

Активация и ингибирование гравитропической реакции растений с помощью слабых комбинированных магнитных полей.

Н.А. Белова, В.В. Леднев.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, Московская обл., Россия, 142290.

Введение.

Известно, что слабые комбинированные магнитные поля (КМП), содержащие коллинеарно направленные постоянную, B_{DC} , и переменную, $B_{AC} \times \cos 2\pi ft$, компоненты магнитной индукции, способны оказывать существенное влияние на метаболические и функциональные свойства биосистем [1-5]. Биоэффекты КМП обусловлены их воздействием на скорость некоторых Ca^{2+} - зависимых биохимических реакций, играющих ключевую роль в регуляции метаболизма в клетках эукариот [6, 7]. Прежде всего – это реакции, опосредуемые протеинкиназой С и кальмодулин – зависимыми киназами. Первичными мишенями КМП в биосистемах являются ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} и K^+ , находящиеся в Ca^{2+} - связывающих центрах ферментов.

Согласно теории [7], максимальный биологический эффект КМП достигается при выполнении следующих условий: (1) частота переменной компоненты поля должна соответствовать резонансной частоте конкретного иона, т.е. Ca^{2+} , Mg^{2+} или K^+ , согласно выражению:

$$f_n = \frac{1}{n} \frac{q}{2\pi m} B_{DC} \quad (1),$$

где f_n - резонансная частота, (Герц); q - заряд иона (Кулон); m - масса иона (килограмм); B_{DC} - магнитная индукция постоянной компоненты КМП (Тесла),

n - целое число, равное 1, 2, 3...; (2) соотношение B_{AC}/B_{DC} величин магнитной индукции переменной и постоянной компонент поля, должно быть равным 1.84.

До настоящего времени абсолютное большинство экспериментальных исследований по изучению воздействия слабых магнитных полей в режиме параметрического резонанса было выполнено на тест – системах животного происхождения. Известно, однако, что системы внутриклеточной Ca^{2+} регуляции метаболизма в растениях близки к таковым в клетках животных [8, 9]. В частности, установлено, что в сигнальной цепи событий, приводящих к гравитропическому ответу, как в корнях, так и в надземных органах растений, важную роль играют Ca^{2+} - зависимые реакции фосфорилирования, осуществляемые киназами, подобными, хотя и не идентичными кальмодулин – зависимым киназам в клетках животных [10, 11]. В частности, в растениях обнаружено новое семейство Ca^{2+} - зависимых киназ (calcium – dependent protein kinase, CDPK), которые содержат в единой полипептидной цепи как киназный так и кальмодулиновый домены [12]. Соответственно, можно ожидать, что воздействие слабых КМП, настроенных на резонансные частоты ионов, взаимодействующих с Ca^{2+} - связывающими центрами киназ, приведет к модуляции гравитропических реакций растений. Серьезным аргументом в пользу этого предположения являются данные о влиянии Ca^{2+} - КМП на скорость Ca^{2+} - калмодулин зависимого фосфорилирования легких цепей миозина в бесклеточной системе [13, 14].

В данной работе мы приводим результаты экспериментов, подтверждающих возможность модуляции – активации и ингибирования – гравитропической реакции надземных осевых органов проростков проса, льна и клевера с помощью слабых КМП.

Методы и техника эксперимента.

Тест – системы. Проростки проса (*Panicum miliaceum*) и льна (*Linum bienne*) выращивали из семян в термостате при 26 °С в полной темноте в течение 3-5 дней в чашках Петри диаметром 90 мм на фильтровальной бумаге, смоченной 5 мл дистиллированной воды (по 50 семян в чашке), а также в специальных растильнях. Через 3–5 дней стебли проса и льна достигали длины 3–4 см. В опытах использовали верхние отрезки стеблей длиной 25 мм. Отрезки проса содержали колеоптиль и мезокотиль. От верхушки стеблей льна отрезали листья так, что отрезок содержал только часть стебля.

В опытах использовали также полевые (дикорастущие) проростки клевера лугового (*Trifolium pratense*). С этой целью нарезали примерно 100 стеблей одинаковой длины (около 10 см), которые до начала опыта помещали в вертикальном положении в цилиндры с водопроводной водой. Опыты начинали через 15–20 минут после сбора стеблей. От каждого из стеблей отрезали верхние части длиной 25 мм, с верхушек которых срезали листья.

