

УДК 582.594.2+581.145.21

ПОКАЗАТЕЛИ СЕМЕННОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ОРХИДЕЙ (ORCHIDACEAE JUSS.) ЮЖНОГО УРАЛА, РАССЧИТАННЫЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОГРАММЫ IMAGEJ

© 2014 г. *М.М. Кривошеев*¹, *М.М. Ишмуратова*¹, *И.В. Суюндуков*²

¹ Башкирский госуниверситет, Уфа

² Сибайский институт (филиал) Башкирского госуниверситета

m.m.krivosheev@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2014

Представлены способы подсчета мелких семян с помощью доступной профессиональной программы для редактирования изображений ImageJ и результаты исследования семенной продуктивности 11 видов орхидных (*Dactylorhiza incarnata*, *D. ochroleuca*, *D. russowii*, *Orchis militaris*, *Gymnadenia conopsea*, *Herminium monorchis*, *Epipactis helleborine*, *E. palustris*, *Cypripedium calceolus*, *C. guttatum* и *C. macranthon*) Южного Урала.

Ключевые слова: способы подсчета мелких семян, семенная продуктивность, Orchidaceae, Южный Урал.

Введение

Исследование систем размножения растений является основополагающим направлением при мониторинге состояния популяций и ведении Красных книг, при разработке мер и методов охраны, при выборе способа сохранения и культивирования редких видов *in vitro*. Среди прочих показателей репродуктивного успеха вида семенная продуктивность является важнейшей.

Несмотря на то, что репродукция видов сем. Orchidaceae активно изучается со времён Ч. Дарвина [1], для многих, в том числе редчайших видов, показатель семенной продуктивности до сих пор не выявлен. Мелкие размеры, высокая гетерогенность семян (даже в пределах одной коробочки) и огромное их число осложняют определение семенной продуктивности орхидей [2]. Связанная с этими фактами трудоемкость имеющихся методик создает дефицит информации о репродуктивном успехе орхидей в разных ценозах и в различных частях ареала. Многие исследования, посвящённые изучению семенной продуктивности орхидей умеренной зоны, не имеют согласованной методики подсчета семян, что часто приводит, к сожалению, к несопоставимости результатов.

Для многих растений определение семенной продуктивности возможно путем прямого подсчета, взвешивания и т.д., однако некоторые растения (в том числе и орхидные) производят очень мелкие и микроскопические (по терминологии З.Т. Артюшенко [3]) семена, размеры которых измеряются миллиметрами и долями

миллиметра. Подсчет таких семян очень сложен. В настоящее время использование компьютерных программ позволяет упростить способы подсчета семян, но стоимость профессиональных цифровых технологий высока.

В работах, посвящённых изучению семенной продуктивности орхидей [4–6], наиболее распространены ссылки на методику подсчета мелких семян [2]. Следует признать, что к настоящему времени эта методика устарела. С развитием цифровых технологий отпала необходимость печати черно-белых фотографий и создания технических условий для прямого подсчета семян.

Применение современных цифровых технологий позволяет модернизировать способы подсчета семян. Ранее нами были предложены методы маркирования семян [7–9] в стандартных графических редакторах, например в *Adobe Photoshop* или *Paint*. Таким же способом пользовались и некоторые другие исследователи [5].

В данной работе рассмотрены способы подсчета мелких семян с помощью доступной профессиональной программы для редактирования изображений ImageJ, широко используемой в настоящее время в медицинских и общебиологических исследованиях а также представлены результаты исследования семенной продуктивности 11 видов орхидных (*Dactylorhiza incarnata*, *D. ochroleuca*, *D. russowii*, *Orchis militaris*, *Gymnadenia conopsea*, *Herminium monorchis*, *Epipactis helleborine*, *E. palustris*, *Cypripedium calceolus*, *C. guttatum* и *C. macranthon*) Южного

Урала с использованием предлагаемого способа.

Материалы и методы исследований

Сбор материала. Для определения семенной продуктивности плоды орхидей собирали до их полного созревания (2009–2012 гг., в Баймакском, Абзелиловском и Бурзянском районах Башкортостана). Для подсчета семян и определения доли полноценных семян отбирали по 10 коробочек из средней части соцветия у 10 особей каждого вида орхидей. Плоды раскладывали отдельно по бумажным пакетам и хранили до высыхания при комнатной температуре.

Подсчет семян. Для разъяснения модификации подсчета мелких семян приводим краткое описание методики В.В. Назарова [2].

На стеклянную пластинку размером 50×50 мм наливают немного воды и поверх нее высыпают семена. Равномерность распределения семян на поверхности жидкости достигается помешиванием их препаровальной иглой. Для уменьшения поверхностного натяжения воды ее можно разбавить небольшим объемом спирта. Необходимо добиться равномерного в один слой распределения семян на поверхности жидкости, для этого площадь поверхности жидкости должна равняться или немного превышать суммарную площадь семян. Пластину с семенами высушивают и делают ее фотоснимок. На распечатанной фотографии изображения семян прокалываются иглой, подключенной к кнопке «+» микрокалькулятора, второй контакт кнопки присоединяется к алюминиевой пластине, расположенной под фотографией.

Основная модификация методики В.В. Назарова заключается в использовании цифровых снимков семян (которые можно получить не только с помощью цифрового фотоаппарата, но и сканера).

