

МОЛЕКУЛЯРНО-МЕМБРАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНЫХ МИКРОВОЛНОВЫХ ПОЛЕЙ НА РАСТИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

¹Л.Ф.Кабашникова, ²Г.М.Войнов, ²А.А.Головач

¹ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. 220072, Беларусь, Минск, ул. Академическая, 27, *E-mail*: kabashnikova@mail.ru

²РУП «Институт системных исследований в АПК НАН Беларуси», 220108, Беларусь, Минск, ул. Казинца, 103, *E-mail*: tengr@yandex.ru

Эффективным и наукоемким способом повышения посевных качеств семян является использование стимулирующих факторов физической природы, в частности низкоинтенсивных микроволновых полей (НМП). В зависимости от особенностей структуры биологического объекта, подвергнутого воздействию микроволновой энергией на фиксированной частоте, при определенном уровне мощности источника и длительности излучения, результат действия может быть различным – от активизации клетки до ее угнетения и даже гибели. Это создает принципиальную возможность влияния на физиологические и биохимические процессы, протекающие в биологических объектах в очень широких пределах [1].

В современном сельскохозяйственном производстве получение стабильно высоких урожаев культур невозможно без интенсивного применения средств химизации – фунгицидов, микроэлементов, регуляторов роста растений. Особую актуальность использование средств защиты растений имеет для озимых культур, которые подвергаются воздействию низких температур в период перезимовки. В том плане микроволновая стимуляция семян – принципиально новый, экологически безопасный и экономически выгодный способ повышения посевных качеств семян.

Белорусскими учеными разработан опытный образец микроволнового модуля, в котором используется генератор микроволн трехсантиметрового диапазона (8 – 12) ГГц. Установка для предпосевной биофизической обработки семян (рисунок 1) включает: загрузочный бункер для семян (1), блок источников питания микроволнового модуля (2), двигатель привода системы выгрузки семян после окончания режима предпосевной обработки (3), двигатель вращения бункера для обработки семян (4), бункер обработки семян (5), блок управления режимом работы микроволнового модуля (6), микроволновый блок (7), тумблер подачи питающего напряжения (8), кнопки включения и выключения модуля (9, 10), тумблер включения микроволнового блока (11).

Семена подвергаются нетепловому воздействию электромагнитных волн низкой интенсивности, что обеспечивает экологическую чистоту и энергоэффективность, качество и безопасность сельскохозяйственной продукции. Технологический процесс основан на соблюдении принципов технического регулирования и требований мирового рынка к обеспечению качества и безопасности сельскохозяйственной продукции и продовольствия.

Разработана и прошла апробацию в полевых условиях технология предпосевной обработки семян озимого и ярового рапса, льна, озимой и яровой пшеницы, тритикале, сои и др. Показано, что НМП производят стимуляцию прорастания семян, способствуют повышению урожайности и качества семян, обеспечивают снижение материально-денежных затрат в расчете на единицу продукции и интенсификацию производства.

Результаты производственных испытаний, проведенных на озимом и яровом рапсе в ОАО «Рапс» (Минский район, Беларусь, 2008-2010 гг.) подтвердили агрономическую и экономическую целесообразность разработанного метода.

Рапс является стратегической культурой для Беларуси. В климатических условиях республики возделывание озимого и ярового рапса приобрело первостепенное значение как культуры универсального типа использования:

- для снижения дефицита в пищевых растительных жирах за счет отечественного производства рапсового масла;
- для производства биотоплива;
- для обеспечения животноводства высокобелковыми и жиросодержащими кормами (рапсового жмыха и шрота).

