

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗЫ В ПРОРОСТКАХ *LUPINUS ANGSTIFOLIUS* L.

Ж.Э. Мазец, К.Я. Кайзинович, Н.В. Пушкина*, В.Н. Родионова*,
Е.В. Спиридович**

Белорусский государственный педагогический университет им.М. Танка, Минск, Республика Беларусь, e-mail: zhannamazets@mail.ru

**НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ, Минск, Республика Беларусь*

***ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь*

Введение

Увеличение производства и повышение урожайности сельскохозяйственных растений является одним из приоритетных направлений хозяйственного развития Республики Беларусь. Однако потенциальные возможности этих растений используются далеко не полностью. Основными причинами, сдерживающими повышение урожайности, считается низкая всхожесть, высокая восприимчивость районированных сортов к болезням и вредителям, слабая энергия прорастания семян из-за их низкого физиологического качества. Немаловажной проблемой является сохранность выращенной продукции, так как ее потери в процессе хранения из-за воздействия грибных, вирусных, бактериальных и других инфекций могут достигать более 20% [1].

Для успешного преодоления отмеченных недостатков необходимо использование современных высокоэффективных технологий предпосевной подготовки посевного материала, которые обеспечивают формирование здорового и устойчивого к стрессовым факторам растения. Как известно, особенности процесса прорастания семян и последующего развития растения обусловлены эпигенетическими механизмами клеточной активации, «запускающими» каскад сложных биохимических реакций. Кроме того, на эти процессы влияют факторы, определяющие полноту реализации генетического потенциала семян, увеличивающие их сопротивляемость к неблагоприятным условиям окружающей среды, повышающие фитоиммунитет. Программа развития семени единожды «запущенная» при его прорастании, вызывает множество последовательных биохимических реакций в онтогенезе, итогом которых могут быть устойчивость растений к неблагоприятным факторам развития и повышение урожайности. Новые фундаментальные знания о механизмах, лежащих в основе способности семян не терять физиологическое качество при действии неблагоприятных условий, позволяет разработать способы целенаправленного воздействия на семенной материал [1]. Поиск новых высокоэффективных методов повышения всхожести семян ведется биологами всего мира.

Открытия в области физики, связанные с созданием оптических квантовых генераторов – лазеров, значительные успехи в радиобиологии, направленные на выяснение физических и биологических процессов, протекающих в растительных организмах под влиянием ионизирующих излучений, создали предпосылки для использования электромагнитных полей и излучений в различных отраслях сельскохозяйственного производства. Электромагнитные поля являются физическим фактором среды, который оказывает существенное влияние на живые организмы различного уровня сложности. Поэтому данный вид излучения находит применение в медицине, в некоторых отраслях промышленности и сельском хозяйстве [2, 3].

В результате этого, во второй половине XX столетия получил развитие принципиально новый метод предпосевной подготовки семян, основанный на использовании энергии электромагнитных излучений и полей. Данный прием стал использоваться наряду с традиционными методами предпосевной подготовки семян, такими как воздушно-тепловой и солнечный обогрев, характеризующихся высокой энерго- и трудоемкостью. Это открывает

возможности решения важных агроэкологических и социально-экономических проблем, направленных на дальнейшее увеличение производства продукции растениеводства, снижения энергозатрат, предотвращения загрязнения окружающей среды.