Эффективность подсчета семян на цифровой фотографии во многом зависит от разрешающей способности фотоаппарата и качества снимка. Для успешного подсчета семян необходимо выполнить некоторые требования к съёмке и обработке изображения. 1. Погрешность подсчета повышается из-за примеси «мусора» – остатков коробочек, стеблей и пр. Крупную примесь можно удалить непосредственно на электронном снимке инструментом «ластик» в любом стандартном графическом редакторе. 2. Следует фотографировать со штатива без вспышки с дополнительной подсветкой сверху лампой. 3. Для повышения качества снимков можно разделить препарат с семенами на секторы и снимать

каждый из них отдельно, либо приготовить несколько препаратов из семян, содержащихся в одной коробочке. 4. Для получения цифрового изображения можно использовать сканер, в который препарат аккуратно помещают семенами вниз. Высокая разрешающая способность сканера и неподвижность препарата позволяют получить качественные цифровые отпечатки. 5. Перед использованием автоматического подсчета семян программу желательно откалибровать инструментами прямого подсчёта.

На хорошем снимке препарата с семенами при предварительной калибровке инструментов автоматического подсчета погрешность результата можно снизить до 0,2–1%, а с помощью программы ImageJ можно значительно ускорить подсчет семян.

Программа ImageJ – бесплатный графический редактор для обработки и анализа изображений. Использование приложения возможно во всех операционных системах, поддерживающих Java Virtual Machine версии 1.4 или более поздней. Информацию по использованию программы можно получить на официальном сайте по адресу <http://rsb.info.nih.gov/ij> или на русскоязычном ресурсе программы – <http://imagej.ru>. Здесь же можно получить программу. ImageJ определяет число объектов по их цветовой насыщенности и размеру, а не только по пространственному размещению на плоскости.

Подсчет семян в ImageJ можно проводить двумя способами – прямым (ручным) и автоматическим. В первом случае можно воспользоваться подсчетом на участке препарата определенной площади с последующим пересчетом на площадь, занимаемую семенами.

Для прямого подсчета объектов используется инструмент Cell Counter, расположенный в меню Plugins и далее в подменю Analyze верхней панели управления ImageJ (рис. 1). Поставив отметку в графе Type, можно приступить к подсчету – маркируя семена кликом мыши, мы присваиваем им номер в зависимости от выбранного типа объектов. Таким образом, с помощью плагина Cell Counter можно подсчитывать мелкие объекты различного типа (эта функция также может быть использована при определении разнокачественности семян). Приближение или удаление изображения осуществляется правой и левой кнопкой мыши с помощью инструмента Magnifying glass, расположенного во второй строке верхнего меню программы. Здесь же располагается инструмент Scrolling tool, с помощью которого можно перемещать изображение.