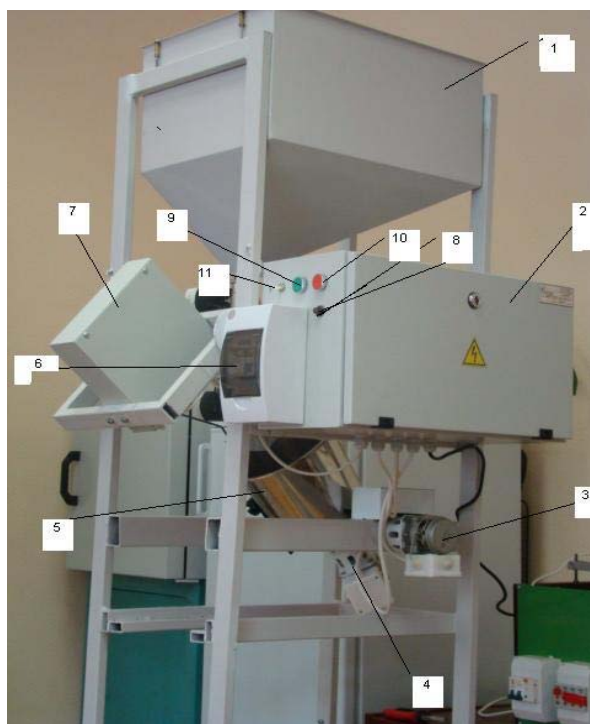


Рисунок 1 – Установка для предпосевной обработки семян рапса

Под озимый и яровой рапс в Беларуси отводится все больше пахотных земель. Если уборочная площадь в 2004 г. составляла 108 тыс. га (урожайность 11,8 ц/га), то уже в 2011 г. она возросла до 318 тыс. га, с урожайностью 12,8 ц/га (валовой сбор – 379,3 тыс. т). В перспективе планируется использовать под посевы озимого и ярового рапса до 500 тыс. га пашни, что составляет 10-11 % в структуре посевных площадей.

В результате биофизической обработки семян урожайность ярового рапса сорта Гермес повышалась на 2,0-4,5 ц/га, или 6,2-17,6% в зависимости от погодных условий вегетационного периода (таблица 1).

Обработки семян НМП стимулировала развитие более мощной корневой системы (рисунок 2), что способствовало повышенному усвоению влаги и питательных веществ из почвы и увеличению фотосинтезирующего аппарата растений. Кроме того, низкоинтенсивная биофизическая стимуляция семян повысила устойчивость растений ярового рапса к полеганию (рисунок 3).

Таблица 1 – Урожайность маслосемян ярового рапса Гермес (в амбарном весе, ОАО «Рапс»).

Вариант опыта	Урожайность, ц/га				Прибавка, ц/га			
	2008 г.	2009 г.	2010 г.	средн.	2008	2009	2010	средн.
Контроль (без обработки)*	32,5	30,0	22,1	28,2	-	-	-	-
Обработка семян НМП	34,7	34,5	26,0	31,7	2,2	4,5	3,9	3,5
НСР05	0,7	1,0	1,3	0,7				

*контроль (вариант без микроволновой обработки, семена протравлены инсектоfungицидом круйзер рапс)



Рисунок 2 – Влияние обработки семян НМП на развитие корневой системы у растений ярового рапса сорта Гермес в фазе 4–5 настоящих листьев



Рисунок 3 – Влияние обработки семян НМП на устойчивость растений ярового рапса к полеганию (посев справа)

В опытах с сортом озимого рапса Прогресс обработка семян НМП обеспечила прибавку урожая на 2,3-3,9 ц/га (10,9-11,2%) в зависимости от погодных условий вегетационного периода (таблица 2).

Таблица 2 – Урожайность маслосемян озимого рапса Прогресс (в амбарном весе, ОАО «Рапс»).						
Вариант опыта	Урожайность, ц/га			Прибавка, ц/га		
	2009 г.	2010 г.	средн.	2009 г.	2010 г.	средн.
Контроль (без обработки)	34,9	21,1	28,0	-	-	-
Обработка семян НМП	38,8	23,4	31,1	3,9	2,3	3,1
НСР05	2,1	1,7	1,2			

Обработка семян озимого рапса способствовала лучшему развитию растений перед уходом на перезимовку (рисунок 4), что отразилось на их устойчивости в зимний период и темпах роста после возобновления вегетации весной следующего года. Следует также отметить, что растения, выросшие из семян после обработки НМП, отличались более мощной разветвленной корневой системой (рисунок 5).