Однако, несмотря на очевидную перспективность этого метода, до настоящего времени остаются нерешенными многие принципиальные вопросы. К их числу относится — отсутствие убедительного теоретического обоснования механизмов стимулирующего влияния электромагнитных полей (ЭМП) и излучений (ЭМИ) на физиологический статус и развитие растений. Не изучены отдаленные последствия воздействия ЭМП и ЭМИ на семена. Не прослежено влияние этих последствий на весь ход онтогенеза растений [4]. Результаты, полученные при исследовании эффектов ЭМИ на семена и проростки, показали, что совершенно невозможно сформулировать четкие выводы об их влиянии. Расширенная библиография по электромагнитной обработке (ЭМО) семян представлена на сайте [5]. При анализе результатов, полученных в ходе предпосевной обработки семян, становится ясным, что постоянные и переменные магнитные поля могут давать позитивный, но, главным образом, временный и нестабильный эффект на энергию прорастания, скорость роста и всхожесть, делая ЭМИ и ЭМП неинвазивными экзогенными стимуляторами семян [6]. В связи с этим актуальным представляется исследование по выявлению влияния ЭМИ на первичные процессы прорастания семян сельскохозяйственных растений, обусловленные сдвигами в процессах проницаемости покровов и мембран, изменение активности гидролитических ферментов. Эти исследования, вероятно, помогут приоткрыть завесу в понимании механизмов взаимодействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения с растительными объектами на ранних этапах онтогенеза.

Поэтому целью данной работы являлось исследование влияния различных режимов низкоинтенсивного электромагнитного излучения СВЧ-диапазона на всхожесть семян, скорость набухания и прорастания семян, проницаемость их покровов, общую активность амилаз, изменение морфометрических показателей на ранних этапах прорастания *Lupinus angustifolius* L. сорта «Першацвет».

В Беларуси в последние годы возросло внимание к зернобобовым культурам, среди которых большое внимание уделяется люпину. Люпин занимает по производству и по посевным площадям выращивания среди зернобобовых восьмое место в мире, Европе и среди стран ЕС, четвертое – на Украине и среди стран СНГ, третье – в Германии и России, второе – в Беларуси. Наибольшее распространение в последние годы получил люпин узколистный, что связано с его устойчивостью к антракнозу [7].

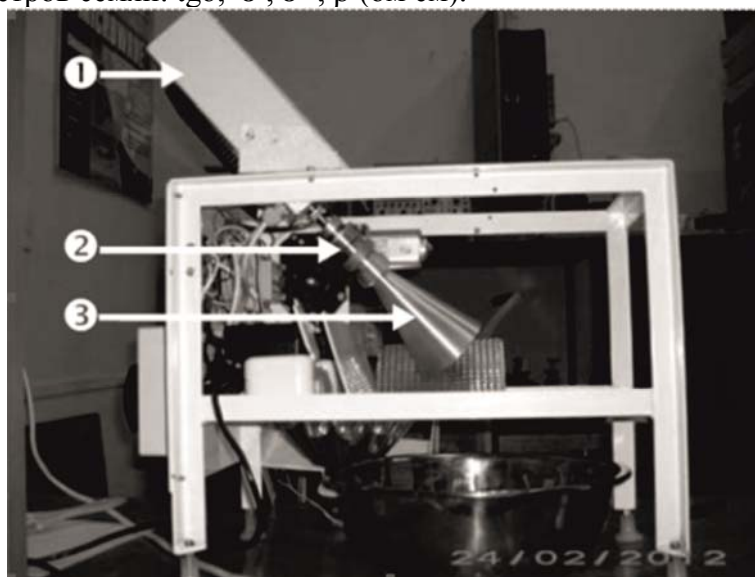
Многие ученые, такие как Такунов И.П., Купцов Н.С и др. отмечают огромное и многостороннее значение люпина [8]. Он используется в различных целях в земледелии, животноводстве, лесоводстве, садоводстве, цветоводстве, почвозащитном деле, медицине, парфюмерии, лакокрасочной промышленности. Перечисленным положительным свойствам люпина противостоит ряд свойств, которые сдерживают расширение его посевов. В первую очередь, это относительно низкая и неустойчивая урожайность. Потенциальные возможности реализуются в лучшем случае на 50% [7]. Поэтому разработка приемов и технологий возделывания люпина узколистного с целью повышения его семенной продуктивности является актуальной научной задачей огромной практической значимости. Низкая урожайность люпина в производстве объясняется как объективными (вытекающими из биологии культуры), так и субъективными причинами, вызывающими огромную абортивность цветков, семян в бобах и частично сформированных бобов, достигающую 80–90% от числа цветков на растении [7].

