

**ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И СЛАБОГО МАГНИТНОГО
ПОЛЯ НА СОСТОЯНИЕ ХРОМАТИНА В ЯДРЕ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ
С ПОМОЩЬЮ ВИТАЛЬНОГО ОКРАШИВАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ
КРАСИТЕЛЕМ Хехст 33342****Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина (г. Харьков)*****Институт растениеводства им. В. Я. Юрьева НААН Украины (г. Харьков)**

Данная работа выполнена в рамках НИР «Дослідження особливостей адаптивної відповіді на електромагнітні поля та інші стресові навантаження на рівні клітини», номер госрегистрации 0112U008335 та «Дія електромагнітного випромінювання на молекулярні процеси, властивості клітин і процеси запліднення та ембріогенезу», № гос. регистрации 0112U008334.

Вступление. Искусственные электромагнитные поля уже давно привлекают внимание ученых как фактор, влияющий на физиологическое состояние растения в связи с возможностью их использования с практической целью – для повышения процента прорастания и энергии прорастания семян сельскохозяйственных растений [1]. Установлено, что особенно эффективна стимуляция микроволнами для ослабленных семян сельскохозяйственных растений [10]. Современные исследования также указывают на стимуляцию роста растительных организмов под действием слабых электромагнитных полей. В работе [9] было показано, что электромагнитное поле частотой 1800 МГц вызывает стимуляцию роста корней чечевицы пищевой, показано стимулирующее действие магнитного поля с магнитной индукцией 125 мТл на процент прорастания семян и энергию прорастания семян шалфея (*Salvia officinalis* L.) календулы (*Calendula officinalis* L.) [5]. Слабое низкочастотное электромагнитное излучение (частота 60 Гц) вызывает стимуляцию роста проростков и увеличение биомассы кукурузы, но угнетает рост проростков и накопление биомассы рапса [9]. Такие различия в реакции растений авторы связывают с различиями в типе фотосинтеза. Слабое переменное магнитное поле вызывает увеличение длины корней и размеров листьев проростков кукурузы и увеличение активности ферментов антиоксидантной защиты (пероксидазы и супероксиддисмутазы) [8].

Слабые переменные магнитные поля могут вызывать изменения в ультраструктуре органелл растительной клетки: разбухание вакуолей, нарушения

в структуре мембран, нарушение Ca^{2+} гомеостаза [6].

По нашему мнению, особая роль в реакции растительной клетки на электромагнитные излучения и магнитные поля принадлежит клеточному ядру, именно клеточное ядро является центром, регулирующим клеточный ответ на внешние воздействия. Изменение структуры хроматина в интерфазном ядре – важный уровень регуляции генной активности [7].

Целью данной работы было исследование реакции хроматина клеток корневых волосков гороха на действие микроволнового излучения и магнитного поля.

Объект и методы исследования. Эксперименты проводили на клетках корней гороха контрастных сортов Царевич, Вусатый 90, Харьковский Янтарный. Семена проращивали на водопроводной воде в чашках Петри в течение 4 суток. Корни проростков облучали электромагнитным полем миллиметрового диапазона и постоянным магнитным полем. Для получения электромагнитного поля применяли оригинальную установку, изготовленную сотрудниками кафедры теоретической радиофизики ХНУ имени В. Н. Каразина. Характеристики микроволнового излучения: частота $36,64 \pm 0,05$ ГГц, плотность мощности на уровне объекта 1 и 4 Вт/м². В качестве источника постоянного магнитного поля использовали постоянный магнит. Величина индукции магнитного поля на уровне объекта – 25 мТл. Время облучения составляло 1, 5 и 10 мин.

