

УДК 519.24:[581.132:582.475]

## ПРИМЕНЕНИЕ КОСИНОР-АНАЛИЗА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ СУТОЧНОЙ ДИНАМИКИ CO<sub>2</sub>-ГАЗООБМЕНА ПОБЕГОВ СОСНЫ

В. К. Болондинский<sup>1</sup>, С. Н. Шереметьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт леса Карельского научного центра РАН

<sup>2</sup>Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН

Метод косинор-анализа является удобным инструментом для обработки данных временных рядов физиологических процессов у растений. Его применение особенно эффективно в ситуациях, когда использование классического аппарата временных рядов некорректно. В статье обсуждаются достоинства и недостатки косинор-анализа на примере исследования суточной динамики CO<sub>2</sub>-газообмена у сосны обыкновенной на протяжении вегетации.

Ключевые слова: косинор-анализ, временные ряды, CO<sub>2</sub>-газообмен, суточная динамика фотосинтеза, внешние факторы среды, суточные ритмы, ультрадианные ритмы.

### V. K. Bolondinskii, S. N. Sheremetiev. APPLICATION OF COSINOR-ANALYSIS TO INVESTIGATING OF DIURNAL CO<sub>2</sub> EXCHANGE DYNAMICS IN PINE SHOOTS

The method of cosinor-analysis is a convenient tool for processing time series of physiological processes in plants. It is especially effective in situations when the application of classical methods of time series processing is incorrect. Advantages and shortcomings of cosinor-analysis are discussed in the paper through the example of the investigation of daily dynamics of CO<sub>2</sub> exchange in Scots pine shoots during the growing season.

Key words: cosinor-analysis, time series, CO<sub>2</sub> exchange, diurnal photosynthesis dynamics, environmental factors, diurnal rhythms, ultradian rhythms.

### ВВЕДЕНИЕ

Физиологические процессы растений имеют ритмический характер. Их суточная динамика в значительной степени обусловлена периодическими изменяющимися факторами внешней среды. Выделить, какие изменения процессов обусловлены биологическими часами на фоне ритмически изменяющихся внешних факторов, далеко не простая задача. Определенные успехи здесь достигнуты при исследовании водного режима [9, 10, 15], апикально-

го и радиального роста [11]. Суточные ритмы являются одним из частных проявлений существующих в растениях биологических циркадных часов. Предполагается, что циркадные часы, прогнозируя изменения среды и координируя физиологические процессы, увеличивают приспособленность растений к среде и их выживаемость. Наиболее характерный пример проявления действия циркадных часов – раскрытие устьиц. Устьица начинают раскрываться перед рассветом, максимально откры-

ты при первых лучах солнца, а затем происходит постепенное сужение устьичной апертуры к полудню. Данный ритм остается почти неизменным по форме в широком диапазоне внешних факторов среды [15].

В отличие от устьичной проводимости, транспирации, процессов митоза и других физиологических процессов, имеющих эндогенную ритмику и лишь частично зависящих от факторов внешней среды, фотосинтез ( $Ph$ ) напрямую зависит от освещенности ( $I$ ) и прекращается при отсутствии света. При этом хорошая корреляция фотосинтеза с освещенностью наблюдается лишь в пасмурную погоду, а также при восходе и заходе солнца. С температурой ( $T$ ) и дефицитом водяного пара в воздухе ( $WPD$ ) корреляции еще ниже [4]. Поэтому дневные колебания  $CO_2$ -газообмена лишь в определенной мере отражают ход основных факторов среды, и анализ их формы и ритмологических характеристик может дать весьма ценную информацию о состоянии растения и его адаптационных возможностях. В современной литературе описание суточных ритмов проводится, как правило, на качественном уровне. При этом многие закономерности процессов остаются незамеченными.

В настоящее время подавляющее большинство моделей фотосинтеза основано на прямой зависимости процесса от факторов внешней среды. Громоздкие модели, содержащие десятки трудноизмеримых параметров, тем не менее далеко не адекватно описывают суточную динамику  $CO_2$ -газообмена. Временной характер зависимости, как правило, игнорируется. Одна из причин этого явления – отсутствие доступного математического аппарата. Классическая теория анализа временных рядов применяется при исследовании физиологических процессов в естественных условиях, но возможности ее использования ограничены. Математическое исследование этих рядов требует особых методов, адаптированных к природе данных.

Сложность, а часто и невозможность использовать аппарат анализа временных рядов связана в основном с двумя обстоятельствами. Во-первых, длина рядов и плотность точек часто ограничены условиями эксперимента. Во-вторых, ряды данных могут быть получены по смешанным пробам, взятым от разных объектов. При этом далеко не всегда процессы в этих объектах протекают синхронно. Например, при измерении фотосинтеза современными приборами типа газометрической системы Li-6400 достаточно часто происходит смена листа или побега. В нашем эксперименте измере-

ние фотосинтеза проводилось длительное время с помощью многоканальной газометрической установки непрерывного действия на одном и том же объекте, но по техническим причинам редко удавалось получить длину ряда более 144 значений (3 суток) без существенных пауз.

В 70–80-е годы мы обрабатывали наши данные с помощью аппарата анализа временных рядов. Нами делались попытки исследовать временную структуру процесса фотосинтеза и других физиологических процессов у сосны обыкновенной [7]. Исследовались короткие временные ряды  $CO_2$ -газообмена [1, 2], транспирации [4], изменения диаметра ствола [6] и других процессов. Длина исследуемых рядов обычно не превышала 480 значений (10 суток). Пропущенные значения заменялись интерполированными данными. Для этого методом множественного регрессионного анализа моделировали зависимость фотосинтеза ( $Ph$ ) от основных факторов внешней среды –  $I$ ,  $T$  и  $WPD$ . Коэффициент детерминации такой модели был выше 0,97. Приближенность модельных значений к реальным данным сильно зависела от типа погоды. В солнечную погоду максимальные величины наблюдаемых и предсказанных значений различались не более чем на 12 %, а суммы – не более 3 %. В пасмурную погоду различия были более существенными – 30 и 7 % соответственно. После такого рода трудоемких и не всегда удачных процедур проводился анализ.

Были определены циркадная (околосуточная) и 12-часовая составляющие процессов, построены оценки автокорреляционных и взаимокорреляционных функций, проведен спектральный и Фурье-анализ в разные периоды вегетации. Полученные количественные характеристики суточных ритмов для экологов и физиологов не представляли большой ценности и были в целом тривиальны. Наиболее интересные для физиологов выявление и анализ ультрадианных (с периодом менее 20 часов) ритмов вызывали большие трудности.