Отрезки стеблей проса, льна и клевера раскладывали в чашки Петри диаметром 90 мм на фильтровальной бумаге, смоченной 2 мл дистиллированной воды по 15–20 отрезков на чашку. Положение базальных концов отрезков фиксировали, накладывая на них кольца, вырезанные из силиконового шланга. Иногда базальные концы отрезков прикрепляли к фильтровальной бумаге с помощью вакуумной силиконовой смазки (до добавления воды в чашку Петри). Время размещения 20 отрезков в одной чашке Петри составляло примерно 5 минут. Как в «опыт», так и в «контроль» ставили по 2 чашки Петри, т.е. по 40 отрезков стеблей. Примерно через 30 минут горизонтально расположенные отрезки проростков начинают изгибаться и через 3-3.5 часа ориентируются

против направления силы тяжести. Величину гравитропического ответа определяли путем измерения среднего по числу отрезков угла изгиба (отклонения конца отрезка от горизонтальной плоскости) $\alpha \pm \delta$, где δ стандартная ошибка средней величины. Измерения проводили через 2-3 часа после начала опыта с помощью транспорта. Время измерения углов гравитропического изгиба 20 отрезков, размещавшихся в одной чашке Петри, составляло примерно 3–4 минуты. Все опыты проводили в темноте при комнатной температуре, которая изменялась в разные дни от 15 до 25 °С.

Магнитные поля. В опытном поле в качестве постоянной магнитной компоненты поля, B_{DC} , использовали локальное магнитное поле Земли в месте расположения тест – системы, а переменную (синусоидальную) компоненту, B_{AC} , направленную коллинеарно земному полю, создавали с помощью катушечной пары Гельмгольца диаметром 39 см. Для подачи переменного напряжения на катушку Гельмгольца использовали генератор Г4–153, обеспечивающий поддержание заданной частоты и напряжения с точностью до четвертого знака. Контрольные образцы растений находились в постоянном магнитном поле Земли. Величины постоянного магнитного поля в местах локализации опытных и контрольных образцов, находившихся на расстоянии 2.5 м друг от друга, отличались не более чем на 1 мкТл. Величину постоянного магнитного поля Земли измеряли с помощью феррозондового магнитометра типа СГС–64М (завод «Геологоразведка»), обеспечивающего возможность измерения величины индукции магнитного поля в использовавшемся нами диапазоне с точностью не меньше ± 0.1 мкТл. Амплитуду переменной компоненты поля устанавливали с точностью $\pm 3\%$ с учетом передаточного коэффициента катушки Гельмгольца.

Опытные отрезки экспонировали в КМП, настроенных на резонанс для ионов кальция, магния и калия:

Ca^{2+} - КМП: $B_{DC} = 46.5 \pm 0.1$ мкТл, $B_{AC} = 85.6 \pm 0.1$ мкТл, $f_{AC} = 35.6 \pm 0.1$ Гц

Mg^{2+} - КМП: $B_{DC} = 46.5 \pm 0.1$ мкТл, $B_{AC} = 85.6 \pm 0.1$ мкТл, $f_{AC} = 58.7 \pm 0.1$ Гц

K^{+} - КМП: $B_{DC} = 46.5 \pm 0.1$ мкТл, $B_{AC} = 85.6 \pm 0.1$ мкТл, $f_{AC} = 54.7 \pm 0.1$ Гц – третья гармоника основной (или «циклотронной» [1]) частоты.

Заметим, что при использовании Ca^{2+} - КМП и Mg^{2+} - КМП переменную компоненту поля настраивали на основные или «циклотронные» частоты для ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} согласно выражению (1). Однако при использовании K^{+} - КМП, частота переменной компоненты была выбрана равной третьей гармонике основной частоты, т.е. 3×18.25 Гц. Биологическая эффективность некоторых высших гармоник основных частот для ионов Ca^{2+} и K^{+} была показана эмпирически [15], а также объяснена на основании теоретических соображений [16]. Использование 3 – ей гармоники основной частоты позволяет избежать наложения эффектов разного знака, возникающих из-за близости величин основной частоты для K^{+} - КМП (18.25 Гц) и второй субгармоники (17.8 Гц) основной частоты для Ca^{2+} - КМП при значении $B_{DC} = 46.5$ мкТл [7].

