



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ
(ГНУ ВНИИСХМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ)**

196608 Санкт-Петербург, Пушкин, 8, шоссе Подбельского, 3

Телефон 8-812-470-51-00; Факс 470-43-62

E-mail: contact@arriam.spb.ru, kojemyakov@rambler.ru

**ПРОГРАММА РАСЧЕТА ХАРАКТЕРИСТИК
МИКОРИЗАЦИИ
«MYCORRHIZA 1.0»
(УДК 581.557.27: 681.3.06)**

**Разработчик: лаб. экологии ассоциативных и
симбиотических микроорганизмов – м.н.с. Юрков А.П.**

**Программа рассмотрена и утверждена на методической комиссии по
экологии почвенных микроорганизмов – Протокол № 16 от 15 мая
2005 г.**

Председатель методической комиссии:

А.П. Кожемяков

Санкт-Петербург

2005

Программа расчета характеристик микоризации Mycorrhiza 1.0

Программа «Mycorrhiza 1.0» адаптирована для работы в Excel for Windows и предназначена для расчета и анализа основных характеристик микоризации.

Разработчик: м.н.с. Юрков Андрей Павлович.

Содержание

1. Системные требования
2. Работа программы
3. Преимущества версии Mycorrhiza 1.0
4. Ограничения версии Mycorrhiza 1.0
5. Анализируемые характеристики
6. Статистическая обработка данных
7. Информация для контактов

1. Системные требования

Чтобы запустить Mycorrhiza 1.0 Вам необходимо иметь:

- 1.1. IBM-совместимый компьютер (желательно с тактовой частотой процессора выше 1000 МГц)
- 1.2. 128 Мб оперативной памяти
- 1.3. 100 Мб свободного пространства на жестком диске
- 1.4. Операционная система Windows XP
- 1.5. Microsoft Office for Windows XP

2. Работа программы

Программа Mycorrhiza 1.0 работает в оболочке Excel for Windows. Перед началом работы следует разархивировать файл Mycorrhiza_1.0.exe двойным кликом мыши. Программа адаптирована к работе в операционной системе Windows XP, поэтому, если Вы желаете работать в иной системе, следует переформатировать файл в нужный Вам тип или просто отослать запрос нам по электронной почте yurkovandrey@yandex.ru с указанием Вашей системы. На каждом листе Excel анализируется 1 образец корней растения с микоризой

арбускулярного типа – арбускулярной микоризой (АМ). Светло-зеленым выделены поля, которые необходимо заполнить во время снятия показаний:

2.1 . Указывается индекс образца:

Индекс образца:

2.2. В пункте “Редактируемые данные” устанавливается уровень значимости и предельная ошибка выборки для каждого из 3-х фиксируемых классов:

Редактируемые данные

Уровень значимости - α =	5%	(1% или 5%)
Предельная ошибка выборки - $s_p(M)$ =	5%	(1...10%, 5%)
Предельная ошибка выборки - $s_p(A)$ =	7%	(1...10%, 5%)
Предельная ошибка выборки - $s_p(B)$ =	7%	(1...10%, 5%)

Как видно из примера по умолчанию $\alpha = 0.05$, $s_p(M) = 0.05$, $s_p(A) = 0.07$, $s_p(B) = 0.07$. Справа указаны значения, при которых программа способна рассчитывать характеристики микоризации.

2.3. Непосредственный ввод данных микроскопии – трех балльных параметров – классов плотности микоризы (M от 0 до 5), арбускул (A от 0 до 3) и везикул (B от 0 до 3):

Поля зрения:	1	2	3	4	5	...	200
Класс плотности микоризы - M :	0	3	4	2	2
Класс плотности арбускул - A :	0	1	2	3	3
Класс плотности везикул - B :	0	0	1	1	1

В первой строке примера указан номер поля зрения: от 1 до 200. Отметим, что максимальное количество полей, на которое рассчитана программа, равно 200. На практике Вам не придется анализировать такое количество полей. По данным A. Trouvelot et al. (1986), A. Gollotte et al. (2004) достаточным можно считать анализ 30 полей зрения. Обычно анализируется от 30 до 100, что зависит от заданного уровня значимости и предельной ошибки выборки (см. пп. 2.2).