Методы исследований

Объектом для изучения были выбраны растения *Lupinus angustifolius* L. сорта «Першацвет».

В качестве стимулирующего фактора на семена люпина было выбрано электромагнитное воздействие, которое проводилось в Институте ядерных проблем БГУ на лабораторной установке для микроволновой обработки семян различных

сельскохозяйственных культур в широком частотном диапазоне (от 37 до 120 ГГц) с плавной регулировкой мощности от 1 до 10 мВт. Низкоинтенсивное электромагнитное воздействие производилось в различных частотных режимах: Режим 1 (частота обработки 53,57–78,33 ГГц, время обработки 20 минут); Режим 2 (частота обработки 64,0–66,0 ГГц, время обработки 12 минут) и Режим 3 (частота обработки 64,0–66,0 ГГц, время обработки 8 минут). Выбор режимов обусловлен ранее выполненными теоретическими и экспериментальными исследованиями взаимодействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения с биологической мембраной, которые подтвердили правильность выбранной в качестве объекта для электродинамического анализа модели структуры биологической мембраны [9]. Для определения характеристик внешнего электромагнитного излучения выполнено электродинамическое моделирование (все вычисления проводились для семян с усредненными геометрическими размерами и для количества семян равного 1000 шт.), а также с учетом предварительно измеренных электрических параметров семян: $\text{tg}\delta$, ϵ' , ϵ'' , ρ (ом см).



1 – микроволновой модуль; 2 – преобразователь поляризации;
3 – рупорная коническая антенна

Рисунок 1 – Лабораторная установка для микроволновой предпосевной обработки семян

Установка (рисунок 1) состоит из двух сверхвысокочастотных (СВЧ) модулей, работающих в различных частотных диапазонах, и каждый из которых состоит из микроволнового генератора с перестраиваемой частотой и регулируемой мощностью, вентиля и конической пирамидальной антенны. Для автоматизации процесса обработки и повышения ее производительности устройство дополнительно снабжено загрузочным бункером с лотком выгрузки для семян, подлежащих обработке, вращающимся столом и приемным бункером с лотком загрузки.

Вращающийся стол используется для перемещения семян во время их обработки от загрузочного бункера до приемного. Для исключения недостатков, присущих устройствам для предпосевной обработки семян, в которых используется линейно-поляризованная волна, в микроволновой модуль дополнительно введен преобразователь волны СВЧ с линейной поляризацией в волну СВЧ с круговой поляризацией [10].

Лабораторный эксперимент был заложен в трехкратной повторности для каждого варианта. Семена проращивали в растительных на увлажненной фильтровальной бумаге на протяжении 7 дней при температуре 20–21°C. Каждая партия контрольных и опытных образцов содержала по 50 семян. Оценивали всхожесть и морфометрические показатели корней и проростков на 7 сутки прорастания. Проросшими считались семена с зародышевым

корешком более 0,5 см. В результате эксперимента получены данные о всхожести, морфометрических параметрах ювенильных растений.

Для оценки скорости набухания семена взвешивались с интервалом 1–2 часа в течение суток.

Определение проницаемости мембран в семенах проводили следующим образом. Семена в количестве 25 штук помещали в 50 мл дистиллированной воды на 25 ч при 25°C, затем воду сливали и измеряли интенсивность флуоресценции вышедших веществ в ультрафиолетовой части спектра (длина волны 322 нм) на спектрофотометре Agilent 8453 (США) [11].

Определение активности амилазы проводили по модифицированному нами методу на основе методов Третьякова Н.Н. и Ермакова А.И. [12, 13]. Активность амилазы рассчитывали по следующей формуле:

$$x = (D - D_1)\alpha V / DmV_1,$$

где D – оптическая плотность контрольного раствора; D_1 – оптическая плотность опытного раствора; α – количество внесенного крахмала; m – масса навески, г; V – объём исходной ферментной вытяжки, см³; V_1 – объём вытяжки, взятой для инкубирования, см³ [12, 13].

