فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال هفتم، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۴

# تاثیرامواج فروصوت بررشد سلول‌های جداکشت توتون (*Nicotianatabacum* L. cv. barley 21)

**طراوت فرهنگی[۱]، فائزه قناتی[۱]*، اباذر حاج نوروزی[۲]**

[۱] گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[۲] گروه فیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: ghangia@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۲۰

**چکیده**

امواج مکانیکی فرو صوت که دارای فرکانس ۰-۲۰ هرتز می باشند توسط مولدهای طبیعی ومصنوعی فراوانی ایجاد می‌شوند. تاثیر امواج فروصوت بر سلول‌های جانوری و انسان گزارش شده است. با وجود اینکه گیاهان نیز همچون جانوران به تحریکات مکانیکی حساس هستند و رشد و نمو آنها در پاسخ به سیگنال‌های مکانیکی دستخوش تغییراتی می شود اما تاکنون تاثیر امواج فروصوت برسلول‌های گیاهی بررسی نشده است. هدف مقاله حاضر بررسی تاثیر امواج فروصوت بر تغییرات غشا، وزن‌تر، وزن خشک و وزن دیواره سلول‌های جدا کشت توتون *Nicotianatabacum* می‌باشد.

**کلیدواژه‌ها**: امواج فروصوت، توتون، سیگنالینگ کلسیم، لیگنین

## مقدمه

ازدیاد منابع فشارهای مکانیکی در دنیای امروزی زمینه تحقیق و بررسی اثرات آنها را بر فرآیندهای فیزیولوژیکی موجودات زنده فراهم می‌سازد. جانوران وگیاهان به واسطه حضور کانال‌ها و گیرندهایی در سطح سلول‌های خود قادر به درک و انتقال پیام‌های مکانیکی بوده و متناسب با شدت آن تغییراتی را در فرآیندهای زیستی خود بوجود می‌آورند [4]. رعد و برق، زلزله، بادوطوفان،پرواز پرندگانتوربین‌های بادی، کمپرسورها، قطارها، هواپیما و ادوات جنگی منابع مولد طبیعی و صنعتی امواجی هستند که در محدوده امواج با فرکانس ۰-۲۰ هرتز قرار گرفته و فرو صوت نامیده می‌شوند. بدلیل تولید بالقوه امواج فروصوت در بافت‌های جانوری، قرار گرفتن طولانی مدت در معرض این امواج مکانیکی منجر به تغییرات زیستی خواهد شد. تحقیقات نشان داده است که امواج فروصوت در سلول‌های جانوری موجب القاء کانال‌های حساس به تحریکات مکانیکی شده و میزان کلسیم درون سلولی بالا رفته که موجب فعالیت‌های علامت‌رسانی در سلول خواهد شد [1,3,9] محرک‌های مکانیکی در گیاهان با افزایش یون کلسیم موجب بیان ژن‌های دفاعی شده که سنتز متابولیت‌های

ثانویه از جمله لیگنین‌ها را در پی دارد [8] با توجه به این که تاثیر امواج مکانیکی در مدل‌های انسان و جانوری بیشتر بررسی شده است، در این تحقیق تلاش شده است که تاثیر آن را بر میزان وزن تر و میزان رشد در گیاه توتون (*Nicotianatabacum*) که گیاهی دولپه‌ای و علفی واز خانواده بادنجانیان (*Solanacoae*) می‌باشد، بررسی شود.

## مواد و روش‌ها

### کشت سلولی و تیمار سلول‌ها با امواج فرو صوت

از لاین سلولی موجود در محیط تغییر یافته LS، کشت‌های تعلیقی بنیان گذاری و در دمای $25 \pm 2^0C$ سانتی‌گراد در تاریکی و بر روی شیکر با ۱۲۳ دور در دقیقه نگهداری شد. واکشت‌های متعدد جهت همگن‌سازی انجام شدو منحنی رشد سلول‌ها رسم گردید. سلول‌ها در ابتدای فاز لگاریتمی، برای مدت ۰-۱۵-۳۰-۴۵-۷۵ دقیقه در معرض امواج فروصوت بافرکانس ثابت ۱۵ هرتز قرار گرفتند.