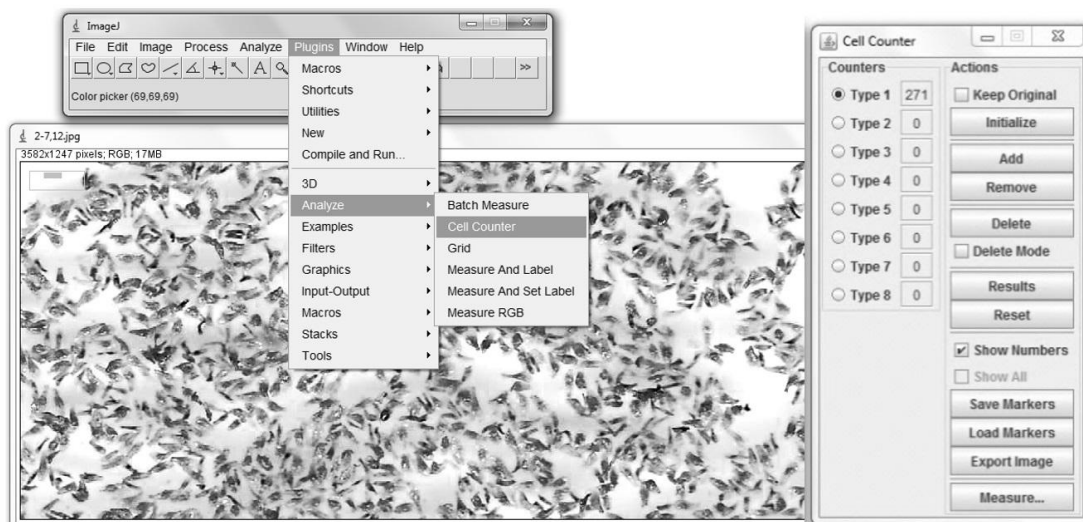


Рис. 1. Местоположение и окно плагина Cell Counter в ImageJ

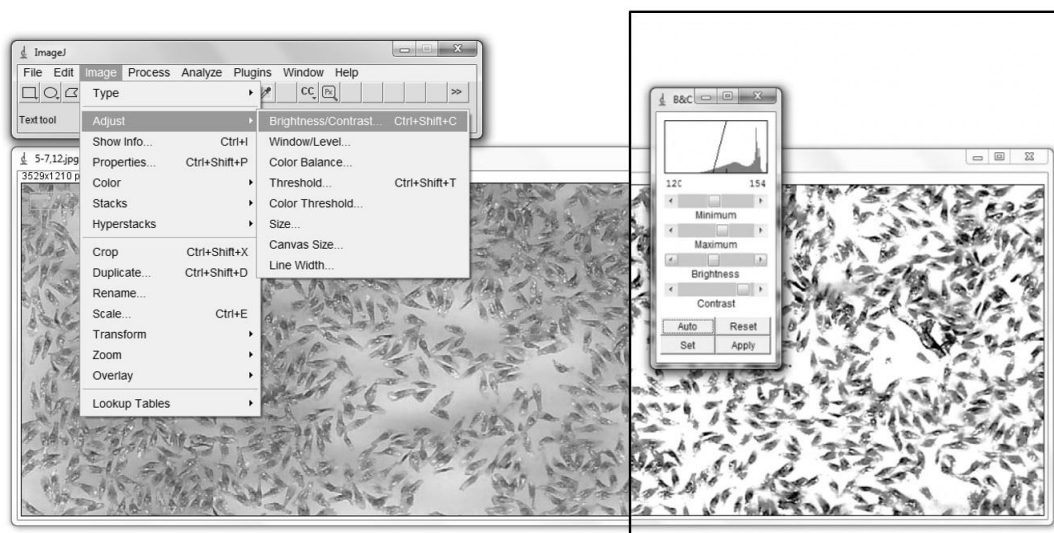


Рис. 2. Изменение яркости и контрастности изображения

Безусловно, ручной подсчет семян очень трудоемок. Мы его использовали для оценок погрешностей результатов автоматического подсчета семян.

Облегчить работу может автоматический подсчет, который в ImageJ выполняется несколькими функциями. Перед выбором функции необходима предварительная коррекция изображения.

В меню Image верхней панели программы, выбрав пункт Adjust и далее Brightness/Contrast (рис. 2), можно изменить параметры яркости и контрастности изображения.

Увеличив контрастность изображений семян и яркость, можно добиться необходимой четкости рисунка (рис. 2). При неоднородности первичного снимка с помощью инструментов можно выделять отдельные участки изображения и редактировать их отдельно.

Один из вариантов автоматического подсчета объектов на изображении – использование модуля Find Maxima, расположенного в меню Process (рис. 3). Этот вариант удобно использовать, если семена на снимке расположены достаточно далеко друг от друга. В поле Noise Tolerance указывают минимальное значение локального максимума: все объекты на изображении, имеющие размер меньше указанного, не будут использованы для дальнейшего анализа. Локальный максимум указывается в пикселях. Пороговое значение можно рассчитать с помощью инструмента Straight, измеряя семена на снимке.

Отметив пункт Exclude Edge Maxima, мы исключаем те максимумы, края которых соприкасаются со значением, заданным в Noise Tolerance. Галочка в Light Background ставится в том случае, если фон изображения ярче ос-

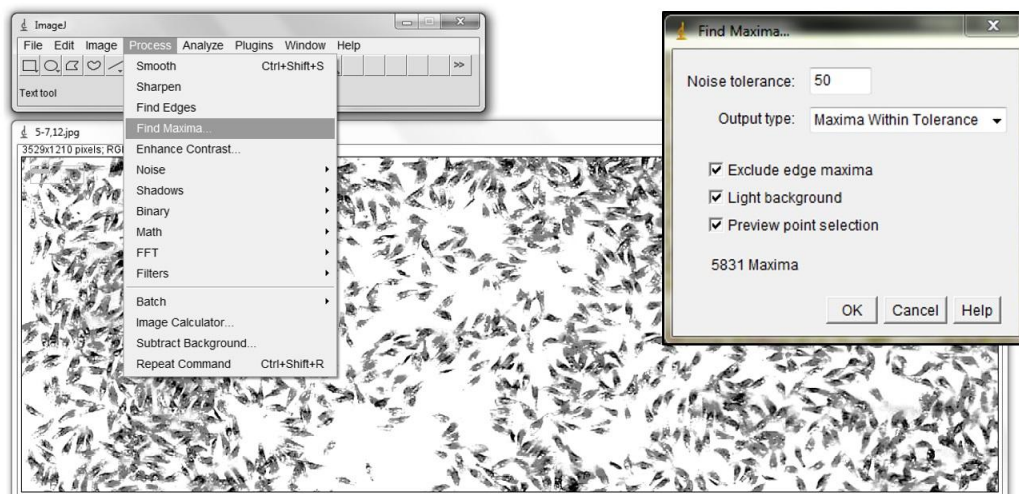


Рис. 3. Местонахождение и окно модуля Find Maxima

нового рисунка (в некоторых случаях цвета изображения полезно инвертировать, и тогда пункт Light Background не используется). Пункт Preview Point Selection позволяет рассмотреть все локальные максимумы на текущем изображении в виде отдельных точек, при этом число точек (то есть подсчитанных семян) отображается в левом нижнем углу окна Find Maxima. Для калибровки точности распознавания можно использовать команды Single Points (отмечает максимальные одиночные точки), Maxima Within Tolerance (отмечает все точки в интервале, который установлен в поле Noise Tolerance) и Point Selection (отображает все локальные максимумы специальными точечными выделениями). Приближая изображение, можно определить, насколько точно подсчитаны объекты с использованием той или иной команды. Если выделение объектов маркерами совпадает с желаемым, то в дальнейшем можно установить в меню Output Type команду Count, показывающую количество максимумов в окне Results.