Интерактивная итоговая таблица расположена под таблицей ввода данных. Значения в итоговой таблице меняются по мере ввода:

F	M	m	A	a	B	b
75,00%	26,25%	35,00%	10,75%	40,95%	1,88%	7,14%
Необходимое число полей для анализа						
		M	A	B		
		97	48	202		

Отметим важную особенность этой таблицы. В нижней ее части указано предполагаемое число полей зрения, которое необходимо еще просмотреть для завершения анализа образца (стрелкой показано, что для класса плотности микоризы M необходимо просмотреть около 97 полей зрения). По мере анализа

микоризы в ячейках будет появляться надпись “Ok”, что будет свидетельствовать о том, что заданная точность вычислений уже достигнута. На первом этапе анализа структуры микоризы достаточно получить необходимую точность лишь по *M*. Для различных объектов (симбиозов разных видов растений с разными видами АМ-грибов) вполне возможно Вам будет необходимо получить достоверные результаты также и по *A* и/или *B*. Программа не ограничивает Вас в выборе.

3. Преимущества версии Mycorrhiza 1.0

Программа Mycorrhiza 1.0 является первой версией, адаптированной для работы в ОС Windows. Таким образом, она имеет несомненные преимущества перед программами, работающими под DOS, а также по сравнению с “ручным” подсчетом, который до сих пор имеет место (см. A. Gollotte et al., 2004: EU GENOMYCA Project N° QLK5-CT-2000-01319. Technological transfer in arbuscular mycorrhiza <http://www.dijon.inra.fr/bbceipm/genomyca/Index.htm>). Вы сами можете с помощью средств Excel построить необходимые Вам специфические графики, гистограммы, либо рассчитать дополнительные статистические параметры.

Кроме того, эта программа автоматически (в интерактивном режиме) указывает Вам предполагаемое количество полей зрения, которое необходимо еще проанализировать для достижения заданной точности. Это значительный плюс программы, поскольку такая информация позволяет Вам наиболее эффективно планировать эксперименты и анализировать структуру микоризы при оптимальной затрате Ваших ресурсов (времени, электронной техники и пр.).

4. Ограничения версии Mycorrhiza 1.0

Программа Mycorrhiza 1.0 представляет собой набор формул, заключенных в циклы, которые в свою очередь включены в общий алгоритм вычисления. Данная версия разработана по открытой схеме, т.е. формулы находятся в открытом доступе в ячейках Excel. Основной блок вычислений находится в скрытых ячейках, поэтому он в некоторой степени защищен. С одной стороны открытый доступ к любым данным позволяет совершенствовать программу, но с другой стороны в отличие программ, заключенных в *.exe-файл, не специалист может нарушить алгоритм вычислений, если он удалит какие-либо формулы. Для исключения возможных ошибок следует принимать во внимание следующее:

4.1. Ячейки, в которые заносятся данные, выделены светло-зеленым цветом.

4.2. Ячейки в таблице ввода данных должны иметь числовой формат. В случае, если программа не выполнила расчет после заполнения первых 5-10 полей зрения (это видно по итоговой таблице – см. пп. 2.3), следует принудительно изменить формат ячеек, установленный по умолчанию. Для этого выделяется вся зеленая область таблицы ввода данных → правой кнопкой мыши выбирается “Формат ячеек” → “Число” → “числовой”, “число десятичных знаков = 0”.

4.3. В программе имеется ограничение по максимальному количеству анализируемых полей зрения, которое равно 200. На практике Вам не придется анализировать такое количество полей. По данным A. Trouvelot et al. (1986), A. Golotte et al. (2004) достаточным можно считать анализ 30 полей зрения. По результатам анализа корней люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*) и гороха посевного (*Pisum sativum*) в симбиозе с AM-грибом (*Glomus intraradices*) максимальное число полей зрения составляло около 140. Если у Вас возникла необходимость увеличить число полей зрения, обращайтесь к нам по электронной почте yurkovandrey@yandex.ru.

4.4. Программа работает на 2-х уровнях значимости - $\alpha = 0.05$ и 0.01 (см. пп. 2.2). Выбор значений предельных ошибок выборки – s_p зависит целиком от целей и объектов Вашего дальнейшего исследования (см. пп. 2.2).