Еще в 60–70-е годы был разработан достаточно простой метод косинор-анализа, ставший инструментом обнаружения многих биомедицинских ритмов, особенно физиологических ритмов, и позволяющий проводить объективные и количественные оценки их амплитуды и фазы [5]. Этот метод широко используется последние десятилетия при ритмологических исследованиях человека и животных. Работ, где бы он применялся для изучения физиологических процессов у растений, во много раз меньше [9–11, 12].

Процессы  $CO_2$ -газообмена как у нас, так и за рубежом практически не анализировались этим методом. В тех случаях, когда применение аппарата анализа временных рядов некорректно, этот метод может дать количественные характеристики ритмов  $CO_2$ -газообмена и выявить степень синхронизации ритма процесса с ритмами факторов внешней среды в разные периоды вегетации.

Целью нашего исследования являлось изучение возможностей метода косинор-анализа при исследовании газообмена на примере суточной динамики на протяжении вегетации у побега сосны обыкновенной.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент по измерению  $CO_2$ -газообмена (нетто фотосинтеза) у однолетних побегов 45-летней сосны и внешних факторов среды проводился на полевой базе Института леса в 50 км к северу от г. Петрозаводска (Габозеро) в сосняке черничном свежем [3]. Использовалась многоканальная автоматическая установка непрерывного действия на базе инфракрасного газоанализатора Infracal-4. Внешние факторы среды измерялись стандартными метеорологическими приборами. Измерения велись с марта по ноябрь, и длина ряда за период с минимальными пропусками (апрель–сентябрь) составила 7320 наблюдений (48 измерений в сутки). Пропуски более 48 значений были редкими, а по 5–10 значений имели место почти каждую неделю. Эпизодически наблюдения велись в феврале–марте и в октябре–ноябре. При обработке данных весь сезон был разбит на двухнедельные периоды.

Измерения могут быть равноотстоящие или разноотстоящие друг от друга, то есть шаг наблюдений не обязательно должен быть постоянным. Не обязательны также и требования по измерениям в одни и те же часы суток. В нашем случае для каждой суточной хронограммы мы имели обычно 48 равноотстоящих измерений, или 35–40 измерений с 1–2 интервалами отсутствующих данных  $CO_2$ -газообмена. Ряды внешних данных имели гораздо меньше пропусков. Входной информацией для косинор-анализа служил пучок из 14 хронограмм. Выходным результатом косинор-анализа, получаемым на основании усредненного пучка 14 хронограмм, были оценки амплитуды колебаний ( $A$ ), акрофазы ( $\varphi$ ) – момента времени, когда колебание достигает своего максимального значения, и мезора ( $h$ ) – величины среднего уровня косинусоиды для заданного периода (рис. 1). Эти данные рассчитывались как для отдельных коси-

нусоид, так и для средней косинусоиды. Для амплитуды и акрофазы строились доверительные интервалы. Обычно вероятность, с которой доверительные интервалы покрывают эти параметры, выбирается равной 0,95. Каждая хронограмма аппроксимировалась косинусоидой методом наименьших квадратов. В полярных координатах каждая косинусоида изображалась на плоскости точкой, расстояние которой от центра координат равно амплитуде, а угол наклона к горизонтальной оси прямой, проведенной от точки до начала координат, равен акрофазе (см. рис. 1). Все полученные таким образом точки в декартовых координатах рассматриваются как реализации двумерной случайной величины с гипотетическим нормальным законом распределения, и строится эллипс рассеяния ошибок генерального среднего. Построение эллипса рассеяния (или эллипса ошибок) необходимо для определения достоверности существования ритмов на принятом доверительном уровне (например, на уровне 0,95).

Пусть известны экспериментально полученные измерения  $u_1, u_2, \dots, u_i, \dots, u_n$  в различные моменты времени  $t_1, t_2, \dots, t_i, \dots, t_n$ . Измерения аппроксимируются методом наименьших квадратов косинусоидой:

$$u(t) = A \cos(\omega_0 t - \varphi) + h = x \cos(\omega_0 t) + y \sin(\omega_0 t) + h,$$

где  $x = A \cos \varphi$ ,  $y = A \sin \varphi$ . Угловая частота  $\omega_0$  предполагается заданной. Амплитуда  $A$ , акрофаза  $\varphi$  и уровень  $h$  подлежат оцениванию. Чтобы найти соответствующие оценки, минимизировали выражение

$$I = \sum (u(t) - u_i)^2.$$

Отсюда приходим к системе трех уравнений с тремя неизвестными –  $x, y, h$ , из которой находят оценки параметров. Далее находим амплитуду и акрофазу:  $A = \sqrt{(x^2 + y^2)}$ ,

$$\varphi = \arctan(y/x), \quad x \geq 0,$$

$$\varphi = \arctan(y/x) + \pi, \quad x < 0.$$

Производя указанную процедуру, последовательно вычисляются все  $x_j, y_j, h_j$ ,  $j = 1, 2, \dots, n$ . Далее необходимо построить эллипс равных вероятностей для точек  $(x_1, y_1), \dots, (x_n, y_n)$ . Обычно доверительная вероятность  $P$  того, что все точки  $(x_j, y_j)$  лежат внутри эллипса, выбирается 0,95. Для того чтобы изобразить эллипс графически, рассчитываются следующие величины: средние  $x_c$  и  $y_c$  – центр эллипса, полуоси эллипса –  $a$  и  $b$ , угол наклона  $\theta$  эллипса в прямоугольной системе координат.

