تأثیر امواج فراصوت بر زنده‌مانی سلول‌های توتون

لیلا کوهی، ناصر زارع*، امین امانی و پریسا شیخ‌زاده مصدق

اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۷

چکیده

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) از چندین دهه گذشته به‌عنوان یک گیاه مدل برای کشت بافت و مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش، اثر امواج فراصوت بر زنده‌مانی و شکست سلول‌های توتون مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین‌منظور، ریزنمونه‌های برگ گیاه توتون در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین کشت داده شد، تا کالوس تولید کنند. کشت سوسپانسیون سلولی از طریق انتقال کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ به محیط کشت مایع ایجاد شد. سپس سوسپانسیون سلولی در معرض امواج فراصوت در دما و زمان‌های مختلف قرار گرفته و درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و تغییرات ساختار و فراساختاری سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد با افزایش مدت زمان تیمار با امواج فراصوت و همچنین دمای اعمال تیمار، درصد زنده‌مانی سلول‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت. بیشترین سطح زنده‌مانی سلول‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و دو دقیقه امواج فراصوت (۷۶/۷۰۲ درصد) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زمان دو دقیقه امواج فراصوت (۷۵/۶۷ درصد) بوده است. بیشترین شکست سلولی به‌ترتیب مربوط به دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۴ دقیقه امواج فراصوت (۱۸/۷۳۳ درصد) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۲۰ دقیقه اعمال امواج فراصوت (۱۷/۴۸ درصد) بود. میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) ایجاد حفرات با اندازه مختلف در دیواره سلول را بر اثر اعمال امواج فراصوت نشان داد.

واژه‌های کلیدی: اولتراسوند، کشت سوسپانسیون، میکروسکوپ الکترونی، *Nicotiana tabacum* L.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۵-۳۳۵۱۰۱۴۰ ، پست الکترونیکی : zarenasser@yahoo.com

مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) یکی از محصولات با ارزش کشاورزی و صنعتی است، که در شرایط مختلف آب و هوایی در بیش از صد کشور دنیا کشت شده و در اقتصاد بعضی از آنها اهمیت بسزایی دارد (۳۴). سطح زیر کشت توتون در دنیا ۴/۷۷ میلیون هکتار، تولید سالانه ۷/۱ میلیون تن (وزن تر) و عملکرد آن در کشورهای در حال توسعه ۱/۶ تن در هکتار و در کشورهای توسعه یافته ۲/۲ تن در هکتار است (۲۵). بیش از چند دهه است که از این گیاه به عنوان یک سیستم مدل برای کشت بافت و مهندسی ژنتیک استفاده می‌شود. دلایل استفاده از این گیاه به عنوان یک سیستم مدل به دلیل رشد سریع، خودگشن بودن، تولید بذر فراوان و عدم نیاز به هزینه و تیمارهای خاص برای رشد است. همچنین در سال‌های اخیر از این گیاه برای بررسی انتقال ژن‌ها و مطالعه عوامل مؤثر در انتقال ژن استفاده شده است (۱ و ۵). این گیاه به دلیل تولید بیوماس بالا کاربردهای بیشتری در زمینه تولید مواد با ارزش مختلف با استفاده از انتقال ژن به گیاه دارد (۸).

امواج فراصوت دسته‌ای از موج‌های مکانیکی هستند که بسامد آن بیش از ۲۰ هزار هرتز است. در این تقسیم‌بندی، بسامد امواج صوتی بین ۲۰ تا ۲۰ هزار هرتز بوده و امواجی که بسامد آنها کمتر از ۲۰ هرتز باشد، امواج فروصوت نامیده می‌شوند (۲۹). امروزه امواج فراصوت در زمینه‌های

مختلف ازجمله پزشکی، صنعتی، شیمی، بیولوژی، کشاورزی و غیره دارای کاربردهای فراوانی می‌باشند.