### اندازه‌گیری رشد ووزن دیواره سلولی

از وزن‌تر و خشک به عنوان معیاری برای تعیین رشد سلول‌ها استفاده شد. بدین منظور سلول‌ها در فاز لگاریتمی تیمار شده و۳ روز پس از تیمار مورد سنجش قرار گرفتند. سلول‌ها برای سنجش وزن تر روی قیف بوخنر واجد کاغذ صافی و نایلون مش (۴۲μM) و با استفاده از فشار منفی (پمپ خلاء) صاف شده و سپس وزن شدند. برای تعیین وزن خشک، سلول‌ها زیر هود خشک شدند و دوباره وزن شدند. برای سنجش وزن دیواره مقدار ۵ گرم سلول توتون در آب مقطر سائیده وسپس به مدت ۳۰ دقیقه بادور ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل دو بار وهر بار به مدت یک ساعت با اتانل مطلق شستشو داده شدند و پس از هربار شستشو توسط پمپ خلاء ر وی قیف بوخنر، کاغذ صافی و نایلون مش صاف شدند. رسوب حاصل یک شب در محلول دو برابر حجم کلروفرم متانل قرار گرفت (۲:۱) و پس از صاف کردن، رسوب با استون دو برابر حجم شسته و خشک و وزن شدند.

### اندازه‌گیری هدایت الکتریکی (Electrical Conductivity; EC):

سلول‌های تیمار شده را پس از ۲۴ ساعت روی قیف بوخنر با آب دیونیزه شستشو داده و سپس ۲۰۰ میلی‌گرم ازسلول‌ها را با ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت. هدایت الکتریکی محلول به وسیله دستگاه (Electrical Conductivity Meter) در دمای ۲۵درحه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب ۱۰۰درجه سانتی‌گراد قرلر داده شد و پس از سرد شدن دوباره EC آن‌ها قرائت شد. نشت الکتریکی غشای سلول‌ها از تقسیم EC اولیه بهEC ثانویه بدست آمده وبه درصد گزارش شد [8].

### سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا (LPO):

۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه در ۳ میلی‌لیتر محلول ۱۰٪ (حجم/وزن) تری کلرو استیک اسید (TCA) عصاره‌گیری شد. نمون‌ها در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. به یک میلی‌لیتر ازمحلول رو شناور یک میلی‌لیتر تیوبربیتوریک اسید (TBA) افزوده وبه مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب ۱۰۰درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد سدن لوله‌ها در یخ جذب آن‌ها در طول موج‌های ۵۳۲nm و۶۰۰ nm با

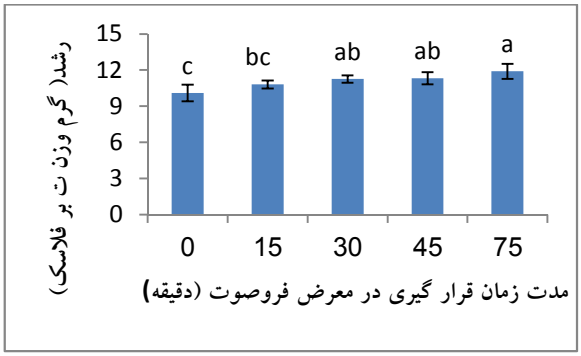
اسپکتروفتومتر خوانده شد میزان MDA با استفاده از ضریب ثابت $\epsilon = 155\ mM^{-1}cm^{-1}$ محاسبه گردید.

## تجزیه و تحلیل آماری

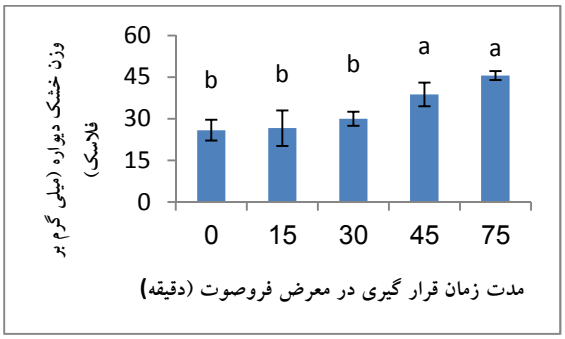
کلیه آزمایشات با سه تکرار از حداقل سه نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و آزمون دانکن جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p\leq$ ۰/۰۵ انجام شد.