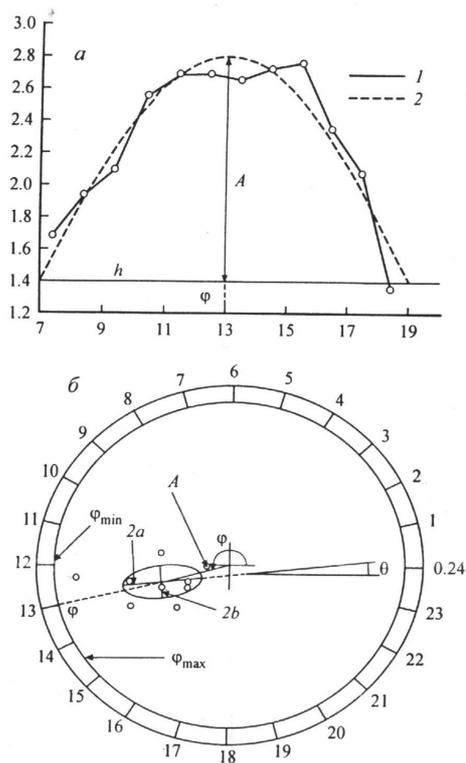


Рис. 1. Пример применения косинор-анализа для получения характеристик дневных ритмов транспирации *Potentilla anserine* [10]: а – на основе 10 хронограмм рассчитана средняя синусоида, где  $h$  – мезор,  $A$  – амплитуда,  $\varphi$  – акрофаза. 1 – дневной ход транспирации, 2 – расчетная синусоида. По оси абсцисс – часы суток, по оси ординат – интенсивность транспирации (г/(г сух. массы) за час)); б – эллипс рассеяния средней синусоиды для интенсивности транспирации на 24-часовом циферблате.  $\varphi_{min}$ ,  $\varphi_{max}$  – доверительный интервал для  $\varphi$ .  $2a$ ,  $2b$  – удвоенные большая и малая полуоси эллипса.  $\theta$  – угол наклона большой оси эллипса к оси абсцисс. Кружками обозначены параметры синусоид (в полярных координатах – модуль и фаза, которые равны амплитуде и акрофазе соответствующей синусоиды) для каждого дня наблюдений. Остальные обозначения те же, что и на а

Расчетные данные косинор-анализа получали с помощью компьютерной программы «Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP», разработанной С. Н. Шереметьевым [9, 10] и выложенной на сайте <http://www.excelstat.newmail.ru>. В основу положен алгоритм, приведенный в книге И. П. Емельянова [5]. Наряду с расчетной синусоидой и основными параметрами ритмов ( $A$ ,  $\varphi$ ,  $h$ ) программа дает ряд показателей, достаточных для построения эллипса рассеяния (полуоси эллипса, декартовы координаты центра эллипса, угол наклона эллипса и др.).

Построение эллипса необходимо для определения достоверности существования ритмов на принятом доверительном уровне, определения доверительных интервалов акрофаз с помощью касательных к эллипсу, опущенных из начала координат на циферблат (см. рис. 1). Если какая-либо часть эллипса попадает на начало координат, то соответствующий ритм следует считать статистически недостоверным на принятом доверительном уровне [5].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Достоверность суточных ритмов  $CO_2$ -газообмена подтверждается практически для всех дней вегетации. Единственный случай, когда эллипс рассеяния касается начала координат, – это трехдневный период в конце марта. Побег днем слабо поглощал углекислоту. Ночные морозы снижали дыхание и особенно фотосинтез. Суточный ритм газообмена практически отсутствовал. Во время вегетации у всех основных внешних факторов среды подтверждается достоверность суточных ритмов. Зимой (январь–февраль) имелись периоды, когда не удавалось диагностировать достоверность суточного ритма температуры воздуха ( $p = 0,95$ ). Перепад между ночными и дневными температурами зимой часто не превышает 1 градус Цельсия. Затем следует похолодание, и снова температура стабилизируется. Визуальный анализ графиков хода температуры также показывает, что ритм зимой исчезает. Хотя признаки  $CO_2$ -газообмена при низких отрицательных температурах у хвой отсутствуют, некоторые биохимические процессы все же имеют место. Если в феврале наступает оттепель и температура положительная, теоретически  $CO_2$ -газообмен возможен. Однако эксперимент говорит об обратном. В мартовский же период суточный ритм температуры воздуха достоверен, и потепление во вторую половину марта сразу же включает фотосинтетический и дыхательный аппарат. Возможно, именно появление стабильного ритма температуры воздуха в начале марта дает сигнал растению о приближении весны и включает соответствующие реакции, делающие потенциально возможными дыхательную и фотосинтетическую деятельность, что и реализуется при температуре, близкой к нулю.

На протяжении вегетационного периода проведен анализ сезонных изменений акрофазы, амплитуды, доверительных интервалов акрофаз и других ритмологических параметров у  $CO_2$ -газообмена и факторов внешней среды.

Для 14-дневных периодов были построены эллипсы рассеяния, траектория перемещения которых, величины их площади, расстояние от центра координат дают важную информацию как о контроле внешними факторами исследуемого процесса, так и о его автономности.

Интервалы акрофаз фотосинтеза сдвигаются с утренних, предполуденных часов в июне к полуденному времени в августе–сентябре — факт, который находит четкое физиологическое объяснение и связан в первую очередь со степенью открытия устьиц (уменьшением устьичной проводимости от утренних к полуденным часам). При этом акрофазы температуры воздуха, дефицита водяных паров воздуха находятся в основном в интервале 15–16 часов, то есть запаздывают на 2–3 часа. Перемещение эллипса рассеяния у освещенности носит нерегулярный характер и мало соответствует траектории перемещения эллипса у фотосинтеза. Хотя акрофазы как фотосинтеза, так и освещенности находятся в достаточно узком (2–2,5 часа) коридоре, соответствия между ними не выявлено. Часто наблюдаемое, особенно в период интенсивного роста, более раннее наступление акрофаз фотосинтеза, опережающее акрофазы освещенности, говорит прежде всего о недостаточном водоснабжении побегов.

Нами были оценены коэффициенты корреляции ( $r$ ) фотосинтеза с параметрами внешней среды для каждых суток вегетационного периода. Кроме того, в разные периоды вегетации проводили корреляционный анализ для амплитуд  $Ph$  и  $I$ ,  $Ph$  и  $T$ ,  $Ph$  и  $WPD$ . Коэффициенты корреляции наиболее велики были для  $Ph$  и  $I$  (рис. 2). В июне в период интенсивного роста сосны в некоторые дни они составляли 0,90–0,95 и были значимы при  $P = 0,95$ . Среднесезонный коэффициент корреляции  $Ph$  и  $I$  составил 0,76. Средние величины коэффициентов корреляции  $Ph$  с  $T$  и  $WPD$  составляли 0,56 и 0,54 соответственно. Коэффициент корреляции амплитуд фотосинтеза и температуры до начала июня составлял 0,45 и был значимым при  $P = 0,95$ . На протяжении июля–августа  $r$  не превышал 0,23 и для всего периода был незначим. Незначимы коэффициенты корреляции и для амплитуд  $I$  и  $Ph$ . Значимым оказался коэффициент корреляции амплитуд  $Ph$  и  $WPD$  (0,68) в период май – середина июля. При низких температурах в начале вегетации величины  $WPD$  невелики и не оказывали сильного влияния на фотосинтез.