Еще одна функция определения числа объектов в программе ImageJ – использование плагина Analyze Particles. Этой функцией удобнее пользоваться при высокой кластеризации подсчитываемых объектов.

Для использования Analyze Particles необходимо перевести изображение в формат Color Threshold через меню Images и далее Adjust. В появившемся окне Threshold Color можно отрегулировать оттенок, насыщенность и яркость изображения. После этого можно открыть окно Analyze Particles (оно расположено в меню Analyze) и, подобрав необходимые параметры, определить число объектов на изображении (рис. 4).

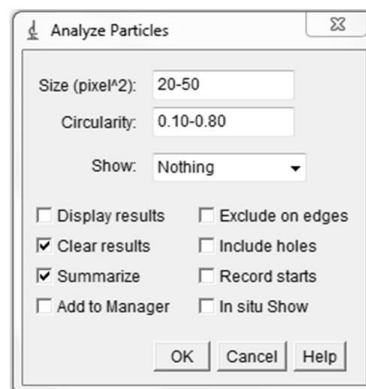


Рис. 4. Окно плагина Analyze Particles

В графе Size задаются минимальные и максимальные размеры (в пикселях) определяемых объектов. В графе Circularity задаются параметры округлости объектов – чем цифра ближе к единице, тем форма объекта ближе к круглой. Округлость объекта можно измерить инструментом Oval; определив этот параметр у нескольких семян на изображении, можно задать необходимые параметры в графе Circularity.

После задания необходимых параметров в окне Analyze Particles и нажатия кнопки ОК появляется окно Summary с таблицей измерений, где в столбце Count отображено число определенных объектов, в нашем случае семян растений.

Мы рекомендуем использовать автоматический подсчет в тех участках изображения, где объекты располагаются более или менее раздельно; на участках, где объекты образуют скопления, лучше применять прямой подсчет с помощью описанных выше подходов. Кроме того, перед автоматическим подсчетом семян желательно откалибровать программу, опреде-

Таблица 1

Семенная продуктивность некоторых орхидных Южного Урала (2009–2012 гг.)

Вид	Локалитет, тип местообитания ЦП	УРСП плода (min-max), шт.	Доля полноценных семян в выборке 1000 шт., %	РСП особи, шт.	РСП ЦП, шт.
<i>Orchis militaris</i>	Предгорья хребта Ирандык, разнотравный луг	12690±624,3 (7648–17144)	91.0	384450	> 100 млн
<i>Gymnadenia conopsea</i>	Предгорья хребта Куркак, разнотравный луг	7361±601,1 (4034–9313)	84.2	272357	> 7.5 млн
<i>Dactylorhiza incarnata</i>	Предгорья хребта Куркак, разнотравный луг	4112±294,1 (2560–4857)	91.8	69930	> 10 млн
<i>D. ochroleuca</i>	Предгорья хребта Куркак, низинное осоковое болото	4735±259,4 (4134–6251)	94.0	99500	> 4 млн
<i>D. russowii</i>	Предгорья хребта Куркак, низинное осоковое болото	3621±125,1 (3154–4195)	96.4	66870	> 2.5 млн
<i>Epipactis helleborine</i>	Предгорья хребта Ирандык, березовое редколесье	2212±119,9 (1839–2778)	96.6	15483	до 1.5 млн
<i>E. palustris</i>	Предгорья хребта Куркак, низинное осоковое болото	4527±523,0 (2790–7342)	99.4	58844	до 5 млн
<i>Cypripedium calceolus</i>	Предгорья хребта Урал-Тау, смешанный лес	5076±573,1 (341–7811)	83.3	4228	> 120 тыс.
<i>C. macranthon</i>	Предгорья хребта Урал-Тау, смешанный лес	9795±862,1 (2308–13236)	100.0	9795	> 285 тыс.
<i>C. guttatum</i>	Предгорья хребта Урал-Тау, смешанный лес	7728±778,2 (3904–11154)	68.0	5255	> 250 тыс.
<i>H. monorchis</i>	Предгорья хребта Куркак, низинное осоковое болото	581±57,5 (190–702)	72.2	3380	> 130 тыс.

Примечание. УРСП – условно-реальная семенная продуктивность; РСП – реальная семенная продуктивность; СП ЦП – семенная продуктивность ценопопуляции.

лив предварительно на одном из препаратов число семян инструментом Cell Counter и добившись наибольшего приближения числа объектов, определенного автоматически, результата ручного подсчёта.

Определение семенной продуктивности. Условно-реальную семенную продуктивность (УРСП) в пересчете на плод (коробочку) определяли по Е.А. Ходачек [10, 11]. Определение РСП проводили путем вычитания доли abortивных семян (с отсутствующим или недоразвитым зародышем) из общего числа семян в расчете на одну особь с использованием доли плодообразования [12]. Долю полноценных семян определяли под световым микроскопом методом сплошного учета 1000 шт. семян на случайно выбранном участке препарата.

Определение РСП ценопопуляции (ЦП) проводили по рекомендациям Ю.А. Злобина [13] путем умножения РСП особи на фактическое число генеративных особей в популяции в год исследования.

Результаты и их обсуждение

Семенная продуктивность и размеры семян орхидных часто зависят от климатических условий, условий конкретного экотопа и других

факторов [14–18]. Известно, что доля полноценных семян, а соответственно и РСП зависят от уровня генетического разнообразия в ЦП – от степени инбредности, случайного автогамного или гейтеногамного опыления, способности вида к апомиксису [2, 19–22].