## نتایج

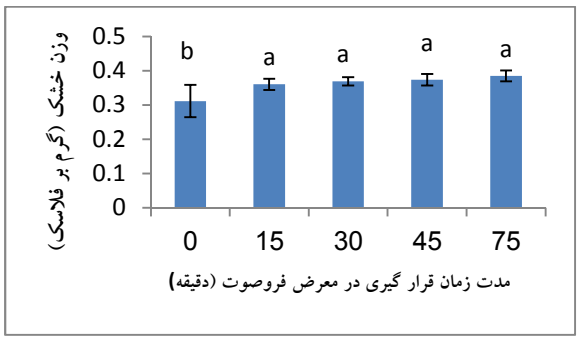
وزن‌تر و خشک سلولهای توتون تیمار شده با امواج فروصوت به مدت‌های ۳۰، ٤٥ و ۷۵ دقیقه نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت (شکل‌های ۱ و ۲). وزن دیواره در تیمارهای ٤٥ و۷۵ دقیقه در سلول‌های جدا کشت توتون نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۳). اما میزان نشت الکترولیت‌ها از غشای سلول‌ها و نیز میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در سلول‌های جدا کشت توتون تحت تاثیر تیمار با اموج فرو صوت تغییر معنی‌داری با سلول‌های گروه شاهد نشان نداد (شکل‌های ٤ و٥).