В конце мая – начале июня, когда почва насыщена влагой, рост  $WPD$  совпадал с ростом интенсивности фотосинтеза.

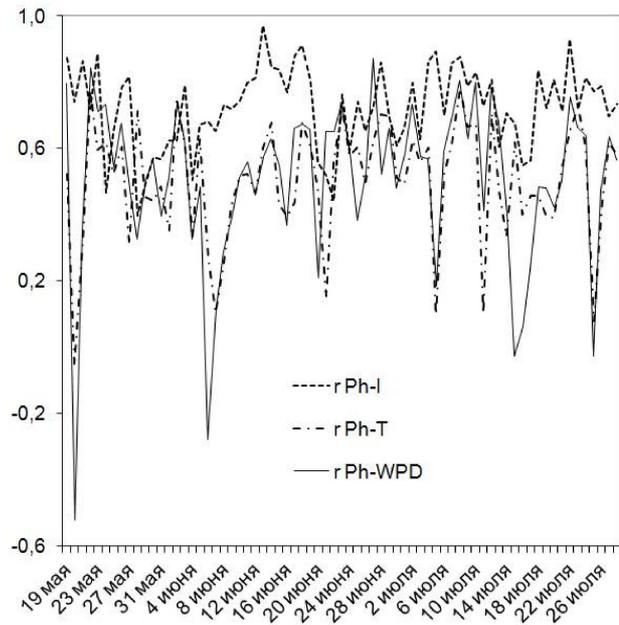


Рис. 2. Сезонные изменения суточных коэффициентов корреляции ( $r$ ) фотосинтеза ( $Ph$ ) с внешними факторами среды (освещенностью –  $I$ , температурой –  $T$  и дефицитом водяных паров в воздухе –  $WPD$ )

В дальнейшем большие величины этого фактора вели к сужению устьиц и снижали фотосинтез. В целом корреляционный анализ дает очень ограниченную информацию о связи фотосинтеза с внешними факторами среды и выявляет лишь некоторые тенденции. Анализ траекторий перемещения эллипсов рассеяния и их параметров показал (рис. 3; табл. 1), что именно  $WPD$ , несмотря на двухчасовой фазовый сдвиг, являлся синхронизирующим фактором суточного ритма фотосинтеза. Но фазовый сдвиг ритма  $Ph$  и  $WPD$  приводил к тому, что коэффициенты корреляции  $Ph$  и  $WPD$  в целом были ниже, чем у  $Ph$  и  $I$ . В результате этому фактору многие исследователи не оказывают должного внимания. Наш анализ показывает, что для всего периода вегетации наиболее важным фактором, определяющим ритмы фотосинтеза, являлся именно дефицит водяного пара в воздухе. Данный вывод нам не удалось получить, используя корреляционный анализ, а ранее – метод анализа временных рядов [1, 2, 7].

Начиная со второй половины августа происходило как уменьшение амплитуд  $Ph$  и  $WPD$ , так и сужение доверительных интервалов их акрофаз. Наблюдалось синхронное уменьшение площадей эллипсов рассеяния и

расстояний центров эллипсов от центра координат. Анализ сезонного хода площадей эллипса рассеяния (см. рис. 3; табл. 1), амплитуд, доверительных интервалов акрофаз позволил выявить определенные закономерности. Площадь эллипса рассеяния, наряду с его близостью к началу координат, определяет доверительные интервалы изменения акрофаз процесса. Обычно у всех исследуемых нами рядов за исключением освещенности приближение эллипса к началу координат сопровождалось уменьшением его площади. В результате доверительные интервалы акрофаз изменялись в достаточно узких пределах. Как у фотосинтеза, так и у факторов внешней среды изменения этих параметров в целом однотипны. Однако корреляционный анализ (табл. 2) выявил достаточно высокий достоверный коэффициент корреляции ( $r = 0,91$ ) площадей эллипсов рассеяния у  $Ph$  и  $WPD$  при  $P = 0,95$ .

У площадей эллипсов рассеяния температуры ( $S_T$ ) и фотосинтеза ( $S_{Ph}$ ) был самый низкий коэффициент корреляции (0,13). Сравнительно невысок он и у площадей фотосинтеза ( $S_{Ph}$ ) и освещенности ( $S_I$ ) – 0,24. Их значимость при  $P = 0,95$  не подтверждается. Факт сильной взаимосвязи  $S_{Ph}$  и  $S_{WPD}$  представляется на первый взгляд несколько неожиданным. В отличие от освещенности доверительные интервалы акрофаз сдвинуты у  $T$  и  $WPD$  на 2–2,5 часа по сравнению с интервалами у  $Ph$ , что проявилось в сравнительно низких коэффициентах корреляции фотосинтеза с этими факторами (см. рис. 2).

В то же время высокая корреляция площадей эллипсов рассеяния  $Ph$  и  $WPD$  говорит о высокой синхронизации их ритмов, что находит четкое физиологическое объяснение. Устьичная регуляция является основным внутренним фактором, определяющим интенсивность фотосинтеза. Именно степенью открытости устьиц определяется поглощение углекислоты растением, а также интенсивность транспирации.  $WPD$  является основным фактором, влияющим на транспирацию. Его увеличение уже в утренние часы приводит к уменьшению устьичной проводимости, что ограничивает рост транспирации. В результате диффузионное поступление  $CO_2$  через устьица также уменьшается, что, как правило, приводит и к снижению фотосинтеза.

Поэтому после восхода солнца  $WPD$  становится наиболее существенным фактором, влияющим на раскрытие устьиц и определяющим интенсивность фотосинтеза. Непосредственное влияние температуры играло заметную роль лишь ранней весной или в поздний

осенний период (см. рис. 2). В летний период это влияние было косвенным – через  $WPD$ .