Рисунок 4 – Развитие надземной части растений озимого рапса Прогресс к фазе 5-6 развитых листьев: К- контроль; 1- обработка семян НМП

Различия в развитии корневой системы озимого рапса сорта Прогресс в наибольшей мере наблюдались в фазу «конец цветения – образование стручков» (рисунок 5), что впоследствии отразилось и на урожайности маслосемян (таблица 2).

В лабораторных исследованиях изучено влияние обработки семян ярового и озимого рапса НМП на их посевные качества и физиолого-биохимические параметры 11-дневных проростков. Растения выращивали в бумажных рулонах на водопроводной воде в климатокамере при освещенности 7-10 тыс. лк (40-50 Вт/м² ФАР) и температуре 20-22°C в течение 11 дней при фотопериоде 16 ч свет/8 ч темнота. Установлено стимулирующее действие предпосевной обработки НМП на посевные качества семян рапса – энергию прорастания, всхожесть, скорость потребления запасных веществ зародышем (таблица 3). Обнаружено существенное увеличение длины и массы надземной части проростка, а также массы корневой системы (таблица 4).



Рисунок 5 – Влияние разных режимов обработки семян НМП на развитие корневой системы озимого рапса в фазу конец цветения – образование стручков: Режимы 1-5 – разные варианты обработки семян НМП.

Вариант	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
Контроль	64±1,5	70±0,8
Обработка НМП	68±0,9	75±1,2

Таблица 4 – Влияние обработки семян НМП на морфологические показатели 11-дневных проростков ярового рапса Гермес

Вариант	Длина корня, см	Длина проростка, см	Масса 1 корня, мг	Масса 1 проростка, мг
Контроль	11,6±0,5	4,3±0,2	14,7±0,8	58,2±3,4
Обработка НМП	11,8±0,6	5,3±0,3	16,2±0,7	64,7±2,5

Фаза перехода от гетеротрофного типа питания к автотрофному является важным этапом в развитии растений. Характер становления фотосинтетического аппарата и возникновение процесса фотосинтеза существенно сказывается на дальнейшем формировании морфотипа растений. Количество хлорофилла в единице листовой поверхности, определяемое мезоструктурной организацией листа, является важным критерием развития фотосинтетического аппарата и отражает разные уровни его организации. В настоящее время, согласно теории фотосинтетической продуктивности [2], является общепризнанным, что мощность развития фотосинтетического аппарата – один из важных показателей, дающих представление о потенциальных возможностях продукционного процесса у растений. Обработка семян НМП способствовала увеличению на 20-40% по сравнению с контролем содержания фотосинтетических пигментов – хлорофилла ($a+b$) и каротиноидов в проростках рапса в пересчете на единицу сырой биомассы листа (таблица 5).

Впервые показано изменение функциональной активности цитоплазматических мембран клеток корней и листьев проростков рапса после микроволновой обработки семян, оцененных по проницаемости мембран для низкомолекулярных метаболитов и по активности H^+ -АТФ-аз клеток корней.

Функциональная активность клеточных мембран может быть оценена по степени выхода в окружающую среду низкомолекулярных метаболитов. Основная часть метаболитов представлена компонентами нуклеотидного обмена, максимумы поглощения которых находятся в ультрафиолетовой области спектра [3]. Согласно литературным данным, выход метаболитов из клеток незначителен в норме и резко усиливается при действии стрессовых факторов [4].

Таблица 5 – Влияние НМП на содержание фотосинтетических пигментов в 11-дневных проростках ярового рапса Гермес (мг/г сырой массы).

Варианты	Хл a	Хл b	Хл ($a+b$)	Каротиноиды	Хл a /Хл b	Хл ($a+b$)/карот.
Контроль	0,515±0,065	0,197±0,027	0,712±0,091	0,156±0,018	2,62±0,04	4,56±0,07
Режим 1	0,704±0,055	0,271±0,022	0,975±0,078	0,209±0,015	2,60±0,01	4,65±0,04
Режим 2	0,625±0,023	0,242±0,008	0,867±0,031	0,185±0,006	2,58±0,02	4,69±0,02

* Хл – хлорофилл. Режим 1 и 2 – разные варианты обработки семян НМП.