4.5. В одном файле Excel можно проанализировать один опытный вариант.

4.6. На одном листе Excel проводится расчет одного образца. Максимальное количество образцов = 50. Если у Вас возникла необходимость увеличить число образцов, Вы можете обратиться к нам.

4.7. Программа адаптирована к работе в операционной системе Windows XP, поэтому, если Вы желаете работать в иной системе, следует переформатировать файл в нужный Вам тип или просто отослать запрос нам по почте yurkovandrey@yandex.ru с указанием Вашей системы.

5. Анализируемые характеристики

Источником расчетных формул является следующая литература:

1. Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle// Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae / Eds. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S.; Paris: INRA-Press, 1986. P. 217-221.

2. Gollotte, A., van Tuinen D., Gianinazzi, S. Genomyca. EU Project N QLK5-CT-2000-01319, NAS QLRT-CT-2001-02804. Technological transfer in arbuscular mycorrhiza. UMR INRA 1088/CNRS 5184/University de Bourgogne PME. Dijon, France. 1-4 March 2004. - P. 30.

3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: «Колос», 1973. – 336 С.

При микроскопировании (световая микроскопия) регистрируются следующие классы:

1. *M – класс плотности микоризы* (от 1 до 5 баллов). 1 балл – 1% микоризы в корне, 2 балла – 5%, 3 балла – 30%, 4 балла – 70%, 5 баллов – 95% микоризы в корне.
2. *A – класс плотности арбускул* (от 1 до 3 баллов). 1 балл – 10% арбускул в микоризованной части корня, 2 балла – 50%, 3 балла – 100% арбускул в микоризованной части корня.
3. *B – класс плотности везикул* (от 1 до 3 баллов). 1 балл - 10% везикул в микоризованной части корня, 2 балла – 50%, 3 балла – 100% везикул в микоризованной части корня.

Развитие микоризы в корнях определяется по следующим параметрам:

1. $F(\%)$ - встречаемость микоризной инфекции в корневой системе.

$$F(\%) = (N - n_0) * 100 / N, \quad (1)$$

где N – общее число просмотренных полей зрения (N должно быть не менее 50), n_0 – число полей зрения без микоризы.

2. $M(\%)$ - интенсивность микоризной инфекции в корневой системе.

$$M(\%) = (95 * n_5 + 70 * n_4 + 30 * n_3 + 5 * n_2 + 1 * n_1) / N, \quad (2)$$

где

n_5 – число полей зрения с классом плотности микоризы $M = 5$;

n_4 – число полей зрения с классом плотности микоризы $M = 4$;

n_3 – число полей зрения с классом плотности микоризы $M = 3$;

n_2 – число полей зрения с классом плотности микоризы $M = 2$;

n_1 – число полей зрения с классом плотности микоризы $M = 1$;

3. $m(\%)$ - интенсивность микоризной инфекции в микоризованных фрагментах корней.

$$m(\%) = M/F \quad (3)$$

4. $A(\%)$ - содержание арбускул в корневой системе (обилие арбускул в корневой системе).

$$A(\%) = a/M, \quad (4)$$

где $a(\%)$ оценивается по формуле (5).

5. $a(\%)$ – содержание (обилие) арбускул в микоризованных фрагментах корней.

$$a(\%) = (100 \cdot mA_3 + 50 \cdot mA_2 + 10 \cdot mA_1) / 100, \quad (5)$$

где

$$mA_3 = (95 \cdot n_5mA_3 + 70 \cdot n_4mA_3 + 30 \cdot n_3mA_3 + 5 \cdot n_2mA_3 + 1 \cdot n_1mA_3) \cdot F / (M \cdot (N - n_0));$$

$$mA_2 = (95 \cdot n_5mA_2 + 70 \cdot n_4mA_2 + 30 \cdot n_3mA_2 + 5 \cdot n_2mA_2 + 1 \cdot n_1mA_2) \cdot F / (M \cdot (N - n_0));$$

$$mA_1 = (95 \cdot n_5mA_1 + 70 \cdot n_4mA_1 + 30 \cdot n_3mA_1 + 5 \cdot n_2mA_1 + 1 \cdot n_1mA_1) \cdot F / (M \cdot (N - n_0)),$$