Если факт достоверности суточных ритмов у фотосинтеза и внешних факторов среды для физиологов достаточно тривиален, то выявление ритмов с периодом менее суток и показ их достоверности при определенном уровне значимости более интересны. В большинстве случаев первая цель исследования изменяющейся во времени биологической или физиологической переменной – найти ее собственные частоты. Кроме циркадных ритмов с периодом, близким к 24 часам, существуют ритмы с периодами менее суток (от нескольких минут до 12–15 часов), получившие название ультрадианных. Этот класс ритмов достаточно распространен у животных и имеет разную периодичность для различных функций. У растений также отмечается наличие такого рода ритмов [2, 9, 10, 15]. Нами после снятия 24-часового тренда у фотосинтеза с помощью косинор-анализа были обнаружены ультрадианные ритмы с периодом около 10 часов (рис. 4) для весеннего восстановительного периода (18 апреля – 18 мая) и для летнего периода интенсивного роста и развития растения (19 мая – 28 июля). В осенний период (август–сентябрь) появляется 7,5-часовой ритм.

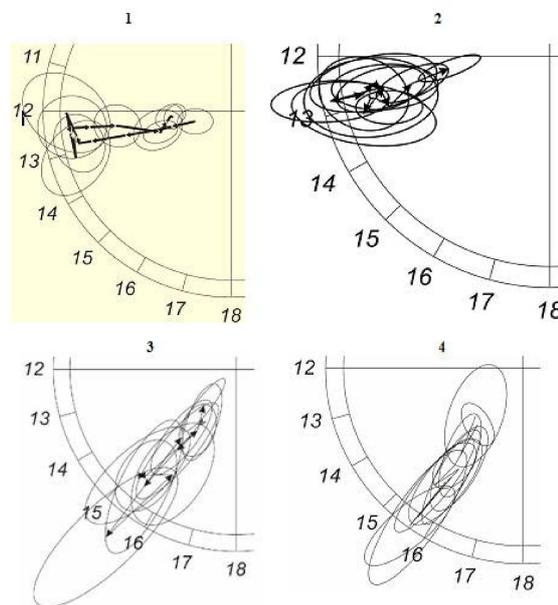


Рис. 3. Сезонный ход эллипсов рассеяния для двухнедельных периодов с 18 апреля по 22 сентября. 1 – фотосинтез, 2 – освещенность, 3 – дефицит водяного пара в воздухе, 4 – температура воздуха. Параметры эллипсов см. в табл. 1

Таблица 1. Параметры позиционирования эллипсов рассеяния средней синусоиды за 14-дневные периоды для интенсивности фотосинтеза и внешних факторов среды

| Даты         | Фотосинтез |      |      |      |          |       | Освещенность |      |      |      |          |       |
|--------------|------------|------|------|------|----------|-------|--------------|------|------|------|----------|-------|
|              | x          | y    | 2a   | 2b   | $\theta$ | S     | x            | y    | 2a   | 2b   | $\theta$ | S     |
| 18.04 – 3.05 | -10        | -3,1 | 10,4 | 7,5  | 0,7      | 0,6   | -21          | -4,9 | 15,9 | 9,4  | 4,8      | 11733 |
| 4.05 – 19.05 | -21        | -5,6 | 15,1 | 11,2 | 25,8     | 1,3   | -22          | -6,8 | 17,2 | 7,3  | -8,5     | 9831  |
| 20.05 – 4.06 | -44        | -9,6 | 17,6 | 14,4 | 113,7    | 2,0   | -19          | -3,6 | 12,6 | 5,4  | 3,2      | 5331  |
| 5.06 – 20.06 | -48        | -0,6 | 28,1 | 20,5 | -37      | 4,5   | -26          | -5,4 | 14,0 | 4,9  | 3,6      | 5386  |
| 21.06 – 6.07 | -45        | -14  | 24,5 | 17,1 | 52,7     | 3,3   | -22          | -4,4 | 10,9 | 8,5  | -18      | 7270  |
| 7.07 – 22.07 | -46        | -4,8 | 20,1 | 18,4 | 0,4      | 2,9   | -20          | -3,1 | 15,3 | 6,4  | 11,8     | 7654  |
| 23.07 – 7.08 | -33        | -4,4 | 13,9 | 12,3 | -18      | 1,3   | -20          | -3,9 | 10,8 | 4,9  | 15,1     | 4163  |
| 8.08 – 23.08 | -20        | -6,2 | 10,4 | 6,1  | 18,4     | 0,5   | -19          | -6,0 | 7,9  | 4,0  | 0,9      | 2462  |
| 24.08 – 8.09 | -17        | -1,6 | 9,4  | 6,4  | 27,3     | 0,5   | -16          | -3,2 | 9,1  | 3,3  | 22,5     | 2388  |
| 9.09 – 22.09 | -16        | -1,9 | 7,2  | 5,3  | 73,8     | 0,3   | -11          | -1,4 | 7,7  | 1,9  | 20,3     | 1147  |
|              | WPD        |      |      |      |          |       | Температура  |      |      |      |          |       |
| 18.04 – 3.05 | -10        | -16  | 24,4 | 9,1  | 70,2     | 17348 | -20          | -30  | 30,2 | 7,8  | 60,7     | 1,9   |
| 4.05 – 19.05 | -27        | -35  | 44,1 | 14,6 | 64,3     | 50588 | -29          | -42  | 44,9 | 12,7 | 55,7     | 4,5   |
| 20.05 – 4.06 | -16        | -20  | 27,6 | 9,2  | 52,1     | 19966 | -21          | -32  | 29,5 | 11,2 | 51,2     | 2,6   |
| 5.06 – 20.06 | -39        | -51  | 57,5 | 19,0 | 44,0     | 85772 | -32          | -44  | 31,9 | 10,9 | 40,9     | 2,7   |
| 21.06 – 6.07 | -19        | -32  | 34,6 | 19,3 | 56,5     | 52451 | -18          | -28  | 26,8 | 10,0 | 59,7     | 2,1   |
| 7.07 – 22.07 | -30        | -32  | 39,9 | 16,1 | 42,0     | 50332 | -25          | -33  | 33,4 | 8,2  | 50,5     | 2,1   |
| 23.07 – 7.08 | -27        | -32  | 23,8 | 15,4 | 55,8     | 28765 | -19          | -27  | 15,4 | 8,8  | 48,3     | 1,1   |
| 8.08 – 23.08 | -12        | -18  | 16,5 | 10,2 | 68,9     | 13234 | -13          | -16  | 13,3 | 7,0  | 120,5    | 0,7   |
| 24.08 – 8.09 | -18        | -25  | 19,5 | 9,5  | 50,1     | 14518 | -18          | -25  | 24,8 | 8,4  | 69,5     | 1,6   |
| 9.09 – 22.09 | -9,7       | -11  | 20,0 | 4,5  | 52,1     | 7048  | -13          | -13  | 29,9 | 15,0 | 70,7     | 3,5   |

Примечание.  $S$  – площадь эллипса, остальные обозначения – см. рис. 1.