امواج فراصوت با شدت زیاد برای ترکیبات زیستی مخرب بوده، غشای سلول‌ها را تخریب کرده و مولکول‌های زیستی مانند آنزیم‌ها و DNA را غیرفعال می‌سازد (۱۱). بررسی-هایی در زمینه استفاده از امواج فراصوت در غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها گزارش شده‌اند (۲۲ و ۲۶). مکانیسم تخریبی این امواج روی آنزیم‌ها از طریق ایجاد کاویتاسیون (Cavitation) و انفجار حباب‌ها و تشکیل نقاط داغ میکروسکوپی با حرارت حدود ۵۰۰۰ درجه کلوین و فشار ۵۰۰ بار است. در این شرایط مولکول‌های آب سونولیز شده و رادیکال‌های آزاد تولید می‌شوند که خاصیت اکسید-کنندگی و واکنش‌دهندگی بسیار زیادی با ترکیبات مختلف ازجمله پروتئین‌ها و آنزیم‌ها را دارند (۱۲ و ۳۳). علاوه بر این، ارتعاش دیواره حباب‌ها و انفجار آنها در میدان کاویتاسیون نیز تنش برشی زیادی را در محیط اطراف ایجاد می‌کند که می‌تواند حتی پیوندهای کووالانسی را شکسته و مولکول‌های پلیمری ا جمله پروتئین‌ها و آنزیم‌ها را تخریب کند (۷ و ۱۳).

از طرف دیگر، نشان داده شده که امواج فراصوت با شدت و انرژی کم، طیفی از تأثیرات زیستی غیرکُشنده داشته که از اهمیت بالقوه‌ای در بیوتکنولوژی برخوردار است. یکی از گسترده‌ترین آثار غیرمخرب این امواج روی سلول‌های زنده، افزایش نفوذپذیری غشا است که جذب ترکیبات خارجی و دفع فراورده‌های درون سلولی توسط سلول‌ها را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، از امواج فراصوت به عنوان محرک واکنش‌های آنزیمی و به‌ویژه متابولیت‌های ثانویه، بیوسنتز در سلول‌ها و پروتوپلاست‌های گیاهی استفاده شده است (۱۶ و ۳۷). بیشتر محققان به روش ترانسفورماسیون با واسطه اگروباکتریوم و با کمک سونیکاسیون (SAAT) در سلول‌ها یا بافت‌های گیاهی تمرکز می‌کنند (۲۱). اخیرا روش‌های اولتراسونیک پتانسیل قابل ملاحظه‌ای را برای معرفی ماکرومولکول‌ها یا DNA به داخل سلول‌ها داشته‌اند (۳۸). اگر سونیکیشن برای تسهیل جذب به کار رود، مهم است که شرایط برای جذب بدون ایجاد آسیب به سلول‌ها بهینه‌سازی شود. ثابت شده است که تابش اولتراسوند ملایم و خفیف یک روش مؤثر برای ترانسفکشن در سلول‌ها و بافت‌های حیوانی در شرایط In vitro و In vivo می‌باشد (۴، ۱۴و ۲۳). لیو و همکاران (۲۰۰۵) ترانسفکشن سلول‌های HeLa-S3 را در شرایط In vitro با ۱۰، ۲۰ و ۳۰٪ در معرض اولتراسوند قرار دادند و دریافتند که بهینه کارایی ترانسفکشن (۰/۸ درصد) در حدود ۳/۸ ثانیه است که در معرض مؤثر اولتراسوند قرار می‌گیرد (۲۰).

استخراج به کمک امواج فراصوت یکی از مهمترین روش-های استحصال ترکیبات ارزشمند از منابع گیاهی است (۳۵) که در مقیاس بزرگ و کوچک (صنعتی و آزمایشگاه) قابل اجرا می‌باشد (۳۶). در مقایسه با سایر روش‌های استخراج ازجمله استخراج بر پایه مایکروویو، استفاده از امواج فراصوت ارزان‌تر بوده و کاربرد آنها ساده‌تر است (۶). بنابراین، این تحقیق به منظور مطالعه تأثیر امواج فراصوت بر دیواره سلولی و زنده‌مانی سلول‌های توتون انجام شد تا بتوان محدوده زمانی مناسب برای استفاده از آن در تقویت انتقال DNA به سلول و همچنین استخراج متابولیت‌های ثانویه از سلول‌های توتون را انتخاب کرد.

مواد و روشها

آماده‌سازی گیاهچه‌ها برای تهیه ریزنمونه: بذرهای رقم Comestock توتون پس از شستشو با آب مقطر، به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ غوطه‌ور شده و پس از آبکشی توسط آب مقطر استریل، به مدت ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱٪ ضدعفونی شدند. بذرها پس از سه بار آبکشی با آب مقطر استریل، توسط دستمال کاغذی استریل شده خشک و در ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS (۲۴) جامد کشت شدند. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای

۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با نور فلورسنت نگهداری شدند (۳).