В таблице 6 приведены результаты определения проницаемости плазматических мембран клеток побегов и корней 11-дневных проростков озимого рапса для метаболитов нуклеотидного обмена. Установлено, что при комнатной температуре обработка семян НМП активизирует выход низкомолекулярных нуклеотидов из клеток побегов и корней по сравнению с необработанным контролем. При повышенной температуре (50°C), наоборот, наблюдали стабилизацию клеточных мембран и снижение активности выхода метаболитов из клеток.

Таблица 6 – Влияние НМП на проницаемость мембран клеток побегов и корней 11-дневных проростков озимого рапса Прогресс для свободных нуклеотидов.

Вариант опыта	Оптическая плотность, отн.ед. λ 260 при 20°C		Оптическая плотность, отн.ед. λ 260 при 50°C	
	Побеги	Корни	Побеги	Корни
Контроль	0,056±0,04	0,021±0,03	0,054±0,01	0,104±0,05
Обработка НМП	0,067±0,02	0,115±0,04	0,046±0,02	0,062±0,04

Ацидофицирующая активность корней может служить интегральным показателем уровня энергетического и ионного метаболизма клеток, поскольку с работой протонных насосов связан трансмембранный перенос многих ионов и органических веществ. При экзогенных воздействиях часто наблюдаются изменения функциональной активности белков мембранных H^+ATP -аз клеток корней, функционирование которых сопровождается выходом ионов водорода во внеклеточную среду. В этой связи было изучено влияние НМП на активность протонных насосов клеток корней у проростков рапса [5]. С учетом массы корней была рассчитана удельная концентрация протонов в инкубационном растворе. Полученные данные (таблица 7) свидетельствуют об активизации H^+ATP -аз клеток корней проростков рапса в результате предпосевной обработки семян НМП.

Таблица 7 – Влияние НМП на активность H^+ATP-аз клеток корней у 11-дневных проростков рапса				
Вариант	pH	$C[H^+]$, мкМ/мл	масса корней, г	Удельная $C[H^+]$, мкМ/г корней
Контроль	7,30	0,0000501	0,064	0,0008
Обработка НМП	7,13	0,0000741	0,055	0,0013

Известно, что в неблагоприятных условиях в растениях образуются активные формы кислорода (АФК) и активируются деструктивные процессы [6]. Принято считать, что одним из первых ответов организма на действие стрессоров является изменение уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ). Постоянный уровень свободно-радикальных процессов в клетках растения обеспечивается комплексной системой защиты, которая включает ферменты и низкомолекулярные антиоксиданты – каротиноиды, глутатион, аскорбат, α - токоферол [7]. Изучение активности ПОЛ в листьях рапса показало увеличение активности процессов ПОЛ в плазматических мембранах под влиянием двух режимов обработки НМП как у озимого, так и у ярового рапса (рисунок 6). В плазматических мембранах проростков озимого и ярового рапса после воздействия НМП на семена наблюдали увеличение активности перекисного окисления липидов на 30% и выше, что свидетельствует об активации сигнальных и защитных процессов в растительных клетках. Увеличение активности процессов ПОЛ выше контрольного уровня может быть первичным механизмом запуска сигнальных процессов с целью активации ядерных генов антиоксидантной системы растений, как на уровне синтеза низкомолекулярных соединений, так и ферментативных систем.

Установлено, что дополнительная обработка НМП точек роста растений ярового рапса в фазе 5-6 хорошо развитых листьев вызывает изменение структурно-функционального состояния цитоплазматических мембран, что способствует активации выхода низкомолекулярных метаболитов из растительных клеток (таблица 8).