Результаты и обсуждение.

При отработке методической части данной работы мы показали, что этиолированные (выращенные в темноте) отрезки надземных органов проростков проса, льна и клевера дают хорошо выраженную гравитропическую реакцию при изменении их ориентации с вертикальной на горизонтальную. Насколько нам известно, ранее эти растения не использовались в исследованиях по изучению гравитропизма. Следует отметить простоту процедуры приготовления проростков

проса и льна, не требующей сложных культуральных сред, а также специальной световой обработки. Подготовка образцов из дикорастущего клевера является еще более простой процедурой, но очевидным недостатком при использовании клевера является сезонный характер работы.

Результаты наших экспериментов свидетельствуют о возможности значительной активации и ингибирования скорости гравитропической реакции отрезков надземных органов растений при их экспонировании в КМП различных типов.

Ca^{2+} - КМП. Экспонирование отрезков проса, льна и клевера в Ca^{2+} - КМП сопровождается стимуляцией гравитропической реакции, что проявляется в статистически достоверном увеличении (на несколько десятков процентов) среднего угла изгиба по сравнению с таковым в контрольных отрезках, находившихся в локальном магнитном поле Земли. На рис. 1а приведены данные отдельных (репрезентативных) экспериментов для данного типа растения. Всего с использованием отрезков проса, клевера и льна было выполнено не менее 5 опытов, различавшихся по условиям проведения эксперимента: температура в разные дни опытов изменялась от 15 до 25 °С, время проращивания семян варьировало от 3 до 5 дней, продолжительность гравитропической реакции образцов растений – от 2 до 3 часов. Во всех экспериментах наблюдалось статистически достоверное увеличение угла гравитропического изгиба отрезков.

K^{+} - КМП. Экспонирование отрезков проса, льна и клевера в K^{+} - КМП приводит к статистически достоверному уменьшению среднего угла гравитропического изгиба отрезков. На рис. 1б приведены данные отдельных опытов для каждого типа растения. Всего с использованием отрезков каждого типа - проса, клевера и льна было выполнено не менее 4 опытов при различных

условиях. Во всех опытах наблюдалось достоверное уменьшение среднего угла гравитропического изгиба в «опыте» на несколько десятков процентов.

Противоположный знак эффектов Ca^{2+} - КМП и K^{+} - КМП на развитие гравитропической реакции в отрезках проростков проса, льна и клевера можно объяснить исходя из следующих соображений. Известно, что K^{+} имеет относительно малое сродство (10^2 – 10^3 M^{-1}) к Ca^{2+} - связывающим центрам белков [17]. Однако, поскольку внутриклеточная концентрация K^{+} весьма велика (~150 мМ), то он способен конкурировать с Ca^{2+} за специфические центры связывания Ca^{2+} в кальмодулине (см., например [18]). Вместе с тем, замещая Ca^{2+} в центрах связывания кальмодулина, K^{+} не способен активировать ферментативную активность соответствующей кальмодулин – зависимой киназы. Если предположить, что экспонирование Ca^{2+} - зависимой киназы в КМП любого типа сопровождается снижением сродства ионов к Ca^{2+} - связывающим центрам, то в этом случае K^{+} - КМП и Ca^{2+} - КМП будут соответственно ингибировать и активировать гипотетическую Ca^{2+} - кальмодулин –зависимую киназу.

Mg^{2+} - КМП. Мы не обнаружили статистически достоверного эффекта Mg^{2+} - КМП на гравитропический изгиб отрезков проса и льна по результатам 3 опытов с каждым типом отрезков (данные не приводятся, отрезки клевера в опытах с Mg^{2+} - КМП не использовали). Известно, что Mg^{2+} не способен связываться с Ca^{2+} - связывающими центрами в кальмодулине [19], в то время как активность протеинкиназы С зависит от специфического связывания с ней как ионов кальция, так и ионов магния [20]. Поэтому, отсутствие влияния Mg^{2+} - КМП на гравитропическую реакцию, можно рассматривать как косвенное свидетельство в пользу предположения о том, что воздействие КМП на гравитропизм надземных

органов растений опосредуется Ca^{2+} - кальмодулин - зависимой киназой, а не протеинкиназой С.