تهیه و کشت ریزنمونه : به‌منظور تهیه کالوس، از جداکشت برگ گیاهان رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد که روی محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین در ظروف پتری کشت شدند. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر چهار هفته یکبار زیرکشت برده شدند.

تهیه سوسپانسیون سلولی و تیمار با امواج فراصوت : برای ایجاد کشت سوسپانسیون، کالوس‌های ترد و نرم به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین منتقل شده و روی شیکر با دور RPM ۱۳۰ و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی-گراد نگهداری شدند. پس از استقرار کشت سوسپانسیون، هر هفت روز یکبار به صورت ۱:۱ با محیط کشت MS حاوی ترکیبات هورمونی مذکور زیرکشت گردید. همزمان با تکان دادن کشت‌ها، به تدریج سلول‌های کالوس از هم تفکیک و در داخل محیط کشت رها شده و تکثیر شدند. با افزایش تراکم سلولی و در مرحله تصاعدی رشد، زیرکشت انجام شد. پس از زیرکشت‌های متوالی محیطی کاملاً رقیق به دست آمد که حاوی تک سلول‌ها و توده‌های چند سلولی کوچک گیاه توتون بود.

برای تیمار سلول‌ها از حمام فراصوت BANDELIN SONOREX DIGITEC با حداکثر خروجی ۳۵ هرتز استفاده شد. این دستگاه دارای فرکانس خودکار و زمان و دمای قابل تنظیم می‌باشد که تأثیر هریک از این دو متغیر بر درصد زنده‌مانی و شکست سلول مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش تأثیر عامل دما در چهار سطح ۲۵، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد و عامل مدت زمان تیمار با امواج فراصوت در چهار سطح ۲، ۸، ۱۴ و ۲۰ دقیقه بر تغییر ساختار دیواره سلولی و زنده‌مانی سلول‌های توتون مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور میزان دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی دارای غلظت یکسان سلولی برای هر نمونه استفاده شد و بعد از تیمار با اولتراسوند تغییر ساختار مورفولوژیکی، درصد زنده‌مانی و شکست سلول هریک از تیمارها مورد بررسی قرار گرفت (۳۱). همچنین زنده‌مانی سلول‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بدون اعمال امواج فراصوت نیز به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت.

درصد زنده‌مانی پس از رنگ‌آمیزی توسط شمارش سلول‌ها و یا روش اسپکتروفتومتری مشخص می‌شود. با توجه به اینکه در این گونه آزمایش‌ها، اسپکتروفتومتری به دلیل شکست سلول و خروج رنگ در اثر شستشو معیار دقیقی از زنده‌مانی سلول‌ها را نشان نمی‌دهد (۱۸)، برای بررسی زنده مانی سلولی از روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو استفاده شد. تریپان‌بلو ترکیب رنگی است که از غشای آسیب دیده سلول عبور کرده و سلول‌های مرده را رنگ آمیزی می‌کند (شکل ۲). به منظور آزمون زنده‌مانی، ابتدا محلول تریپان‌بلوی چهار درصد با حل کردن در بافر فسفات و عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر تهیه شد. آنگاه ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول تریپان‌بلو چهار درصد مخلوط شده و به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد (۳۱). سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی فوق بر روی صفحه مشبک لام هموسایتومتر قرار داده شد و سلول‌های زنده (به رنگ روشن) و مرده (آبی رنگ) و همچنین تعداد سلول-های دارای شکست‌های قابل مشاهده با میکروسکوپ نوری مورد شمارش قرار گرفت.

تهیه نمونه میکروسکوپ الکترونی نگاره به‌منظور مطالعه دیواره سلولی: ابتدا یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی توسط بافر فسفات مورد شستشو قرار گرفت، سپس طی مراحل زیر برای مشاهده توسط میکروسکوپ الکترونی آماده شد:

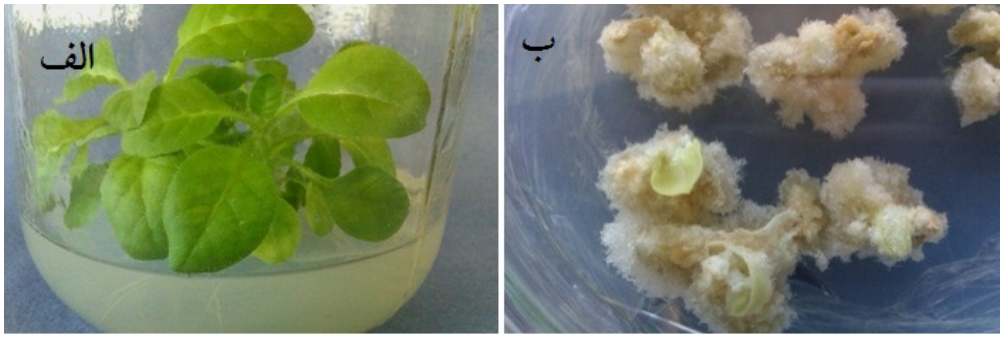
تثبیت سلول‌ها به طور شبانه توسط گلوتارآلدئید ۳ درصد

در دمای ۰ تا ۴ درجه انجام شد و بعد شستشوی سلول‌ها توسط بافر فسفات سه مرتبه و هر بار ۱۰ دقیقه طول کشید. تثبیت مجدد سلول‌ها توسط تتراکسید اسمیم ۲ درصد به مدت ۴ ساعت و شستشوی مجدد سلول‌ها توسط بافر فسفات سه مرتبه هر بار به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. آبگیری سلول‌ها به ترتیب توسط اتانول ۳۰ درصد، ۵۰ درصد، ۷۰ درصد، ۸۰ درصد، ۹۰ درصد، ۹۶ درصد، ۱۰۰ درصد و استون (دو مرتبه) هریک به مدت ۱۰ دقیقه و خشک کردن نقطه بحرانی نمونه، توسط فریزدراینگ انجام گردید.

تجزیه و تحلیل آماری : محاسبات آماری و تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای SPSS 16.0 و MSTATC انجام شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گردید.

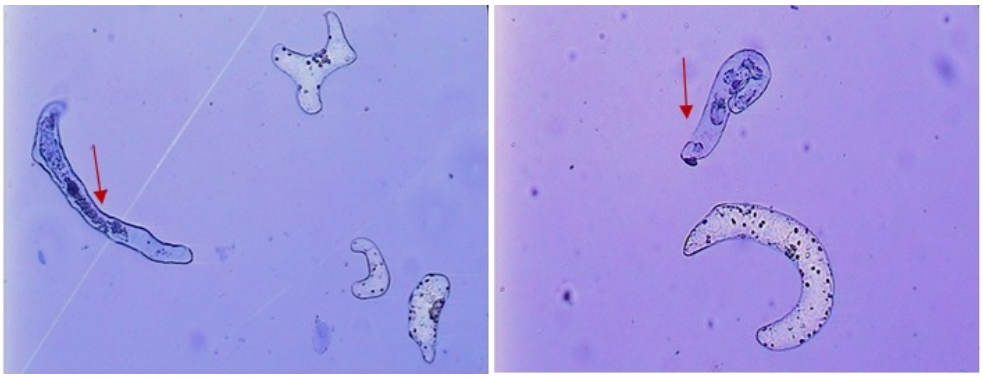
نتایج

جداکشت‌های برگ کشت شده در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D (۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و کینتین (یک میلی‌گرم بر لیتر) بعد از گذشت یک تا دو هفته متورم شده و شروع به تولید کالوس کردند (شکل ۱).



شکل ۱- کشت درون‌شیشه‌ای توتون: الف) گیاهچه حاصل از بذر کشت شده در محیط کشت پایه MS؛ ب) کالوس‌زایی جداکشت برگ روی محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین

تأثیر امواج فراصوت بر زنده‌مانی سلول‌ها: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر دما و مدت زمان تیمار با امواج فراصوت و اثر متقابل دما × زمان در سطح احتمال یک درصد بر زنده‌مانی سلول‌های توتون معنی‌دار بوده است (جدول ۱). زنده‌مانی سلول‌ها در دمای اتاق و بدون اعمال امواج فراصوت ۱۰۰ درصد بود. بیشترین سطح زنده‌مانی سلول‌ها در تیمار دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و دو دقیقه امواج فراصوت (۷۶/۷۰۲ درصد) و تیمار دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دو دقیقه امواج فراصوت (۷۵/۶۷ درصد) ثبت شد (شکل ۳).