Таблица 2. Корреляционная матрица площадей эллипсов рассеяния

|           | $S_I$ | $S_T$ | $S_{WPD}$   | $S_{Ph}$    |
|-----------|-------|-------|-------------|-------------|
| $S_I$     | 1,00  | 0,27  | 0,37        | 0,24        |
| $S_T$     | 0,27  | 1,00  | 0,30        | 0,13        |
| $S_{WPD}$ | 0,37  | 0,30  | 1,00        | <b>0,91</b> |
| $S_{Ph}$  | 0,24  | 0,13  | <b>0,91</b> | 1,00        |

Примечание.  $S_I$ ,  $S_T$ ,  $S_{WPD}$ ,  $S_{Ph}$  – площади эллипсов рассеяния соответственно освещенности, температуры воздуха, дефицита водяного пара в воздухе и фотосинтеза. Выделены максимальные значения коэффициентов корреляции.

Появление 10-часового ритма связано со сдвигом акрофаз  $Ph$  на более ранние утренние часы [2, 3, 7]. Последнее обусловлено недостаточным водоснабжением побегов сосны в основном из-за того, что высокое сопротивление ствола движению влаги ограничивало поток транспирируемой воды. При этом запасы влаги в прикорневом слое почвы в период интенсивного роста были максимальными за сезон [3]. Осенью, когда запасы влаги в почве были в минимуме, потребность дерева в углекислоте значительно снизилась, устьица прикрылись и наблюдался сбалансированный водный режим. 10-часовой ритм исчез

(достоверность его не подтверждалась даже с вероятностью 90 %). Таким образом, причиной появления данного ультрадианного ритма является несбалансированность водоснабжения побегов (при недостатке влаги в почве). После дождливых периодов летом, когда водный баланс дерева восстанавливался, 10-часовой ритм на какое-то время становился недостоверным. Амплитуда 10-часового ритма тем больше, чем выше  $T$  и  $WPD$ . При умеренных температурах его амплитуда снижалась.

Данный ритм лишь в определенной мере синхронизирован  $T$  и  $WPD$ . В период интенсивного роста  $CO_2$ -газообмен побега может сохраняться на достаточно высоком уровне и при уменьшении устьичной проводимости. Чтобы сохранить высокий уровень поглощения углекислоты, усиливаются процессы активации и регенерации ферментов, ответственных за связывание  $CO_2$ , уменьшается внутриклеточная концентрация  $CO_2$  и поток углекислоты в лист не ослабевает [8]. Явление это носит хотя и кратковременный характер, оказывает влияние на ритмику фотосинтеза. Поэтому появление 10-часового ритма во многом обусловлено и эндогенными причинами.

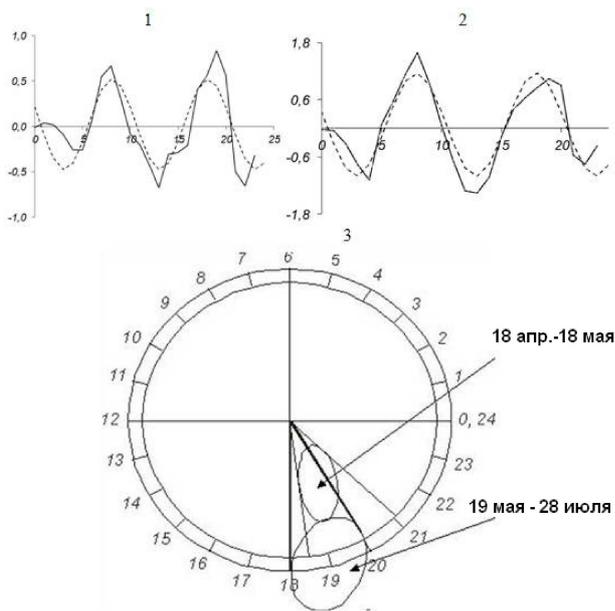


Рис. 4. Пример ультрадианных ритмов. Моделирование синусоидой данных фотосинтеза после снятия суточного тренда для периодов 18 апр. – 18 мая (1), 19 мая – 28 июля (2) и эллипсы ошибок средних синусоид (3)

В то время как 10-часовой ритм связан с полуденным угнетением фотосинтеза, уменьшением поглощения  $CO_2$  в связи с экономией воды растением, 7,5-часовой ритм не находит четкого физиологического объяснения. При хорошей влагообеспеченности растений, оптимальной температуре воздуха и высокой интенсивности фотосинтеза в период активного роста в сосняке черничном свежем в мае–июне на протяжении нескольких дней были обнаружены 2- и 4-часовые ритмы. Причины появления их также неясны. В то же время у внешних факторов среды на протяжении всего сезона вегетации достоверен был только 24-часовой ритм. Таким образом, ультрадианные ритмы фотосинтеза обусловлены в первую очередь физиологическим состоянием дерева.

При изучении  $CO_2$ -газообмена современными приборами типа Li-6400 практически всегда получают ряды с разноотстоящими друг от друга наблюдениями. Кроме того, на протяжении дня всегда имеются пропущенные наблюдения. Длина рядов также часто бывает ограничена 10–15 наблюдениями за день. Если же удастся оптимизировать процесс измерения и получить 20–30 наблюдений, то, как правило, возрастает и количество пропусков.

Такая же ситуация имеет место и с процессами водного обмена [9, 10, 15]. Применение аппарата анализа временных рядов для исследования такого рода данных некорректно. Правда, методы статистики, реализуемые, например, в последних версиях пакета Statistika, приспособлены для работы с пропущенными значениями. В ряде случаев замена пропущенных значений дает положительный результат.