После воздействия корни гороха окрашивали раствором Хехст 33342 (концентрация 50 мкг/мл) в течение 5 мин для определения процента клеток с конденсированным хроматином [4]. На **рис. 1** представлены фотографии корневых волосков гороха, окрашенные Хехст 33342. В каждом варианте эксперимента просматривали 100 ядер, и определяли среднее значение и ошибку среднего. Эксперимент повторяли 3 раза.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента и теста

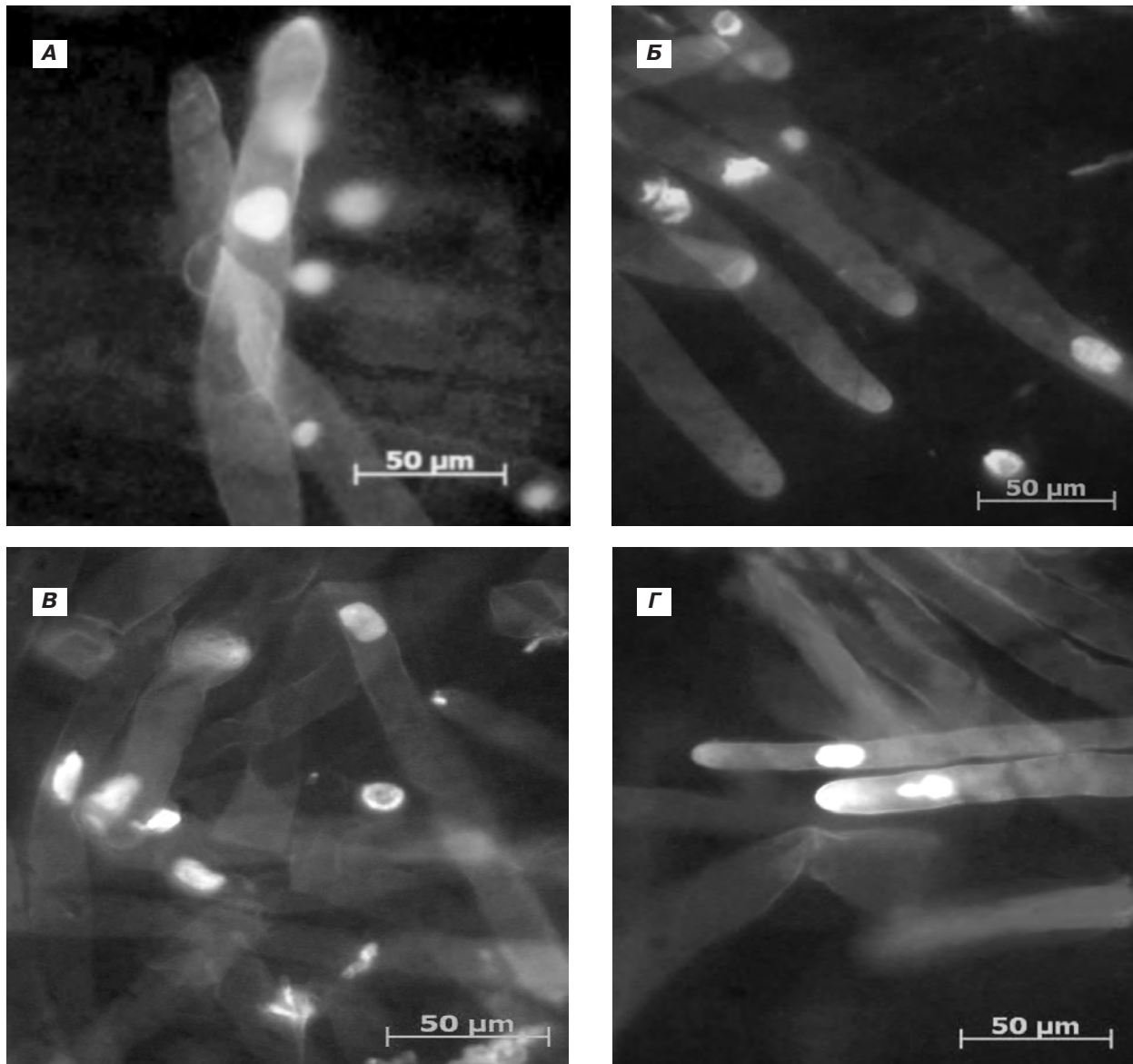


Рис. 1. Клетки корневых волосков гороха, окрашенные Хехст 33342. А – контроль, Б – микроволновое излучение 1 Вт/м², время воздействия 10 мин, В – микроволновое излучение 4 Вт/м², время воздействия 10 мин, Г – магнитное поле, время воздействия 10 мин.