Полученные результаты обрабатывались с помощью статистического пакета программ М. Excel.

Результаты и обсуждение

Переход семян от состояния покоя к прорастанию на первых стадиях происходит в одном направлении – к высвобождению различных структур из связанного состояния. В набухающие семена вода сначала поступает как в капиллярно-пористое тело и связывается с гидрофильными соединениями – это так называемое физическое набухание, которое оценивается по количеству воды, поглощенному семенами. В живых семенах постепенное увеличение оводненности в ходе физического набухания приводит к последовательной активации основного метаболизма: при 20–22% влажности – активация гликолиза, цикла Кребса, взаимопревращений аминокислот, при 40–45% влажности стимулируется экспрессия генома и происходит полная активация дыхания за счет завершения митохондриогенеза; при 50–55% – активация синтеза белка, а также деградации запасного белка и крахмала [14, 15]. Указанные уровни оводненности для каждого из процессов являются критическими, так как процессы не активируются при меньшей влажности. Таким образом, к концу физического набухания (55–60% влажности) и началу физиологического набухания в семенах активирован весь основной метаболизм, но этого недостаточно для начала роста.

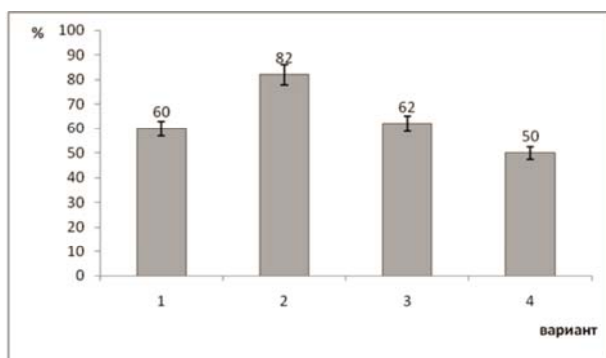
На фоне активированного основного метаболизма в осевых органах начинаются процессы, подготавливающие начало растяжения клеток, в первую очередь накопление осмотиков – сахаров и ионов калия, а также подкисление оболочек за счет протонов, выделяемых из цитоплазмы H^+ -АТФазой плазмалеммы; в результате подкисления размягчаются клеточные стенки, что позволяет клеткам увеличивать объём [16, 17]. Таким образом, именно осевые органы клетки становятся способными увеличивать оводненность (по сравнению с уровнем, достигнутым за счет физического набухания). Поступающая в вакуоли вода давит через цитоплазму на размягченные оболочки клеток, и клетки начинают расти растяжением. Покоящиеся семена предварительно выходят из состояния покоя, после чего прорастают. Затем продолжается поглощение воды и начинается обмен метаболитами между порастающим семенем и окружающей средой, что выражается в сдвигах процессов проницаемости [14].

В ходе исследования скорости набухания и прорастания семян люпина узколистного под влиянием различных режимов ЭМИ было выявлено, что данный показатель практически не отличался от контрольных значений, за исключением этапа «физиологического

набухания», где в случае Режима 1 этот показатель был на 14%, а Режима 2 на 15,5% выше контрольных значений.

Функциональная активность клеточных мембран может быть оценена по степени выхода в окружающую среду низкомолекулярных метаболитов нуклеотидного обмена. В литературе имеются сведения, что выход низкомолекулярных нуклеотидов из клеток незначителен в норме и резко усиливается под действием стрессовых факторов [18]. Анализ влияния ЭМ обработки на выход низкомолекулярных веществ из семян *Lupinus angustifolius* L. сорта «Першацвет» спустя 25 часов после начала набухания показал, что достоверное повышение данного показателя относительно контроля отмечается только в случае Режима 3, тогда как в отношении Режимов 1 (стимуляция) и Режима 2 (ингибирование) изменение данного показателя не является достоверным (рисунок 2).