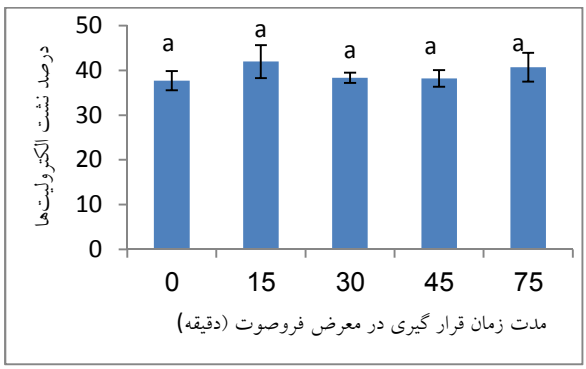

**شکل۱- تاثیر امواج فروصوت بر رشدسلول‌های جداکشت توتون**



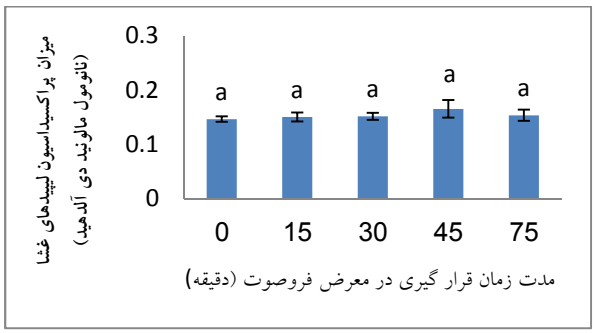

**شکل۲- تاثیر امواج فروصوت بر وزن خشک سلول‌های جداکشت توتون**




**شکل ۳- تاثیر امواج فروصوت بر وزن دیواره سلول‌های جداکشت توتون**




**شکل٤- تاثیر امواج فروصوت بر نشت الکتریکی غشای سلول‌های جداکشت توتون**




**شکل٥- تاثیر امواج فروصوتبر پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی سلول‌های جداکشت توتون**

## بحث

قابلیت درک و پاسخ به محرک‌های مکانیکی در تمام موجودات زنده از اهمیت زیادی برخوردار است [10]. به دنبال درک محرک‌های مکانیکی در سلول تغییراتی پدیدار می‌شود که از جمله می‌توان به تغییر پتانسیل غشا، تولید گونه‌های اکسیژن فعال که در پی افزایش کلسیم درون سلولی اتفاق می‌افتند اشاره کرد. کانال‌های کششی غشای سلولی پس از درک پیام مکانیکی به طور خودکار باز شده ویون کلسیم به درون سرازیر می‌شود. بالارفتن غلظت کلسیم درون سلولی پیامی برای اتفاقات پایین دست محسوب می‌شود و به دنبال آن تغییراتی در سلول بوجود می‌آید. افزایش رونویسی ژن کلمودلین و سنتز آن و اتصال آن به کلسیم موجب فعال شدن فاکتورهای رونویسی شده که آغازگر نسخه‌برداری از ژن های پاسخ به رشد و پاسخ به تنش می‌باشد. اتصال کلسیم – کلمودلین به NADPH اکسیداز غشایی و فعال شدن آن تولید گونه‌های فعال اکسیژن را در پی دارد. بنابراین pH در داخل وخارج سلول تغییر کرده وموجب فعال شدن اکسپانسین‌ها شده که موجب رشد می‌شوند [5,7] گرچه در تحقیق حاضر امکان سنجش میزان کشش پذیری عشا میسر نبود اما شواهد حاضر این مکانیسم را تقویت می‌کند. در پی جریان سیگنالینگ کلسیمی عملکردهای تدافعی در سلول‌ها اتفاق می‌افتد که یکی از آنها رسوب لیگنین در دیواره بوده و موجب استحکام آن می‌شود. پیام دهی کلسیم موجب فعال شدن فاکتورهای رونویسی از ژن‌هایی می‌شود که مسیرهای دفاعی گیاه را تقویت می‌کند و موجب سنتز لیگنین می‌شود [2,6] حاصل تحقیق حاضر نیز نشان داد که استفاده از امواج فروصوت در سلول‌های جدا کشت توتون (*Nicotianatabacum* L. cv. barley 21) از یک سو میزان رشد سلول‌ها را افزایش داد وسبب افزایش زیتوده شد و از سوی دیگر همزمان با حفظ تمامیت غشای سلولی شده است با افزایش وزن دیواره و احتمالا محتوای لیگنین آن موجب استحکام بخشیدن به سلول گردید.

## منابع


[1] Alves-Pereira M., and N.A.A. Castelo Branco (2007) Vibroacoustic disease: Biological effects of infrasound and low-frequency noise explained by mechanotransduction cellular signalling. Progress in Biophysics and molecular Biology, 93: 256-279.

[2] Castaneda P and Perez LM (1996). Calcium ions promote the response of citrus lemon against fungal elicitors or wounding. Phytochem. 42:595 - 8.

[3] Cheng H., B. Wang, C. Tang, G. Feng, C. Zhang, L. Li, T. Lin, D. Fang, H. Duan, M. Shi, and G. Zhao (2012) Infrasound noise induces axonal degenaration of cultured neurons via $Ca^{2+}$ influx pathway. Toxicology Letters, 212: 190-197.

[4] Coutand, C. (2010) Mechano- sensing and tigmo-morphogenesis, a physiological and bio-mechanical point of view. Plant Science, 179: 168-182

[5] Gabriele B., T.Monshausen, N. Bibikova, H. Manfred, and G. Simon. (2009). Ca2+ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in arabidopsis Roots. The Plant Cell, 21: 2341–2356.

[6] Iiyama K. and Wallis A.F.A. (1990). Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure, J. Sci. Food Agric. 51: 145-161.

[7] Kurusu T., K. Kuchitsu, M. Nakano, Y. Nakayama, andH. Lida (2013). Plant

mechano-sensing and $Ca^{2+}$transport. Trends in Plant Science, 8: 227-233.

[8] Payez, A., F. Ghanati, M. Behmanesh, P. Abdolmaleki, A. Hajnorouzi, and E. Rajabbeigi (2012) Increase of seed germination, growth and membrane integrity of wheat seedlings by exposure to static and electromagnetic fields. Electromagnetic Biology and Medicine, 32 (4):417-429.

[9] Sahebjamei, H., P. Abdolmaleki, and F. Ghanati (2007). Effects of static magnetic field on the antioxidant enzymes activities of suspensioncultured tobacco cells. Bioelectromagnetics, 28:42-47.

[10] Telewski F. W., (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants. AmericanJournal of Botany, 93: 1466–1476.