дисперсионного анализа (ANOVA test). В работе принят уровень достоверности $P \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. На **рис. 2-4** представлены данные о влиянии микроволнового излучения на конденсацию хроматина в клетках корневых волосков гороха. Микроволновое излучение мощностью 1 и 4 Вт/м² и магнитное поле вызывают увеличение процента клеток с конденсированным хроматином.

Из представленных на **рис. 2-3** данных видно, что эффект микроволнового облучения зависит от времени облучения и от мощности облучения, при увеличении времени облучения и интенсивности облучения процент клеток с конденсированным хроматином возрастает. При действии на проростки магнитного поля эффект возрастает с увеличением

времени воздействия поля (**рис. 4**). Сортных различий в реакции на облучение микроволнами или магнитное поле не обнаружено.

Для того чтобы оценить влияние различных факторов, таких как время воздействия (Т) и различия между сортами (В) мы использовали тест дисперсионного анализа (ANOVA test) (**табл.**). Независимый фактор времени воздействия вызывает статистически достоверное изменение состояния конденсации хроматина в ядрах клеток коневых волосков гороха. Зависимый фактор сортных различий (В) не вызывает статистически достоверные изменения в состоянии хроматина при облучении микроволновым излучением и магнитным полем.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что микроволновое излучение вызывает

конденсацию хроматина в ядрах, что является проявлением клеточной реакции на стресс [7]. В литературе имеются свидетельства стрессового ответа на электромагнитные воздействия. В работе [3] было показано, что электромагнитное поле частотой 900 МГц вызывает повышение уровня экспрессии стрессовых регуляторных белков (bZIP и Pin2) в клетках листьев томатов посредством вхождения ионов Ca^{2+} в клетку растений и запуск протеинкиназных каскадов, регулируемых Ca^{2+} . Ранее нами было показано, что микроволновое излучение частотой 36,64 ГГц и мощностью 1 и 4 Вт/м² и магнитное поле интенсивностью 25 мТл вызывает повышение уровня Ca^{2+} в клетках корневых волосков гороха [11].

Таким образом, в данной работе с помощью окрашивания клеток флуоресцентным красителем

Таблица

Расчет влияния времени воздействия микроволнового излучения и магнитного поля и различий между сортами на конденсацию хроматина в ядрах клеток корневых волосков гороха

	F	P
Микроволновое излучение с плотностью мощности 1 Вт/м ²		
T	4369,38*	0,00
B	1,13	0,35
B*T	4,04*	0,03
Микроволновое излучение с плотностью мощности 4 Вт/м ²		
T	1205,39*	0,00
B	0,03	0,97
B*T	0,57	0,69
Магнитное поле		
T	2756,04*	0,00
B	0,16	0,85
B*T	0,39	0,81

Примечание: T – независимый фактор времени воздействия: 1 – 1 мин, 2 – 5 мин, 3 – 10 мин; B – зависимый фактор различий сортов: 1 – Царевич, 2 – Вусатый, 3 – Харьковский янтарный.

Хехст 33342, метода, который ранее не применялся в подобных исследованиях на растениях, было показано, что слабое микроволновое излучение и магнитное поле вызывают конденсацию хроматина в клетках корневых волосков гороха, степень проявления реакции зависит от интенсивности воздействия. По нашему мнению, данная реакция является проявлением стрессового ответа клеток гороха на электромагнитные воздействия.

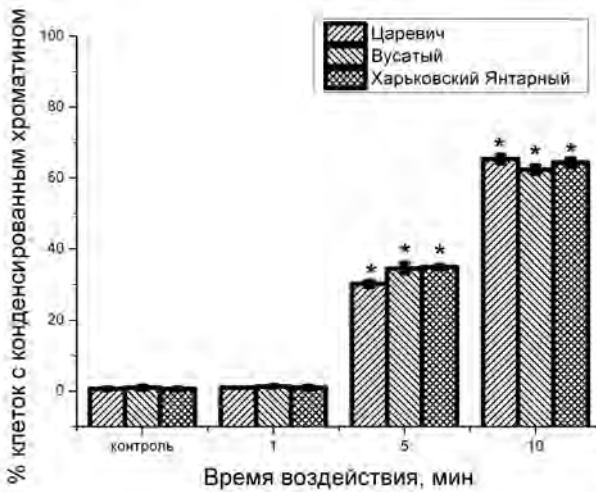


Рис. 2. Влияние микроволнового излучения с плотностью мощности 1 Вт/м² на процент клеток корневых волосков гороха с конденсированным хроматином.