Существует несколько алгоритмов для выполнения этой процедуры: замена средним, вычисленным по  $N$  ближайшим значениям с двух сторон от пропуска в данных, медианой  $N$  ближайших значений, интерполяцией по ближайшим точкам. В последнем методе пропущенные значения интерполируются по соседним непропущенным значениям. Графически этот метод сводится к замене пропущенного наблюдения путем проведения прямой линии от предыдущего (перед пропущенным) до следующего (после пропущенного) наблюдения. Если пропусков немного и они небольшие, то погрешности, возникающие от применяемых процедур, незначительны. Если же интервалы с пропусками велики и количество их большое, то ход процесса искажается, что ведет к неверному вычислению ритмологических параметров. Таким образом, далеко не всегда в блоке программы Statistika «Анализ временных рядов» можно использовать процедуру замены пропущенных значений. Интерполяция же по моделям, где данные процесса рассчитываются по участкам с похожими погодными условиями, чрезвычайно трудоемка и также дает большие погрешности. Для обработки временных рядов  $CO_2$ -газообмена, как и для большинства других биологических процессов, имеющих большое число пропущенных значений, предпочтительней использовать косинор-анализ. Наш эксперимент, осуществленный с помощью автоматической 6-канальной установки по измерению  $CO_2$ -газообмена, позволил получить достаточно длинные ряды равноотстоящих наблюдений без существенных пропусков, которые можно было обрабатывать с помощью программ анализа временных рядов. Такой анализ был проведен и дал важную информацию о синхронизации процесса  $CO_2$ -газообмена и факторов внешней среды, выявил циркадный и 12-часовой ритм фотосинтеза на разных этапах вегетации [1, 2, 7].

Косинор-анализ, использованный в настоящей работе, позволил получить уникальную информацию о сезонной динамике движения эллипсов рассеяния, позволяющей выявить синхронизацию ритмов фотосинтеза и

внешних факторов среды. Динамика изменения площадей эллипсов и их удаленности от начала координат дает информацию об изменении доверительных интервалов акрофаз исследуемых рядов на протяжении вегетации. Определенную информационную ценность представляют и корреляционные соотношения между амплитудами фотосинтеза и амплитудами факторов среды, между среднесуточными значениями и амплитудами. Если для наших данных наличие 24-часового ритма – факт, не требующий доказательств, то для других процессов, например параметров водного режима, он не столь очевиден [9, 10, 15]. Косинор-анализ в ряде ситуаций не подтверждает наличие достоверного 24-часового ритма, как и ритмов с другими периодами у некоторых групп растений для ряда экотопов.

В то же время косинор-анализ имеет определенные ограничения и далеко не всегда позволяет получать достоверные результаты. Если амплитуда колебаний мала, то величина эллипса также незначительна, а центр его близок к началу координат. Даже при использовании большого масштаба не всегда ясно, попадает эллипс какой-либо частью на начало координат или нет. В этом случае достоверность ритма подтвердить достаточно сложно. Такую ситуацию мы имели при анализе временных рядов относительной влажности и температуры воздуха в течение нескольких дней в феврале, когда влажность изменялась в диапазоне 90–93 %, а температура – в диапазоне –12... –13 градусов Цельсия.

Более серьезным недостатком метода является процедура определения дополнительных частот исследуемого процесса. Использование косинор-теста в качестве метода нахождения частот состоит в «подгонке» модели для различных возможных периодов; в зависимости от того, покрывает или не покрывает доверительный эллипс центр полярной системы координат, соответствующая частота принадлежит или не принадлежит спектру изучаемого явления [5]. При построении эллипса рассеяния ошибок генерального среднего все рассчитанные точки  $(x_i, y_i)$ , в декартовых координатах соответствующие амплитуде и акрофазе, рассматриваются как реализации двумерной случайной величины с гипотетическим нормальным законом распределения. Эта гипотеза в теории косинор-анализа нигде не проверяется и принимается без доказательств. Для наших рядов  $CO_2$ -газообмена и внешних факторов среды с ярко выраженной суточной динамикой, имеющих нормальное распределение

[2, 7], это кажется с большой долей вероятности справедливым. Но для сосняков, растущих на суходолах, где фотосинтез сильно подавлен в засуху, предположение о нормальном распределении  $(x_i, y_i)$  может и не соответствовать действительности, и процедура построения эллипса оказывается некорректной. При определении ультрадианных ритмов после снятия суточного тренда очень часто получаются квазипериодические кривые, очень отдаленно напоминающие косинусоиду. Если для кривых, приведенных на рис. 4, гипотеза о нормальном распределении  $(x_i, y_i)$  с большой долей вероятности верна, то для многих других случаев такой уверенности нет. Мы не смогли найти в литературе, посвященной косинор-анализу, попыток доказательства нормальности распределения  $(x_i, y_i)$ , необходимого для построения эллипса рассеяния. Изначально при разработке метода постулировалось, что у исследуемого процесса имеется одна-единственная частота. Для многих биологических процессов это действительно так. Однако имеется множество примеров как в биологии животных и медицине, так и в физиологии растений, когда присутствуют дополнительные частоты. Наличие дополнительных (не рассматриваемых) частот приводит к плохим оценкам параметров модели [13, 16]. Явление наложения спектров, т. е. интерференция между частотой выборки и собственной (природной) частотой процесса, приводит к появлению биений. Это явление присуще любой периодической функции и, в частности, ухудшает оценки параметров модели, включающей одну-единственную периодическую составляющую. Уже во время разработки этого метода в 60–70-е годы подчеркивалось, что в случае наличия нескольких частот его следует использовать с большой осторожностью [16, 17]. В случае, когда имеется более чем одна частота, такая процедура может привести к неверной интерпретации данных. Считается, что происходит это из-за отсутствия проверки предположения независимости пар  $(x_i, y_i)$ , на котором основан расчет доверительных интервалов, а также из-за наложения спектров [17]. Проблемы косинор-анализа, на которые указывали математики в 60–70-е годы [16, 17], изредка звучат и в статьях последнего десятилетия [13, 14]. Поиск в базе Web of Science для косинор-анализа дает более тысячи работ в биологических областях и лишь единицы в математике. В то же время сотни экспериментаторов в биологии и медицине продолжают пользоваться этим единственным для большинства из них приемлемым методом, основанным на теории полуве-

ковой давности, и число их растет. В последние годы косинор-анализ стал применяться и в экофизиологии растений [9–11]. С помощью него мы получили ценные данные о синхронизации 24-часовых ритмов фотосинтеза и факторов внешней среды. В то же время результаты определения частот ультрадианных ритмов не находят подтверждения в физиологии растений. Неясно, связано ли это с недостатком наших знаний или с недоработкой метода.