Таким образом, мы наблюдаем влияние ЭМП на барьерную функцию мембран за счет стимуляции высвобождения низкомолекулярных белков и, возможно, более сложных надмолекулярных структур, по существу, аналогичен эффекту повышения вязкости цитоплазмы. Важно отметить, что воздействие ЭМП на барьерную функцию мембран происходит именно на той стадии, когда в клетках сформированы близкие к равновесным условия. В результате после ЭМ обработки наблюдается увеличение выхода электролитов с последующим его замедлением [1].



1 – контроль; 2 – Режим 1; 3 – Режим 2; 4 – Режим 3

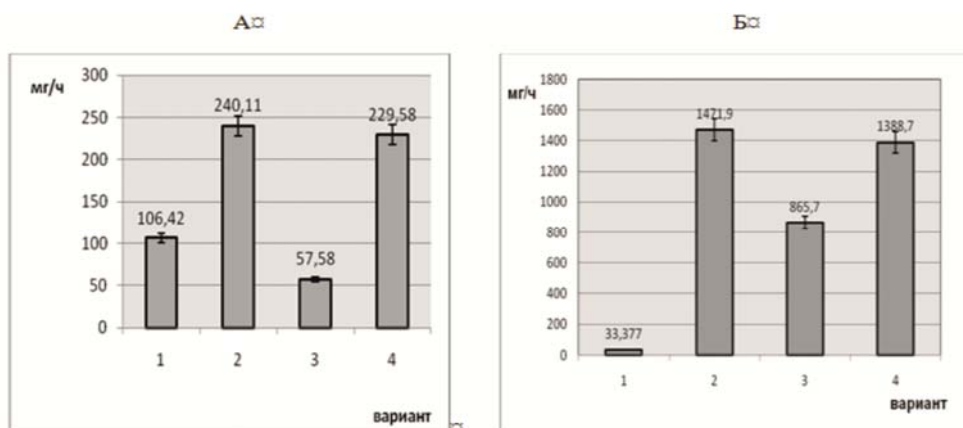
Рисунок 2 – Выход низкомолекулярных веществ в раствор через 25 ч набухания семян *Lupinus angustifolius* L. сорта «Першацвет»

В свою очередь, различная чувствительность к ЭМП у разных процессов в ходе прорастания семян позволяет проводить дифференциальные измерения. Надежность регистрации повышается за счет измерения нескольких показателей, которые могут быть сопоставлены между собой и данными контроля. Такими показателями являются: изменение рН вблизи поверхности набухающих семян, гидролитическая активность ферментов (амилаз, эстераз и др.), высвобождаемых в ходе набухания семян и кинетика выхода продуктов из реакции, а также всхожесть семян, морфометрические показатели на ранних этапах онтогенеза и другие косвенные биологические характеристики [1].

Амилазы – ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз крахмала, гликогена и других родственных олиго- и полисахаридов. При прорастании семян активность их во много раз возрастает. Важная роль данного фермента в жизни растений заключается в том, что с его участием такое запасное органическое вещество, как крахмал из нетранспортабельной формы превращается с участием еще ряда ферментов, в транспортные сахара, направляющиеся в точки роста [12, 19]. Кроме того, повышение активности амилазы при прорастании семян во многом характеризуют интенсивность процессов «физиологического набухания», связанную с накоплением осмотически активных веществ в семенах [14].

В связи с этим заметный интерес представляет исследование активности фермента амилазы как маркера первичной стрессовой реакции растительных организмов на низкоинтенсивное электромагнитное излучение СВЧ-диапазона. Как известно, в ходе первичной индуктивной стрессовой реакции растений увеличивается проницаемость мембран, изменяется проницаемость к ионам K^+ и Ca^{2+} , что приводит к деполяризации

мембран, тормозится работа H^+ -АТФ-азы, снижается рН цитоплазмы, способствующее активации гидролаз [19].