При исследовании систем репродукции орхидных нами показано, что в условиях Южного Урала большинство изученных видов не испытывает явного дефицита опылителей, имеет высокую долю плодообразования и низкую долю abortивных семян [7, 9, 23–26].

Данные о семенной продуктивности исследованных нами орхидных представлены в табл. 1. Этот показатель у всех изученных видов не стабилен: семенная продуктивность может варьировать в несколько раз как в пределах особи, так и в пределах ЦП. Например, число полноценных семян в коробочках нижней части соцветия *E. helleborine* варьирует от 2370 до 3427 шт., а в коробочках верхней части от 1305 до 1972 шт. В пределах ЦП *H. monorchis* этот показатель между особями изменяется более чем в 3.5 раза.

Наибольшее число семян производит *O. militaris*. Наименьшее число семян отмечено в небольших коробочках *H. monorchis*.

Таблица 2

Семенная продуктивность некоторых орхидных по данным отечественных исследователей

Вид орхидеи	Показатели и значения семенной продуктивности, используемая авторами терминология	Метод подсчета семян	Ссылки
<i>Orchis militaris</i>	семенная продуктивность плода – 3232 (2950–3520) ; семенная продуктивность особи – около 46000	Нет авторства метода	Zagulskii, 1989, цит. по Vakhrameeva et al., 2008 [27]
<i>Dactylorhiza incarnata</i>	РСП плода – 2418–11009	Назаров, 1988	Назаров, 1988 [28]
	количество семян в коробочке – 7110±11	Назаров, 1989	Лысякова, Симагина, 2009 [4]
	наибольшее среднее число семян в плоде – 5099	-	Блинова, 2009 [15]
	средняя условно-потенциальная семенная продуктивность – 67307	-	Блинова, 2009 [15]
	наивысшая условно-реальная семенная продуктивность – 45891	-	Блинова, 2009 [15]
	ПСП цветка – 8135 , РСП плода – 7806 . ПСП особи – 240793 , РСП особи – 200622	Назаров, 1988, 1989.	Хомутовский, 2012 [6]
<i>Gymnadenia conopsea</i>	число семян в плоде 1316 (670–2779)	Назаров, 1989	Назаров, 2006 [29]
	средняя условно-потенциальная семенная продуктивность – 40460	-	Блинова, 2009 [15]
	ПСП цветка – 1821 , РСП плода – 1682 . ПСП особи – 48444 , РСП особи – 39878	Назаров, 1988, 1989.	Хомутовский, 2012 [6]
	РСП плода – 2799.1 (2747–3850)	Назаров, 1989, подсчет в Adobe Photoshop CS3	Шибанова, Долгих, 2010 [5]
<i>Cypripedium calceolus</i>	наибольшее среднее число семян в плоде – 2981	-	Блинова, 2009 [15]
	средняя условно-потенциальная семенная продуктивность – 3279	-	Блинова, 2009 [15]
	наивысшая условно-реальная семенная продуктивность – 894	-	Блинова, 2009 [15]
	семенная продуктивность, шт. в плоде – 7337–28200	-	Виноградова и др., 2011
	РСП плода – 3518.6 (1643–6176)	Назаров, 1989, подсчет в Adobe Photoshop CS3	Шибанова, Долгих, 2010 [5]
	РСП плода – 9762 (630–25456)	Назаров, 1989	Назаров, 2006 [29]
<i>C. macranthon</i>	семенная продуктивность, шт. в плоде – 9064–16530	-	Виноградова и др., 2011
	фактическая семенная продуктивность на цветок – 8000–12000	-	Герасимович, 2004 [30]
	число семян в плоде – 5636 (671–14261)	Назаров, 1989	Назаров, 2006 [29]
<i>C. guttatum</i>	число семян в плоде – 3285 (1434–6874)	Назаров, 1989	Назаров, 2006 [29]
<i>Epipactis helleborine</i>	среднее число семян в плоде – 3024 ±1755.5 . в плодах верхней части соцветия – 1155.8±170.1 в плодах средней части соцветия – 2764±665.5 . в плодах нижней части соцветия – 5152±688.9	Нет авторства метода	Vakhrameeva et al., 1997, цит. по Vakhrameeva et al., 2008 [27]
	Количество семян в коробочке – 59635 ± 35	Назаров, 1989	Лысякова, Симагина, 2009 [4]
	ПСП цветка – 4262 , РСП плода – 3840 , ПСП особи – 158120 , РСП особи – 122022	Назаров, 1988, 1989	Хомутовский, 2012 [6]
	РСП – 3108.0 (2450–3992)	Назаров, 1989, подсчет в Adobe Photoshop CS3	Шибанова, Долгих, 2010 [5]
<i>E. palustris</i>	плод: ПСП 6526 , РСП 6270 , особь: ПСП 237545 , РСП 206297	Назаров, 1988, 1989	Хомутовский, 2012 [6]

Примечание. ПСП – потенциальная семенная продуктивность. Прочерк в столбце «Метод подсчета семян» означает отсутствие описания методов исследования.

В целом орхидеи, у которых самоподдержание популяций обеспечивается, в основном, семенным путем (стеблекорневые орхидеи), производят в десятки и даже сотни раз больше семян по сравнению с вегетативно-подвижными орхидеями. Из изученных нами корневищных видов только у представителей рода *Epipactis* РСР особи сопоставима с РСР особей стеблекорневых орхидей.