## Выводы

1. Для временных рядов  $CO_2$ -газообмена, как и для других физиологических процессов с непостоянным шагом по времени и пропущенными значениями, косинор-анализ является удобным инструментом для исследования суточной ритмики. Он позволяет получить ценную информацию об эллипсах рассеяния параметров исследуемых процессов, их сезонной динамике, доверительные интервалы акрофаз и амплитуд.
2. Обработка данных  $CO_2$ -газообмена с помощью аппарата исследования временных рядов требует предварительной трудоемкой подготовки по заполнению пропущенных значений. Во многих биологических исследованиях применение этого аппарата нецелесообразно.
3. Анализ эллипсов рассеяния ошибок генерального среднего моделей интенсивности фотосинтеза и параметров внешней среды для 14-дневных периодов в сезонном цикле развития показал, что основным фактором, синхронизирующим ритм фотосинтеза в летний период, является дефицит водяного пара в воздухе, и связано это с устьичным ограничением фотосинтеза.
4. У внешних факторов среды достоверны только суточные ритмы. Достоверность ультрадианных ритмов подтверждается лишь для процесса фотосинтеза. После снятия суточного тренда для  $CO_2$ -газообмена побега сосны был обнаружен 10-часовой ритм, связанный с полуденной депрессией фотосинтеза. Обнаруженный в осенний период 7,5-часовой ритм, а также 2- и 4-часовые ритмы в конце весеннего периода на сегодняшний день не находят физиологического объяснения.
5. Метод косинор-анализа в ряде случаев работает некорректно при поиске частот

ритмов, присущих процессу, а не заданных a priori. Недостатки особенно серьезны, если имеются два и более ритма. Теория косинор-анализа в последнее десятилетие прогрессирует очень слабо, и сотни исследователей пользуются математическими разработками 60–70-х годов. Критика математиками этого метода в период его разработки актуальна и в настоящее время. Требуется серьезная доработка метода.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Болондинский В. К.* Влияние температуры на ритмическую организацию газообмена древесных растений // Влияние термического фактора на сезонную ритмику растений. М., 1979. С. 17–18.
2. *Болондинский В. К.* Структура временной организации процесса фотосинтеза древесных растений // Оперативно-информационные материалы. Физиология и биохимия растений. Петрозаводск, 1978. С. 42–45.
3. *Болондинский В. К., Кайбияйнен Л. К.* Динамика фотосинтеза в сосновых древостоях // Физиология растений. 2003. Т. 50. С. 105–114.
4. *Веселков Б. М., Болондинский В. К.* Метод исследования динамики и временной организации процесса транспирации у древесных растений в полевых условиях // Биологические проблемы Севера. Физиология и биохимия растений. Петрозаводск, 1976. С. 34–36.
5. *Емельянов И. П.* Форма колебаний в биоритмологии. Новосибирск: Наука, 1976. 128 с.
6. *Кайбияйнен Л. К., Балыков Н. Г.* Временная организация процессов роста у сосны // Вопросы адаптации древесных растений к условиям Севера. Петрозаводск, 1975. С. 154–163.
7. *Кайбияйнен Л. К.* Методы структурно-диахронического исследования в экофизиологии древесных растений // Биофизические методы исследования в экофизиологии древесных растений. Л.: Наука, 1979. С. 3–17.
8. Фотосинтез: физиология, онтогенез, экология: [посвящ. памяти А. Т. Мокроносова] / Ред. Ю. В. Гамалей и др. Калининград: Изд-во КГТУ, 2009. 368 с.
9. *Шереметьев С. Н.* Дневная динамика транспирации травянистых растений на градиенте влажности почвы // Ботанический журнал. 2004. Т. 89. № 5. С. 749–773.
10. *Шереметьев С. Н.* Травы на градиенте влажности почвы (водный обмен и структурно-функциональная организация). М.: Т-во науч. изд. КМК. 2005. 271 с.

11. *Barlow P. W., Mikulecky M. Sr., Strestik J.* Tree-stem diameter fluctuates with the lunar tides and perhaps with geomagnetic activity // *Protoplasma*. 2010. Vol. 247, N 1–2. P. 25–43.

12. *Couderchet M., Retzlaff G.* Daily changes in the relative water-content of velvetleaf (*Abutilon-theophrasti* medic) may explain its rhythmic sensitivity to bentazon // *Journal of plant physiology*. 1995. Vol. 145. N 4. P. 501–506.

13. *Mikulich S. K., Zerbe G. O., Jones R. H. and Crowley T. J.* Comparing linear and nonlinear mixed model approaches to cosinor analysis. // *Statistics in Medicine*. 2003. Vol. 22. P. 3195–3211.

14. *Mikulich S. K., Zerbe G. O., Jones R. H. and Crowley T. J.* Relating the classical covariance adjustment techniques of multivariate growth

curve models to modern univariate mixed effects models // *Biometrics*. 1999. Vol. 55. N 3. P. 957–964.

15. *Nardini A., Salleo S., Andri S.* Circadian regulation of leaf hydraulic conductance in sunflower (*Helianthus annuus* L. cv Margot). *Plant, Cell and Environment*, 2005. Vol. 28. P. 750–759.

16. *Nelson W., Tong Y. L., Lee J.-K., Halberg F.* Methods for cosinor-rhythmometry // *Chronobiologia*. 1979. Vol. 6. N 4. P. 305–322.

17. *Van Cauter E., Huyberegts S.* Problems in Statistical Analysis of Biological Time Series: The Cosinor Test and the Periodogram // *Journal of interdisciplinary cycle research*. 1973. N 1. P. 41–57.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

### **Болондинский Виктор Константинович**

научный сотрудник, к. б. н.  
Институт леса Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,  
Республика Карелия, Россия, 185910  
эл. почта: bolond@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 768160

### **Шереметьев Сергей Николаевич**

старший научный сотрудник, д. б. н.  
Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН  
проф. Попова, 2, Санкт-Петербург, Россия, 197376  
эл. почта: sn.sheremetiev@gmail.com  
тел.: (812) 4670619

### **Bolondinskii, Viktor**

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910  
Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: bolond@krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 768160

### **Sheremetiev, Sergey**

V. L. Komarov Botanical Institute,  
Russian Academy of Sciences  
2 Prof. Popova St., 197376 Saint-Petersburg, Russia  
e-mail: sn.sheremetiev@gmail.com  
tel.: (812) 4670619