где

n_5mA_3 – число полей зрения с $M = 5, A = 3$;

n_5mA_2 – число полей зрения с $M = 5, A = 2$;

n_5mA_1 – число полей зрения с $M = 5, A = 1$;

n_4mA_3 – число полей зрения с $M = 4, A = 3$;

n_4mA_2 – число полей зрения с $M = 4, A = 2$;

n_4mA_1 – число полей зрения с $M = 4, A = 1$;

n_3mA_3 – число полей зрения с $M = 3, A = 3$;

n_3mA_2 – число полей зрения с $M = 3, A = 2$;

n_3mA_1 – число полей зрения с $M = 3, A = 1$;

n_2mA_3 – число полей зрения с $M = 2, A = 3$ и т.д.

6. $B(\%)$ - содержание везикул в корневой системе (обилие арбускул в корневой системе).

$$B(\%) = b/M \quad (6)$$

7. $b(\%)$ – содержание (обилие) везикул в микоризованных фрагментах корней.

$$b(\%) = (100 \cdot mB_3 + 50 \cdot mB_2 + 10 \cdot mB_1) / 100, \quad (7)$$

где

$$mB_3 = (95 \cdot n_5 mB_3 + 70 \cdot n_4 mB_3 + 30 \cdot n_3 mB_3 + 5 \cdot n_2 mB_3 + 1 \cdot n_1 mB_3) \cdot F / (M \cdot (N - n_0));$$

$$mB_2 = (95 \cdot n_5 mB_2 + 70 \cdot n_4 mB_2 + 30 \cdot n_3 mB_2 + 5 \cdot n_2 mB_2 + 1 \cdot n_1 mB_2) \cdot F / (M \cdot (N - n_0));$$

$$mB_1 = (95 \cdot n_5 mB_1 + 70 \cdot n_4 mB_1 + 30 \cdot n_3 mB_1 + 5 \cdot n_2 mB_1 + 1 \cdot n_1 mB_1) \cdot F / (M \cdot (N - n_0)),$$

где

$n_5 mB_3$ – число полей зрения с $M = 5, B = 3$;

$n_5 mB_2$ – число полей зрения с $M = 5, B = 2$;

$n_5 mB_1$ – число полей зрения с $M = 5, B = 1$;

$n_4 mB_3$ – число полей зрения с $M = 4, B = 3$;

$n_4 mB_2$ – число полей зрения с $M = 4, B = 2$;

$n_4 mB_1$ – число полей зрения с $M = 4, B = 1$;

$n_3 mB_3$ – число полей зрения с $M = 3, B = 3$;

$n_3 mB_2$ – число полей зрения с $M = 3, B = 2$;

$n_3 mB_1$ – число полей зрения с $M = 3, B = 1$;

$n_2 mB_3$ – число полей зрения с $M = 2, B = 3$ и т.д.

6. Статистическая обработка данных

Расчет статистических параметров выполняется по методике Б.А. Доспехова (1973). Определены такие характеристики, как среднее значение характеристик микоризообразования (p) и ошибка доли (s).

$$p = \sum_{i=1}^n p_i; \quad s = \sqrt{p \cdot (1 - p) / n},$$

где n – объем выборки (число образцов в данном варианте).

Данные сводятся в итоговую таблицу “Результаты микроскопирования” на последнем листе “Итоги”:

Результаты микроскопирования

№п/п	Index	F(%)	M(%)	m(%)	A(%)	a(%)	B(%)	b(%)
1								
2								
3								
...
50								
Σ								
p								
s								

На том же листе Вы можете распечатать и гистограмму показателей микоризации (указаны средние значения - p и ошибки доли - s):



Отметим существенный плюс в работе настоящей программы – Вы сами можете с помощью средств Excel построить необходимые Вам специальные графики, гистограммы, либо рассчитать дополнительные статистические параметры.

7. Информация для контактов

Контактный e-mail: yurkovandrey@yandex.ru,

контактный м.т.: +7 (962) 700-14-43,

р.т. (812) 224-16-59, 476-18-02,

сайт <http://www.yurkovandrey.narod.ru>.