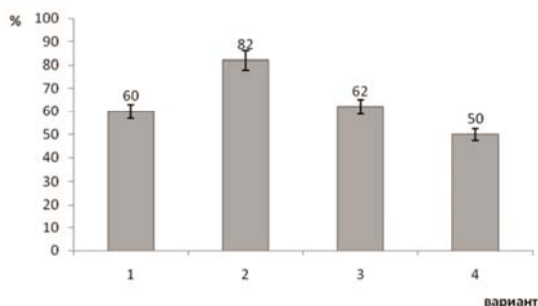


1 – контроль; 2 – режим 1; 3 – режим 2; 4 – режим 3

Рисунок 3 – Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения на активность амилазы через 18 ч (А) и 72 ч (Б) набухания *Lupinus angustifolius* L.

В ходе анализа влияния различных режимов ЭМИ на активность амилаз в семенах *Lupinus angustifolius* L. установлено увеличение активности данных гидролитических ферментов более чем в 2 раза в случае Режимов 1 и 3 и снижение 45,9% в случае Режимы 2 (рисунок 3А) через 18 часов набухания. Активность амилаз меняется в процессе прорастания семян, так спустя 72 часа после набухания снижается активность у контрольных растений и резко возрастает под влиянием всех изучаемых режимов, особенно Режимов 1 и 3 (рисунок 3Б). Это свидетельствует о том, что изучаемые режимы ЭМИ являются пусковым стрессовым механизмом, изменяющим первичные метаболические процессы растений.

В ходе исследований отмечено достоверное увеличение всхожести *Lupinus angustifolius* L. на 22% в случае Режимы 1, снижение на 10% под воздействием Режимы 3 и отсутствие достоверных различий с контролем при обработке Режимом 2 (рисунок 3), что, возможно, является результатом сдвигов в метаболических процессах семян под влиянием низкоинтенсивного электромагнитного излучения.



1 – контроль; 2 – режим 1; 3 – режим 2; 4 – режим 3

Рисунок 4 – Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения на всхожесть семян *Lupinus angustifolius* L. сорта «Першацвет»

Анализ морфометрических параметров семидневных проростков, выращенных из семян, подвергнутых предпосевному воздействию ЭМИ показал, что на данном этапе отсутствуют достоверные отличия в длине и массе проростков контрольных и опытных растений (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения СВЧ-диапазона на морфометрические показатели 7-мидневных растений *Lupinus angustifolius* L. сорта «Першацвет»

Вариант	Длина, см	Масса, г
Контроль	4,1±1,7	0,41±0,07
Режим 1	4,1±1,8	0,45±0,07
Режим 2	4,5±2,8	0,37±0,08
Режим 3	4,2±1,9	0,39±0,07

Выводы

Таким образом, установлены достоверные сдвиги в проницаемости покровов семян *Lupinus angustifolius* L. сорта «Першацвет» и активности амилаз под влиянием изучаемых режимов низкоинтенсивного электромагнитного излучения, что, вероятно, может расцениваться как проявление стрессовой реакции, определяющей, вероятно, в дальнейшем характер адаптационных изменений на ЭМИ воздействие СВЧ-диапазона. Однако пока механизм действия ЭМИ недостаточно изучен нельзя исключать и самый неопределенный уровень воздействия – информационный, когда внешний поток энергии электромагнитного поля может вызывать изменение алгоритма жизнедеятельности. В этом случае действие поля накладывается на эндогенные ритмы растительных объектов, что, в зависимости от условий и характера воздействия, может привести как к стимуляции их роста, так и его угнетению, что подтверждается и другими авторами [1, 20].