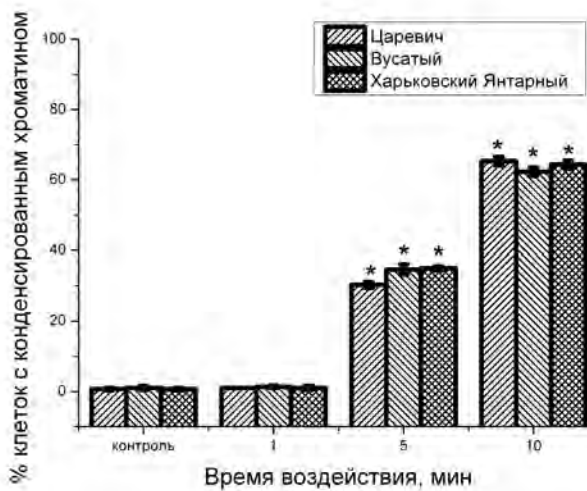


Рис. 3. Влияние микроволнового излучения с плотностью мощности 4 Вт/м² на процент клеток корневых волосков гороха с конденсированным хроматином.

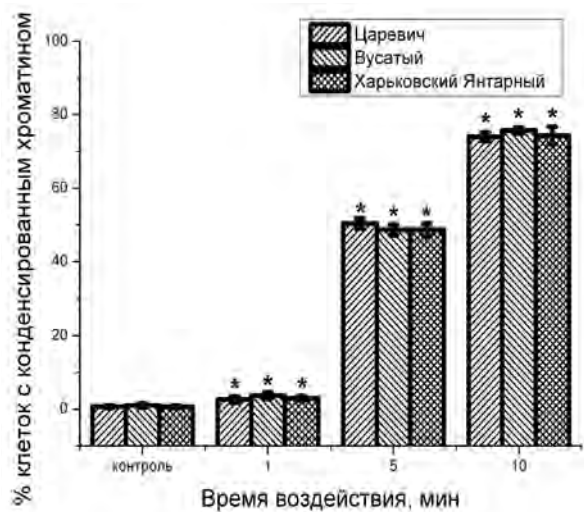


Рис. 4. Влияние магнитного поля на процент клеток корневых волосков гороха с конденсированным хроматином.

Выводы.

1. Было показано, что микроволновое излучение и постоянное магнитное поле вызывают конденсацию хроматина в ядрах клеток корневых волосков гороха.

2. Микроволновое излучение с плотностью мощности 1 Вт/м² и временем экспозиции 5 и 10 минут и плотностью мощности 4 Вт/м² и временем экспозиции 1, 5 и 10 минут вызывает конденсацию хроматина. Микроволновое излучение с плотностью мощности 1 Вт/м² при экспозиции 1 минута не вызывает конденсации хроматина.

3. Постоянное магнитное поле 25 мТ при экспозиции 1, 5 и 10 минут вызывает конденсацию хроматина.

4. Сортовых различий в реакции клеток на микроволновое излучение и магнитное поле не обнаружено.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейшем планируется проверить проявление различных клеточных маркеров стресса в ответ на действие на растения магнитного поля. Данные исследования имеют практическое значение в связи с разработкой методов стимуляции прорастания семян особо ценных форм растений для селекционных учреждений.