Механизм восприятия гравитации надземными органами растений и эффекты магнитных полей.

Как мы отмечали во «Введении», данное исследование было предпринято исходя из предположения о том, что КМП – индуцированное изменение скорости ферментативной активности Ca^{2+} - кальмодулин-зависимых киназ может привести, в конечном счете, к модуляции гравитропического изгиба осевых органов растений. Полученные нами экспериментальные данные с использованием Ca^{2+} - КМП, K^{+} - КМП и Mg^{2+} -КМП хорошо коррелируют с этим предположением. Однако необходимо пояснить – каким образом эффекты магнитного поля могут обусловить изменение гравитропического ответа растений в рамках современных представлений о механизме восприятия гравитропической реакции в растениях.

Согласно этим представлениям, гравитропизм как в надземных, так и в подземных органах высших растений обусловлен полярностью внутренней структуры сенсорных клеток, выполняющих роль статоцитов [21, 22]. Степень активации статоцитов зависит от их пространственной ориентации относительно вектора силы тяжести [21, 23-29]. Поскольку в надземных органах растений расположение статоцитов характеризуется радиальной симметрией относительно продольной оси растений, то в вертикально ориентированных стеблях растений имеет место одинаковая степень активации статоцитов. Однако, при отклонении ориентации отрезков от вертикального направления – степень активации каждого статоцита будет определяться его ориентацией относительно вектора силы тяжести. Поворот отрезков надземных осевых органов растений из вертикального

положения в горизонтальное сопровождается седиментацией крахмальных зерен (статолитов) в статоцитах по направлению вектора силы тяжести. При этом, в силу полярного расположения эндоплазматического ретикулула в статоцитах, происходит активация или ингибирование выхода ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулула в клетках, находящихся, соответственно, в верхней и нижней частях отрезка. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в «верхних» статоцитах сопровождается активацией кальмодулин - зависимой киназы, увеличением степени фосфорилирования H^+ -помп и, соответственно, ингибированием их активности. Напротив, в «нижних» статоцитах имеет место снижение ферментативной активности Ca^{2+} - кальмодулин - зависимой киназы, снижение степени фосфорилирования H^+ -помп и, соответственно, увеличение их активности, сопровождающееся закислением внеклеточной среды. Считается, что преимущественное закисление нижней части отрезков способствует, в конечном счете, их более быстрому росту [25, 29]. При этом, скорость роста верхних частей ткани растения снижается или остается неизменной [26, 27]. Такой дифференциальный рост верхних и нижних участков горизонтально расположенных осевых надземных органов растений или их сегментов приводит к гравитропическому изгибу отрезков и восстановлению их роста против направления вектора силы тяжести (отрицательный гравитропизм).

Очевидно, что изменение скорости гравитропической реакции отрезков растений в результате их экспонирования в магнитном поле может иметь место только в том случае, если величина эффекта магнитного поля на функционально – метаболическую активность «верхних» и «нижних» статоцитов будет различной. Естественно предположить, что такое дифференцированное воздействие магнитного поля может быть обусловлено разной степенью активации

статоцитов. Как известно, воздействие Ca^{2+} - КМП на активность Ca^{2+} - кальмодулин - зависимой киназы существенно зависит от концентрации свободного Ca^{2+} в биосистеме: при крайне малых и при насыщающих концентрациях Ca^{2+} , КМП не влияет на скорость ферментативной активности киназы [11, 30]. Поэтому, можно предположить, что Ca^{2+} - КМП не оказывает влияния на активность киназы в «верхних» статоцитах, в которых, концентрация Ca^{2+} близка к насыщающей. Одновременно, это же поле вызывает дополнительное ингибирование киназной активности и, соответственно, дополнительную активацию H^+ -помп и закисление внеклеточной среды в «нижних» статоцитах, имеющих пониженную внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} .

Представленные в данной работе результаты экспериментальных исследований, свидетельствуют о возможности существенной активации и ингибирования скорости гравитропической реакции в отрезках надземных осевых органов растений при их экспонировании, соответственно, в Ca^{2+} - КМП и K^+ - КМП. Полученные данные коррелируют с представлением о том, что первичными мишенями воздействия КМП в режиме параметрического резонанса на клетки эукариот, как животного, так и растительного происхождения, являются Ca^{2+} - зависимые киназные реакции [6, 7]. Можно ожидать, что магнитные поля, применявшиеся в данной работе для модуляции гравитропизма, будут воздействовать и на другие физиологические процессы в растениях.