В табл. 2 приведены сводные данные о семенной продуктивности и методах ее определения по публикациям отечественных исследователей. В цитируемых работах не унифицирована используемая авторами терминология. Применение разнообразных понятий и способов определения семенной продуктивности и подсчета семян не позволяют провести адекватный сравнительный анализ данных.

Основными репродуктивными характеристиками являются показатели потенциальной семенной продуктивности [10–12], условно-реальной семенной продуктивности [10–11] и реальной семенной продуктивности [12], рассчитываемые на побег, особь и популяцию. Информативным является использование значений семенной продуктивности орхидных в расчете на плод. К сожалению, многими авторами не указывается ярус соцветия, с которого были изолированы плоды. Известно [9, 25, 27], что разнокачественность семян и семенная продуктивность плода обусловлены положением последнего в структуре соцветия.

Таким образом, использование автоматических методов подсчета мелких семян позволит существенно расширить знания о семенной продуктивности многих редких видов растений. Данные о семенной продуктивности – важнейшем показателе репродуктивного успеха вида – используются и при определении его жизненной стратегии, которая своеобразно проявляется в разных частях ареала и в разных условиях обитания популяции. Всеобъемлющие знания об этих показателях позволят выявить «уязвимые места» редких и исчезающих видов.

Список литературы

1. Darwin C. The various contrivances by which orchids are fertilised by insects, and on the good of intercrossing. London: John Murray, 1862. 32 p.
2. Назаров В.В. Методика подсчета мелких семян и семяпочек (на примере сем. Orchidaceae) // Ботан. журн. 1989. Т. 74. № 8. С. 1194–1196.
3. Артюшенко З.Т. Атлас описательной морфологии высших растений. Сем. Л.: Наука, 1990. 204 с.
4. Лысякова Н.Ю., Симагина Н.О. Динамика симбиотических и аллелопатических отношений у

корневищных видов орхидей // Уч. зап. Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Сер. Биология, химия. 2009. Т. 22 (61). № 2. С. 78–85.

5. Шибанова Н.Л., Долгих Я.В. Морфометрическая характеристика семян и реальная семенная продуктивность редких видов орхидных Предуралья // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2010. Вып. 2. С. 4–6.

6. Хомутовский М.И. Антропология, семенная продуктивность и оценка состояния ценопопуляций некоторых видов орхидных (Orchidaceae Juss.) Валдайской возвышенности. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. М., 2012. 23 с.

7. Суюндуков И.В., Кривошеев М.М., Шамигулова А.С. Некоторые особенности репродуктивной биологии *Orchis militaris* на Южном Урале // Вестник Оренбургского государственного университета. 2009. № 6 (100). С. 168–170.

8. Кривошеев М.М. Методические рекомендации для подсчета мелких семян на примере сем. Orchidaceae. // Материалы Всерос. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы сохранения биоразнообразия на охраняемых и иных территориях», Уфа, март 2010. С. 154–155.

9. Кривошеев М.М. Экология репродукции некоторых видов орхидных (Orchidaceae Juss.) Южного Урала. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. Уфа: БашГУ, 2012. 16 с.

10. Ходачек Е.А. Семенная продуктивность и урожай семян растений в тундрах Западного Таймыра // Ботан. журн. 1970. Т. 55. № 7. С. 995–1010.

11. Ходачек Е.А. Популяционные и ценоотические аспекты изучения репродукции растений в условиях Арктики // В кн.: Эмбриология цветковых растений (терминология концепции). СПб.: Изд-во «Мир и Семья», 2000. Т. III. С. 432–439.

12. Левина Р.Е. Репродуктивная биология семенных растений: обзор проблемы. М.: Наука, 1981. 96 с.

13. Злобин Ю.А. Популяционная экология растений: современное состояние, точки роста. Сумы: Университетская книга, 2009. 236 с.

14. Блинова И.В. Особенности опыления орхидных в северных широтах // Бюл. МОИП. Отд. биол. 2008. Т. 113. Вып. 1. С. 39–47.

15. Блинова И.В. Биология орхидных на северо-востоке Фенноскандии и стратегии их выживания на северной границе распространения. Автореферат дис. ... д-ра биол. наук. М.: ГБС РАН, 2009. 44 с.

16. Вахрамеева М.Г., Татаренко И.В., Быченко Т.М. Экологические характеристики некоторых видов евроазиатских орхидных // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1994. Вып. 4. С. 75–82.

17. Кириллова И.А. Некоторые характеристики семян орхидных, произрастающих на северной границе распространения (Республика Коми) // Материалы IX Международ. науч. конф. «Охрана и культивирование орхидей», С.-Петербург, 26–30 сентября 2011 г. С. 210–214.

18. Тетерюк Л.В., Паршукова Т.В. К вопросу о качестве семян орхидных на северном пределе распространения // Там же. С. 412–415.

19. Семёнов А.В., Семёнова О.Е., Филиппов Е.Г., Андропова Е.В. Особенности семенного размноже-

ния у представителей рода *Orchis* на Кавказе // Там же. С. 356–361.

20. Андропова Е.В. К вопросу о формировании семян некоторых орхидных умеренных широт // Там же. С. 16–26.