Литература

1. Ничипорович А. А. Проблема стимуляции семян (теория и практика) / А. А. Ничипорович // Известия АН СССР, серия биологическая. – 1982. – № 2. – С. 180-189.
2. Akbal A. Effects of electromagnetic waves emitted by mobile phones on germination, root growth, and root tip cell mitotic division of *Lens culinaris* Medik / A. Akbal, Y. Kiran, A. Sahin [et al.] // Pol. J. Environ. Stud. – 2012. – Vol. 21, № 1. – P. 23-29.
3. Beaubois E. Intercellular communication in plants: evidence for two rapidly transmitted systemic signals generated in response to electromagnetic field stimulation in tomato / E. Beaubois, S. Girard, S. Lallechere [et al.] // Plant. Cell. Environ. – 2007. – Vol. 30. – P. 834-844.
4. Duke R. C. Methods of analyzing chromatin changes accompanying apoptosis of target cells in killer cell assays / R. C. Duke // Methods Mol. Biol. – 2004. – Vol. 282. – P. 43-66.
5. Flyrez M. Effect of magnetic field treatment on germination of medicinal plants *Salvia officinalis* L. and *Calendula officinalis* L. / M. Flyrez, E. Martnnez, M. V. Carbonell // Pol. J. Environ. Stud. – 2012. – Vol. 21, № 1. – P. 57-63.
6. Galland P. Magnetoreception in plants / P. Galland, A. Pazur // J. Plant Res. – 2005. – Vol. 118. – P. 371-389.
7. Lewin B. Genes VIII / B. Lewin. – London : Pearson Prentice Hall, 2004. – 1004 p.
8. Shabrangi A. Effect of magnetic fields on growth and antioxidant systems in agricultural plants / A. Shabrangi, A. Majd // PERS Proc. – Beijing, 2009. – P. 1142-1147.
9. Shabrangi A. Comparing effects of extremely low frequency electromagnetic fields on the biomass weight of C3 and C4 plants in early vegetative growth / A. Shabrangi, A. Majd, M. Sheidalet [et al.] // Progr. Electromagnet. Res. Symp. Proc. – Cambridge, 2010. – P. 593-598.
10. Shakhbazov V. G. Influence of the state of polarization of electromagnetic wave on the biological properties of seeds of agricultural plants / V. G. Shakhbazov, L. M. Chepel, N. N. Gorobet [et al.] // 13 International Wroclaw Symposium and Exhibition on Electromagnetic Compatibility. – Wroclaw, 1996. – P. 133-135.
11. Shckorbatov Y. G. Effect of microwave irradiation of low intensity and magnetic fields on the Ca²⁺ contents in pea root cells / Y. G. Shckorbatov, O. S. Pasiuga, I. F. Kovalenko [et al.] // Proc. 23rd Int. Crim. Conf. CriMiCo'13. – Sevastopol, 2013. – P. 1101-1102.

УДК 576.315.4.

ВПЛИВ МІКРОХВИЛЬОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ І СЛАБКОГО МАГНІТНОГО ПОЛЯ НА СТАН ХРОМАТИНУ В ЯДРІ КЛІТИН РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ ВІТАЛЬНОГО ФАРБУВАННЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНИМ БАРВНИКОМ Хехст 33342

Пасюга О. С., Пасюга В. М., Рябуха С. С., Шкорбатов Ю. Г.

Резюме. Досліджували вплив мікрохвильового випромінювання і слабкого магнітного поля на стан хроматину клітин корневих волосків гороху посівного *Pisum sativum* L. Досліджували три контрастних сорти гороху: Царевич, Вусатий 90, Харківський Бурштиновий. Умови експерименту : проростки рослин опромінювали мікрохвильовим випромінюванням з частотою 36,64 ГГц , щільністю потоку потужності 1 і 4 Вт/м² протягом 1, 5 і 10 хвилин і піддавали впливу постійного магнітного поля з магнітною індукцією 25 мТл протягом 1, 5 і 10 хвилин. Стан хроматину оцінювали за забарвленістю ядер барвником Хехст 33342. Мікрохвильове випромінювання і слабке постійне магнітне поле викликає конденсацію хроматину в ядрах клітин корневих волосків гороху. Спостережувані зміни стану хроматину свідчать про те , що мікрохвильове випромінювання викликає стресову відповідь клітин корневих волосків гороху.

Ключові слова: *Pisum sativum* L., кореневі волоски, хроматин.

УДК 576.315.4.

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И СЛАБОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА СОСТОЯНИЕ ХРОМАТИНА В ЯДРЕ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ ВИТАЛЬНОГО ОКРАШИВАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ КРАСИТЕЛЕМ Хехст 33342

Пасюга О. С., Пасюга В. Н., Рябуха С. С., Шкорбатов Ю. Г.

