прочно - т.е. обладающей меньшим химическим потенциалом.

Результат обычно выражают в количестве оставшейся в тканях воды (в процентах от первоначального ее количества). Поскольку в вариантах с засухой теряется меньшая доля воды от ее содержания на старте опыта, это трактуется как адаптивное увеличение фракции прочно связанной воды в тканях. Например, в одном из опытов по изучению эксикаторным методом последействия засухи на водный режим листа пшеницы нами были получены следующие результаты:

Таблица 6.7

Водоудерживающая сила листа пшеницы (% от исходного количества воды в нем).

Вариант	Содержание воды (%) в конце экспозиции				
	0	30 мин	1 час	2 часа	5 часов
Контроль	100	85,6 ± 0,7	77,1 ± 1,1	63,4 ± 1,8	30,9 ± 2,7
Последействие засухи	100	92,4 ± 0,6	85,5 ± 1,5	77,0 ± 1,2	52,4 ± 2,1

Здравый смысл подсказывает, что листья после засухи имели меньшую оводненность и, следовательно, проценты удержанного фонда воды исчислены в этом варианте от меньшей абсолютной величины. Поэтому представим результаты как количество сохраненной в долях ее на единице сухого веса:

Таблица 6.8

Водоудерживающая сила листа пшеницы (в долях воды на единицу сухого веса)

Вариант	Содержание воды г, на 1 г сухого веса				
	0	30 мин	1 час	2 часа	5 часов
Контроль	2,51	2,15	1,93	1,59	0,77
Последействие засухи	1,98	1,84	1,70	1,49	0,91

В итоге, различия между вариантами оказываются не столь значительными, как при процентном исчислении. И увеличение водоудержания в значительной мере является не экспериментальным фактом, а эффектом способа вычисления.

Любая научная работа завершается написанием научного отчета или подготовкой публикации. Последний совет относится к изложению материала в этих итоговых документах. **Не тоните в частностях, старайтесь выйти за пределы своих результатов и увидеть их место в общей картине.** Читали ли Вы классиков экспериментальной биологии - Дарвина, Либиха, Чандра Боса, Тимирязева, Холодного, Докучаева, Костычева-младшего? Они не просто излагали результаты экспериментов, а развивали свои мысли на основе фактических данных. Они писали комментарий к точке зрения противников. Они излагали свои взгляды на картину мира вообще и в области их научных интересов в частности. И, кроме того, они владели хорошим литературным языком.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Жизни человека едва хватает, чтобы совершить все ошибки, а повторять их уже непозволительная роскошь.

Житейская мудрость.

Наука развивается неравномерно. В ней всегда есть узкие зоны роста, бурное развитие которых приводит нас в новые области знания. Французский историк Решар Блок говорил, что хорошие дороги, привлекая к себе путников, создают пустоту на окружающих территориях. Точно так же, преувеличенный интерес к зоне роста грозит умертвить самое лучшее в науке, ее душу, потому что подлинный прогресс знания вовсе не ограничен этой зоной роста.

В первой половине 20-го века слабая приборная вооруженность заставляла исследователя тщательно продумывать предстоящую работу. Тимирязев, Холодный, Сабинин, Прянишников, Сукачев и другие классики биологии добивались потрясающих результатов при использовании в экспериментах самых примитивных приборов и оборудования. Кроме того, они смолоду были приучены вникать в природу объектов, с которыми работали. Публикации классиков не были простым изложением результатов конкретных опытов. В них (не всегда явно) присутствовал анализ научной картины мира. По этой причине чтение их работ до сих пор доставляет нам эстетическое наслаждение.

Сосредоточение интересов современной биологии в молекулярной области привело к оттоку талантливой молодежи из классических биологических наук, которые требовали от исследователя концептуального мышления и большой изобретательности. Мощное приборное вооружение сделало биологию иной. Исследователь от этого во многом выиграл, но и кое в чем проиграл, поскольку **ни один прибор еще не заменил умения думать.**

К сожалению, в сферу забвения слишком часто попадает системная организация живых организмов, знания о которой слабо формализованы и потому выглядят удивительно несовременными на фоне успехов молекулярной биологии. Отсюда и происходят многие досадные огрехи в научной работе - как в области постановки эксперимента, так и в истолковании его результатов.

Положение мог бы исправить критический анализ опубликованных работ. Но в естествознании (в отличие от литературы и искусства) критика не получила должного развития. Авторам известны только критические работы А.А. Любищева и А. Кларка, которые, конечно, не способны заполнить вакуум, царящий в этой области.

Биология была, и остается наиболее сложной областью естествознания. Редукционизм, как метод, сводящий закономерности высших уровней организации к явлениям низших уровней, безусловно привел к решению ряда биологических проблем. Но во многом такой подход давал эффект, описанный Гетте: "Сперва живое убивали, потом на части разрезали, но прежних связей не найти".

Методическая литература в биологии огромна. Но в ней **полностью отсутствуют методологические работы, рассматривающие вопросы корректности постановки опытов и истолкования их результатов.** По крайней мере, нам ни одна такая публикация на глаза не попала. Все мы интуитивно чувствуем, что эксперимент, подобно жерновам, способен перемолоть практически все, что мы в него вносим. **Но вопрос о том, что же означают его результаты, слишком часто решается нами предвзято.** И здесь между исследователем и объектом наблюдения легко может возникнуть "игра в испорченный телефон".

Все это побудило авторов написать данную книгу, в которой он попытался осмыслить свой опыт в постановке сельскохозяйственных, физиологических и генетических экспериментов. Авторы сознают ограниченность своих знаний в обширном круге затронутых в книге вопросов и обреченность первой попытки монографического описания на неполноту. Но проблему необходимо было поставить. И если им удалось привлечь внимание читателей к вопросам корректности постановки и истолкования биологического опыта, то он выполнил свою задачу.