21. Коломейцева Г. Л., Антипина В.А., Широков А.И., Хомутовский М.И., Бабоша А.В., Рябченко А.С. Семена орхидей: развитие, структура, прорастание. М.: Геос, 2012. 352 с.

22. Tremblay R.L., Askerman J.D., Zimmerman J.K., Calvo R.N. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification // The Linnean Society of London, Biological Journal of the Linnean Society. 2005. V. 84. P. 1–54.

23. Кривошеев М.М., Ишмуратова М.М. Особенности морфологии семян орхидных Южного Урала // Материалы IX Международ. науч. конф. «Охрана и культивирование орхидей», С.-Петербург, 26–30 сентября 2011 г. С. 249–253.

24. Кривошеев М.М., Ишмуратова М.М. Структура и дифференциация состава опылителей растений видов р. *Cypripedium* (Orchidaceae Juss.) на Южном Урале // Изв. Самарского научного центра РАН. 2012. Т. 14. № 1 (7). С. 1767–1770.

25. Кривошеев М.М., Ишмуратова М.М. Эндогенная изменчивость семян и зародышей *Dactylorhiza ochroleuca* (Wüsten. ex BOLL) Holub (Orchidaceae Juss.) // Изв. Самарского научного центра РАН. 2013. Т. 15. № 3 (4). С. 1323–1325.

26. Кривошеев М.М., Барлыбаева А.А. Особенности репродукции *Herminium monorchis* (L.) R. Br (Orchidaceae Juss) на Южном Урале // Вестник Оренбургского государственного университета. 2011. № 12. С. 96–98.

27. Vakhrameeva M.G., Tatarenko I.V., Varlygina T.I., Torosyan G.K., Zagulskii M.N. Orchids of Russia and adjacent countries. Liechtenstein: Gantner Verlag K.G., 2008. 690 p.

28. Назаров В.В. Определение реальной семенной продуктивности у *Dactylorhiza romana* и *D. incarnata* (Orchidaceae) // Ботан. журн. 1988. Т. 73. № 5. С. 231–233.

29. Nazarov V. Seed productivity of orchid flowers // http://www.r-b-o.eu/rbo_public/Nazarov_2006.html published 15.1.2006 (дата обращения: 10.03.14).

30. Герасимович Л.В. Орхидные республики Алтай (эколого-биологические особенности, структура ценопопуляций, вопросы охраны). Автореферат дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ЦСБС СО, 2004. 18 с.

SEED PRODUCTIVITY INDICATORS OF CERTAIN ORCHID SPECIES (ORCHIDACEAE JUSS.) IN SOUTH URALS CALCULATED BY USING THE IMAGEJ PROGRAM

M.M. Krivosheev, M.M. Ishmuratova, I.V. Suyundukov

The paper presents some methods for counting small seeds with the aid of the professional image editing program ImageJ and the results of seed productivity study of 11 orchids species (*Dactylorhiza incarnata*, *D. ochroleuca*, *D. russowii*, *Orchis militaris*, *Gymnadenia conopsea*, *Herminium monorchis*, *Epipactis helleborine*, *E. palustris*, *Cypripedium calceolus*, *C. guttatum* and *C. macranthum*) in South Urals.

Keywords: methods to count small seeds, seed productivity, Orchidaceae, South Urals.

References

1. Darwin C. The various contrivances by which orchids are fertilised by insects, and on the good of intercrossing. London: John Murray, 1862. 32 p.

2. Nazarov V.V. Metodika podscheta melkih semjan i semjapochek (na primere sem. Orchidaceae) // Botan. zhurn. 1989. T. 74. № 8. S. 1194–1196.

3. Artjushenko Z.T. Atlas opisatel'noj morfologii vysshih rastenij. Semja. L.: Nauka, 1990. 204 s.

4. Lysjakova N.Ju., Simagina N.O. Dinamika simbioticheskikh i allelopaticeskikh otnoshenij u kornevishhnyh vidov orhidej // Uch. zap. Tavricheskogo nacional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo. Ser. Biologija, himija. 2009. T. 22 (61). № 2. S. 78–85.

5. Shibanova N.L., Dolgih Ja.V. Morfometricheskaja karakteristika semjan i real'naja semennaja produktivnost' redkih vidov orhidnyh Predural'ja // Vestnik Permskogo universiteta. Ser. Biologija. 2010. Vyp. 2. S. 4–6.

6. Homutovskij M.I. Antjekologija, semennaja produktivnost' i ocenka sostojanija cenopopuljacij nekotoryh vidov orhidnyh (Orchidaceae Juss.) Valdajskoj vozvyshehnosti. Avtoreferat dis. ... kand. biol. nauk. M., 2012. 23 s.

7. Sujundukov I.V., Krivosheev M.M., Shamigulova A.S. Nekotorye osobennosti reproductivnoj biologii *Orchis militaris* na Juzhnom Urale // Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta. 2009. № 6 (100). S. 168–170.

8. Krivosheev M.M. Metodicheskie rekomendacii dlja podscheta melkih semjan na primere sem. Orchidaceae. // Materialy Vseros. nauch.-prakt. konf. «Aktual'nye problemy sohraneniya bioraznoobrazija na ohranjaemyh i inyh territorijah», Ufa, mart 2010. S. 154–155.