Список литературы

1. Влияние высокочастотной электромагнитной обработки семенного материала зернобобовых культур на их посевные качества и продуктивность / В.В. Ажаронк [и др.] // Электронная обработка материалов. – № 4. – 2009. – С. 76–86.
2. Гуляев, Ю.В. Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы / Ю.В. Гуляев, А.Х. Тамбиев // Радиотехника, 2003. – 175 с.
3. Бецкий, О.В. Механизмы биологического действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайней высокой частоты / О.В. Бецкий, В.В. Кислов, Н.Н. Лебедева // Сб. трудов «Миллиметровые волны в медицине и биологии». – М., 2007. – С. 207–210.
4. Левин, В.И. Агроэкологические эффекты воздействия на семена растений электромагнитных полей различной модальности: автореф. дис.... доктора с\х наук: 06.01.15. – В.И. Левин; – М., 2000. – 43 с.
5. Режим доступа: <http://rushitech.polymixweb.com/embib.htm> – Дата доступа: 20.05.2013.
6. Pietruszewski, S. Muszynski, A. Dziwulska Electromagnetic fields and electromagnetic radiation as non-invasive external stimulants for seeds (selected methods and responses) // Int. Agrophysics. – 2007. – Vol. 21. – P. 95–100.
7. Персикова, Т.Ф. Продуктивность люпина узколистного в условиях Беларуси / Т.Ф. Персикова, А.Р. Цыганов, А.В. Какшинцев. – Минск: ИВЦ Минфина, 2006. – 179 с.
8. Купцов, Н.С. Узколистный люпин в современной земледелии / Н.С. Купцов // Земляробства і ахова раслін. – 2004. – № 6. – С. 7–11.
9. Карпович В.А., Родионова В.Н. Патент РБ №5580 Способ предпосевной обработки семян овощных или зерновых культур. Выд. 23.06.2003г.
10. Модифицированный метод предпосевной микроволновой обработки семян / Н.В. Пушкина [и др.] // Новости науки и технологий. – № 2. – Т. 21. – 2012. – С. 36–40.
11. Задворнова, Ю.В. Влияние брассиностероидов на физиолого-биохимические показатели качества семян *Brassica oleracea* L. в условиях ускоренного старения: дис....канд. биол. наук: 03.00.12 / Ю.В. Задворнова. – Минск, 2006. – 130 л.
12. Практикум по физиологии растений / Н.Н. Третьяков [и др.]; под ред. Н.Н. Третьякова – М.: КолосС, 2003. – 288 с.
13. Методы биохимических исследований растений / А.И. Ермаков [и др.]; под ред. А.И. Ермакова. – Л.: Агропромиздат. Ленинградское отделение, 1987. – 430 с.
14. Обручева, Н.В. Физиология инициации прорастания семян / Н.В. Обручева, О.В. Антипова // Физиология растений. – 1997. – Т. 44. – С. 286–302.
15. Обручева, Н.В. Динамика углеводов в осевых органах семян конского каштана при переходе от покоя к прорастанию / Н.В. Обручева, С.В. Литягина, А. Рихтер // Физиология растений. – 2006. – Т. 53. – № 6. – С. 869–879.
16. Полевой, В.В. Физиология растений / В.В. Полевой. – М. Высш. шк., 1989. – 464 с.
17. Медведев, С.С. Физиология растений: Учебник. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2004. – 336 с.
18. О феномене самозащиты клеток от теплового повреждения / А.Н. Руденок [и др.] // Докл. АН СССР. – 1973. – Т. 4. – С. 977–981.
19. Биохимия растений: учебно-метод. пособие / Сост. И.Л. Бухарина, О.В. Любимова – Ижевск: ФГОУВПО Ижевская ГСХА, 2009. – 14с.
20. Penuelas J., Llusia J., Martinez B. Diamagnetic Susceptibility and Root Growth Responses to Magnetic Fields in *Lens culinaris*, *Glycine soja*, and *Triticum aestivum* // Electromagnetic Biologu and Medicine. – 2004. – Vol. 23, № 2. – P. 97–112.