Резюме. Исследовали влияние микроволнового излучения и слабого магнитного поля на состояние хроматина клеток корневых волосков гороха посевного *Pisum sativum* L. Исследовали три контрастных сорта гороха: Царевич, Вусатый 90, Харьковский Янтарный. Условия эксперимента: проростки растений облучали микроволновым излучением с частотой 36,64 ГГц, плотностью потока мощности 1 и 4 Вт/м² в течение 1, 5 и 10 минут и подвергали воздействию постоянного магнитного поля с магнитной индукцией 25 мТл в течение 1, 5 и 10 минут. Состояние хроматина оценивали по окрашиваемости ядер красителем Хехст 33342. Микроволновое излучение и слабое постоянное магнитное поле вызывает конденсацию хроматина в ядрах клеток корневых волосков гороха. Наблюдаемые изменения состояния хроматина свидетельствуют о том, что микроволновое излучение вызывает стрессовый ответ клеток корневых волосков гороха.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., корневые волоски, хроматин.

UDC 576.315.4.

Influence of Microwave Irradiation and Magnetic Field on the State of Chromatin of Plant Cells by Vital Staining with Fluorescent Stain Hoechst 33342

Pasiuga O. S., Pasiuga V. N., Ryabukha S. S., Shckorbatov Y. G.

Abstract. The effects of artificial electromagnetic fields were investigated as a factor affecting the physiological state of the plant with a practical purpose – to increase the percentage of germination and germination energy of seeds of agricultural plants. Weak electromagnetic factor can cause changes in the ultrastructure of plant cell organelles: vacuole-swelling, disturbances in the structure of membranes, Ca²⁺ homeostasis violation. In our opinion, the cell nucleus plays a key role in plant cell response to electromagnetic fields. The changes in the structure of chromatin in the interphase nucleus is an important level of regulation of gene activity.

The aim of this work was to study the reaction cell chromatin of pea root hairs cells to microwave radiation and static magnetic field.

Materials and methods. In our investigation, we have used three contrasting cultivars of peas *Pisum sativum* L.: Tsarevich, Vusaty 90, Kharkivskiy Yantarny. Experimental conditions. In our experiments, we have used the source of microwave irradiation with frequency of 36.64 GHz, the power flux density of 1 and 4 W/m², exposure time of 1, 5 and 10 min. As a source of static magnetic field, we have used magnet with magnetic induction 25 mT, exposure time of 1, 5, 10 and 15 min. Chromatin state was assessed by staining of nuclei with fluorescent dye Hoechst 33342 in final concentration 50 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) and observing samples on fluorescent microscope LUMAM I-1 (LOMO, Russian Federation). In each cell sample, we analyzed 100 cells and determined the percentage of cells with condensed chromatin. We calculated the mean number of unstained cells for all 3 samples and the standard error of this value. All experimental results were statistically processed using Student's t-test and ANOVA test. The probability level assumed in this paper is P<0.05.

Results. The microwave radiation of power flux density of 1 W/m², exposure time of 5 and 10 min. and of also of intensity 4 W/m², exposure time of 1, 5 and 10 min. induce chromatin condensation in pea root hairs. The static magnetic field of intensity 25 mT, exposure time of 1, 5, 10 and 15 min. also induce chromatin condensation in pea root hairs. Microwave radiation with power flux density of 1 W/m² and exposure time of 1 min does not induce changes in the chromatin state. The cultivar related differences in response to microwaves or magnetic field exposure are not detected.

In this study by staining cells with a fluorescent dye Hoechst 33342, a technique that has not previously been used in such studies in plants, was shown that the weak microwaves and magnetic molecules cause chromatin condensation in pea root hair cells, the rate of the response depends the intensity of exposure. The observed changes in chromatin indicate that microwave radiation causes stress response of the cells of pea root hairs.

We plan to verify expression of various cellular stress markers in response to the magnetic field on the plants in future. Our studies are of practical importance in connection with the development of methods for the stimulation of seed germination of the most valuable forms in plant breeding institutions.

Key words: *Pisum sativum* L., root hairs, chromatin.

Рецензент – проф. Дубінін С. І.

Стаття надійшла 14. 11. 2013 р.