9. Krivosheev M.M. Ekologija reprodukcii nekotoryh vidov orhidnyh (Orchidaceae Juss.) Juzhnogo Urala. Avtoreferat dis. ... kand. biol. nauk. Ufa: BashGU, 2012. 16 s.

10. Hodachek E.A. Semennaja produktivnost' i urozhaj semjan rastenij v tundrah Zapadnogo Tajmyra // Botan. zhurn. 1970. T. 55. № 7. S. 995–1010.

11. Hodachek E.A. Populjacionnye i cenoticheskie aspekty izuchenija reprodukcii rastenij v uslovijah Arktiki // V kn.: Embriologija cvetkovykh rastenij (terminologija koncepcii). SPb.: Izd-vo «Mir i Sem'ja», 2000. T. III. S. 432–439.

12. Levina R.E. Reproductivnaja biologija semennyh rastenij: obzor problemy. M.: Nauka, 1981. 96 s.

13. Zlobin Ju.A. Populjacionnaja jekologija rastenij: sovremennoe sostojanie, tochki rosta. Sumy: Universitetskaja kniga, 2009. 236 s.
14. Blinova I.V. Osobennosti opylenija orhidnyh v severnyh shirotah // Bjul. MOIP. Otd. biol. 2008. T. 113. Vyp. 1. S. 39–47.
15. Blinova I.V. Biologija orhidnyh na severovostoke Fennoskandii i strategii ih vyzhivaniya na severnoj granice rasprostraneniya. Avtoreferat dis. ... d-ra biol. nauk. M.: GBS RAN, 2009. 44 s.
16. Vahrameeva M.G., Tatarenko I.V., Bychenko T.M. Jekologicheskie karakteristiki nekotoryh vidov evroaziatskih orhidnyh // Bjul. MOIP. Otd. biol. 1994. Vyp. 4. S. 75–82.
17. Kirillova I.A. Nekotorye karakteristiki semjan orhidnyh, proizrastajushih na severnoj granice rasprostraneniya (Respublika Komi) // Materialy IX Mezhdunarod. nauch. konf. «Ohrana i kul'tivirovanie orhidej», S.-Peterburg, 26–30 sentjabrja 2011 g. S. 210–214.
18. Teterjuk L.V., Parshukova T.V. K voprosu o kachestve semjan orhidnyh na severnom predele rasprostraneniya // Tam zhe. S. 412–415.
19. Semjonov A.V., Semjonova O.E., Filippov E.G., Andronova E.V. Osobennosti semennogo razmnozhenija u predstavitelej roda *Orchis* na Kavkaze // Tam zhe. S. 356–361.
20. Andronova E.V. K voprosu o formirovanii semjan nekotoryh orhidnyh umerennyh shirot // Tam zhe. S. 16–26.
21. Kolomejceva G. L., Antipina V.A., Shirokov A.I., Homutovskij M.I., Babosha A.V., Rjabchenko A.S. Semena orhidej: razvitie, struktura, prorastanie. M.: Geos, 2012. 352 s.
22. Tremblay R.L., Askerman J.D., Zimmerman J.K., Calvo R.N. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification // The Linnean Society of London, Biological Journal of the Linnean Society. 2005. V. 84. P. 1–54.
23. Krivosheev M.M., Ishmuratova M.M. Osobennosti morfologii semjan orhidnyh Juzhnogo Urala // Materialy IX Mezhdunarod. nauch. konf. «Ohrana i kul'tivirovanie orhidej», S.-Peterburg, 26–30 sentjabrja 2011 g. S. 249–253.
24. Krivosheev M.M., Ishmuratova M.M. Struktura i differenciacija sostava opylitelej rastenij vidov r. *Cypripedium* (Orchidaceae Juss.) na Juzhnom Urale // Izv. Samarskogo nauchnogo centra RAN. 2012. T. 14. № 1 (7). S. 1767–1770.
25. Krivosheev M.M., Ishmuratova M.M. Jendogennaja izmenchivost' semjan i zarodyshej *Dactylorhiza ochroleuca* (Wüsten. ex Boll) Holub (Orchidaceae Juss.) // Izv. Samarskogo nauchnogo centra RAN. 2013. T. 15. № 3 (4). S. 1323–1325.
26. Krivosheev M.M., Barlybaeva A.A. Osobennosti reprodukcii *Herminium monorchis* (L.) R. Br (Orchidaceae Juss) na Juzhnom Urale // Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta. 2011. № 12. S. 96–98.
27. Vakhrameeva M.G., Tatarenko I.V., Varlygina T.I., Torosyan G.K., Zagulskii M.N. Orchids of Russia and adjacent countries. Liechtenstein: Gantner Verlag K.G., 2008. 690 p.
28. Nazarov V.V. Opredelenie real'noj semennoj produktivnosti u *Dactylorhiza romana* i *D. incarnata* (Orchidaceae) // Botan. zhurn. 1988. T. 73. № 5. S. 231–233.
29. Nazarov V. Seed productivity of orchid flowers // http://www.r-b-o.eu/rbo_public/Nazarov_2006.html published 15.1.2006 (data obrashhenija: 10.03.14).
30. Gerasimovich L.V. Orhidnye respubliky Altaj (jekologo-biologicheskie osobennosti, struktura ceno-populjacij, voprosy ohrany). Avtoreferat dis. ... kand. biol. nauk. Novosibirsk: CSBS SO, 2004. 18 s.