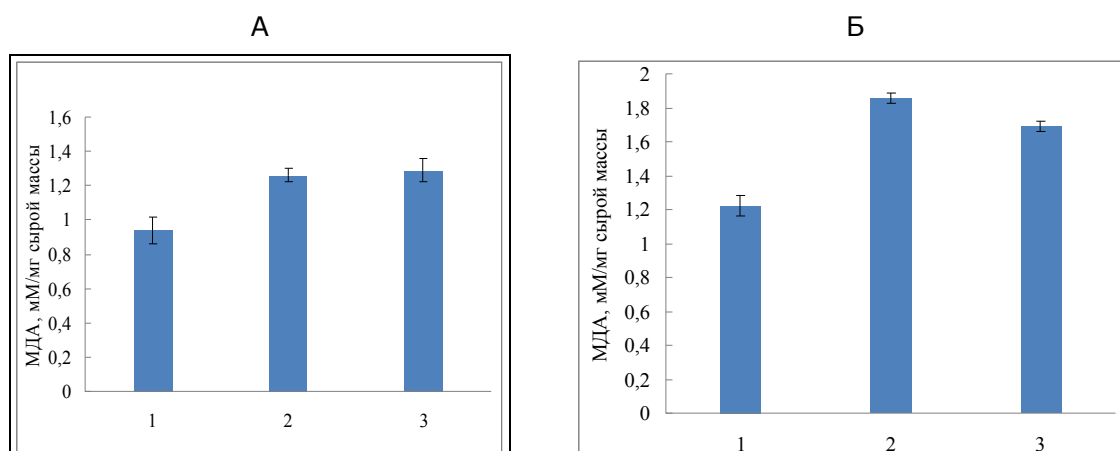


Рисунок 6 – Влияние НМП обработки семян на активность перекисного окисления липидов в плазматических мембранах клеток листа 11-дневных проростков рапса: А- яровой рапс Гермес; Б – озимый рапс Прогресс; 1- контроль, 2 – режим 1, 3- режим 2.

Таблица 8 – Влияние обработки НМП точек роста вегетирующих растений ярового рапса в фазе 5-6 листьев на проницаемость мембран клеток листа для свободных нуклеотидов.	
Вариант опыта	Оптическая плотность, отн.ед. $\lambda=260$ нм при 20 ⁰ С
Контроль	0,097±0,01
Обработка НМП (точки роста)	0,165±0,04

Полученные данные имеют большое значение для понимания молекулярно-мембранных механизмов действия НМП на растительную клетку и создают научную основу для разработки методов ранней диагностики наиболее эффективных микроволновых воздействий. Такие методы позволяют ускорить выбор наиболее эффективных режимов и сократить сроки разработки новых технологий предпосевной обработки семян НМП.

MOLECULAR AND MEMBRANE MECHANISMS OF LOW INTENSIVE MICROWAVE FIELDS ACTION ON PLANT CELLS

¹L.F.Kabashnikova, ²Q.M. Voinov, A.A.²Golovach

¹Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus, E-mail : kabashnikova@mail.ru

²Institute of System Research in Agroindustrial Complex of NAS of Belarus, E-mail: tengr@yandex.ru

Литература

1. Калинин Л.Г., Тучный В.П., Гаврилюк Н.Н. и др. Воздействие микроволнового поля на клеточные структуры семян полевых культур // В сб. «Микроволновые технологии в народном хозяйстве. Внедрение. Проблемы. Перспективы», Одесса, 2002, Вып. 4, С. 36-43.
2. Ничипорович А.А. Фотосинтетическая деятельность растений и пути повышения их продуктивности // Теоретические основы фотосинтетической продуктивности, М., 1972, С. 511-527.
3. Насонова Г.В., Прокопова Ж.В., Гамезо Н.В. и др. Идентификация свободных нуклеотидов и их компонентов, выделяющихся из переуплотненных культур дрожжей // Весці АН БССР, сер. біял. навук, 1977, № 6, С. 57 – 58.
4. Шаповалов А.А. Выделение органических веществ из клеток растений в связи с функциональным состоянием плазматических мембран // Успехи совр.биол., 1973, Т.76, вып. 1(4), С. 82-95.
5. Воробьев Л.Н.Егорова Н.Н. Энергетическая регуляция протондвижущей силы в корневой системе /Межвузовский сб. «Биохимия и биофизика транспорта веществ у растений», Изд-во: ГГУ, Горький, 1981, С.61-67.
6. Krause G.H. Photoinhibition of Photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms // *Physiol. Plant*, 1988, Vol. 74, N 3, P. 566-574.
7. Demmig-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin // *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, Vol. 1020, N 1, P. 1-24.