Авторы выражают благодарность доктору Р. Олендорфу Офтальмологический институт Иллинойской долины, г. Оттава, США (Illinois Valley Eye Institute, Ottawa, IL, USA) за помощь в постановке данной работы и участие в обсуждении результатов.

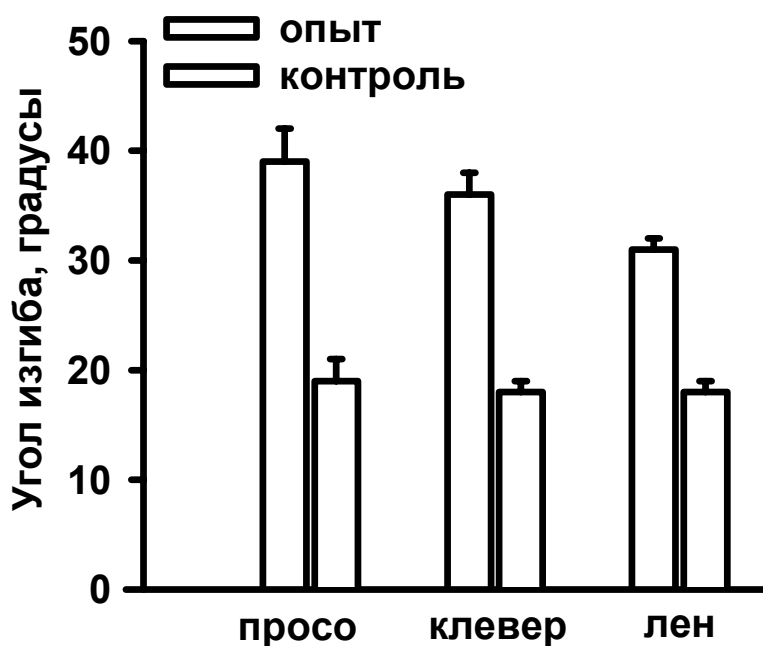


Рис.1. Влияние Ca^{2+} - КМП на гравитропическую реакцию отрезков стеблей проса, клевера и льна.

Приведены данные отдельных экспериментов для каждого типа растения. В каждом эксперименте использовали по 40 отрезков стеблей как в опыте, так и в контроле.

Параметры Ca^{2+} -КМП: $V_{DC} = 46.5 \pm 0.1$ мкТл, $V_{AC} = 85.6 \pm 0.1$ мкТл, $f_{AC} = 35.6 \pm 0.1$ Гц

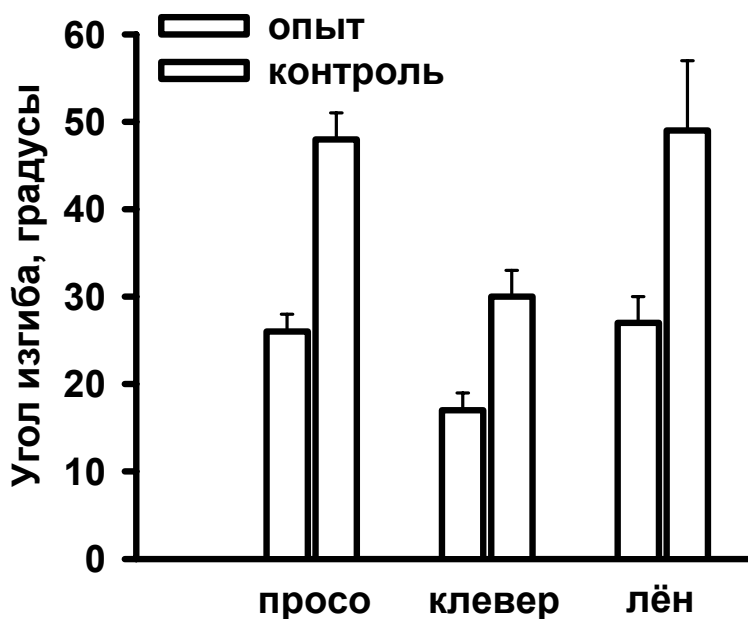


Рис.2. Влияние K^+ -КМП на гравитропическую реакцию отрезков стеблей проса, клевера и льна.

Приведены данные отдельных экспериментов для каждого типа растения. В каждом эксперименте использовали по 40 отрезков стеблей как в опыте, так и в контроле.

Параметры K^+ -КМП: $V_{DC} = 46.5 \pm 0.1$ мкТл, $V_{AC} = 85.6 \pm 0.1$ мкТл,

$f_{AC} = 54.7 \pm 0.1$ Гц

Литература.

1. Liboff A.R. // Interaction Mechanism of Low – Level Electromagnetic Fields and Living Systems. / Eds. B. Norden, C. Ramel. Oxford: Oxford University Press. 1992. P. 130-147.
2. Prato F.S., Carson J.J.L., Ossenkopp K.-P., Kavaliers M. // FASEB J. 1995. V. 9. P. 807-814.
3. Леднев В.В., Сребницкая Л.К., Ильясова Е.Н., Рождественская З.Е., Климов А.А., Белова Н.А., Тирас Х.П. // Биофизика 1996. Т. 41, вып. 4 С. 815-825.
4. **Blackman C.F., Blanchard J.P., Benane S.G., House D.H. // Bioelectromagnetics. 1994. V. 15. P. 239-260.**
5. Blackman C.F., Blanchard J.P., Benane S.G., House D.H. // FASEB J. 1995. V. 9. P. 547-551.
6. Lednev V.V. // Bioelectromagnetic. 1991. V. 12. P. 71-75.
7. Леднев В.В. // Биофизика. 1996. Т. 41, вып. 1. С. 224-232.
8. Bush D.S. // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1995. V. 46. P. 95-122.
9. Sinclair W., Trewavas A.J. // Planta. 1997. V. 203, № 5. S85 – S90.
10. Snedden W.A., Fromm H. // Trends in Plant Science. 1998. V. 3, № 8. P. 299-304.
11. Satterlee J.S., Sussman M.R. // J. Membrane Biol. 1998. V. 164, № 3. P. 205-213.
12. Harper J.F., Sussman M.R., Schaller G.E., Putnam – Evans C., Charbonneau H., Harmon A.C. // Science. 1991. V. 252. P. 951-954.
13. **Шувалова Л.А., Островская М.В., Сосунов Е.А., Леднев В.В. // ДАН СССР. 1991. Т. 317. С. 227-230.**
14. Markov M.S., Pilla A.A. // Bioelectrochem. Bioenerg. 1997. V. 43. P. 233-238.
15. McLeod B.R., Smith S.D., Liboff A.R. // J. Bioelectricity. 1987. V. 6 P. 153-168.
16. Леднев В.В. // Препринт. Пушино: Институт биологической физики. 1989.

17. Пермяков Е.А. Парвальбумин и родственные кальцийсвязывающие белки. М.: Наука, 1985. 192 с.
18. Haiech J., Klee C.B., Demaille J.G. // *Biochemistry*. 1981. V. 20, № 13. P. 3890-3897.
19. Cox J.A. // *Biochem. J.* 1988. V. 249. P. 621-629.
20. Lester D.S., Blumfeld V. // *Biophys. Chem.* 1991. V. 39. P. 215.
21. Volkman D., Sievers A. (1979) // *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Physiology of Movements.* / Eds N. Haupt, M.E. Feinleib, Berlin: Springer. 1979. V. 7. P. 573-600.
22. Sack F.D. // *Planta* 1997. V. 203. S63 – S68.
23. Firm R.D., Digby J. // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1980. V. 31. P. 131-148.
24. Tasaka M., Kato T., Fukaki H. // *Trends in Plant Science*. 1999. V. 4, № 3. P. 103-107.
25. Cosgrove D.J. // *Planta*. 1997. V. 203, № 5. S130 – S135.
26. Fukaki H., Fujisawa H., Tasaka M. // *Plant Physiol.* 1996. V. 110. P. 933-943.
27. Weisenseel M.H., Meyer A.J. // *Planta*. 1997. V. 203. S98 – S106.
28. Digby J., Firm R.D. // *Plant, Cell and Environment*. 1979. V. 2. P. 145-148.
29. Digby J., Firm R.D. // *Plant, Cell and Environment*. 1979. V. 2. P. 149-154.