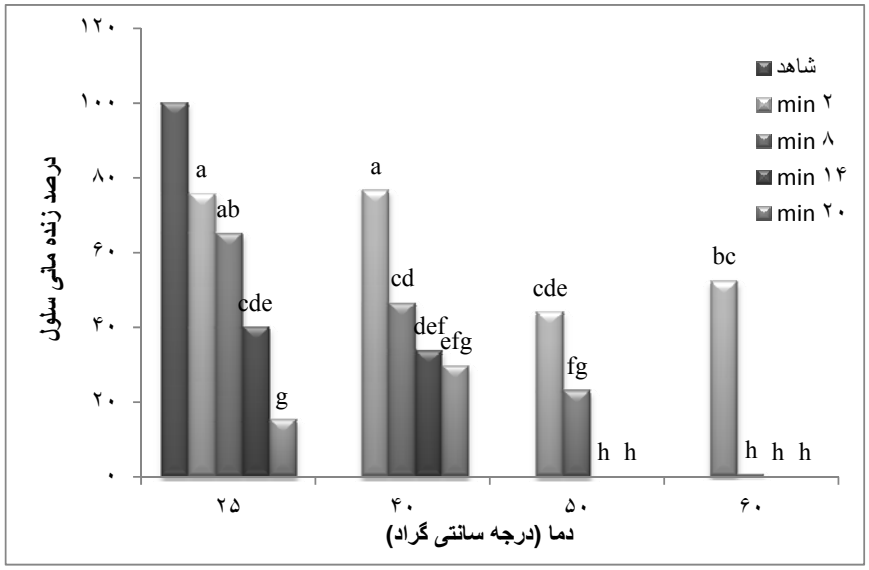


شکل ۲- نمایی از سلول‌های روشن (زنده) و آبی (مرده) توتون رنگ شده با تریپان‌بلو در زیر میکروسکوپ نوری (فلش‌ها نشان‌دهنده سلول‌های مرده می‌باشند)

جدول۱- تجزیه واریانس تأثیر امواج فراصوت بر درصد زنده‌مانی و درصد شکست سلول‌های سوسپانسیون سلولی توتون

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد زنده‌مانی سلولی	درصد شکست سلولی
دما	۳	۵۷۸۸/۵۰ **	۱۱۶/۱۵ **
زمان	۳	۸۱۵۹/۹۰ **	۲۵۵/۸۲ **
دما × زمان	۹	۳۶۴/۶۷ **	۶۰/۴۱ **
خطا	۴۸	۹۸/۸۱	۱۶/۹۸
درصد ضریب تغییرات		٪۳۱/۶۴	٪۶۰/۱۱

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۳- تأثیر دما و مدت زمان‌های مختلف تیمار با امواج فراصوت بر درصد زنده‌مانی سلول‌های کشت سوسپانسیون توتون

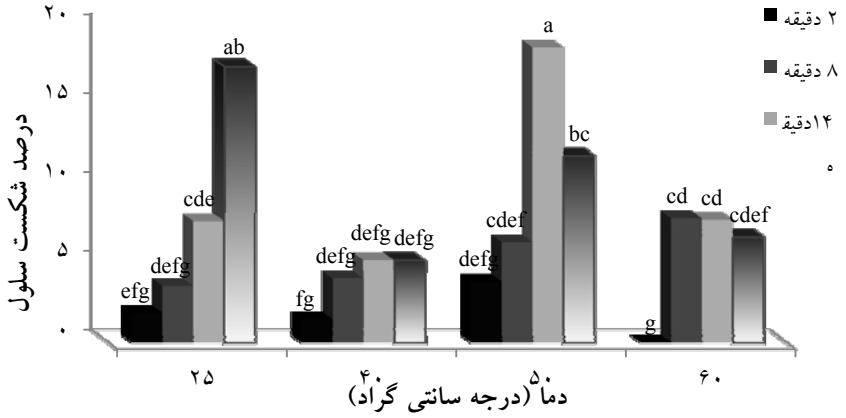
تأثیر امواج فراصوت بر شکست دیواره سلولی: تعیین درصد شکست سلول از طریق شمارش سلول‌های دارای دیواره سلولی شکسته شده به دلیل متلاشی شدن کامل برخی از سلول‌ها و پخش آنها در سوسپانسیون سلولی درصد دقیقی از سلول‌های شکسته شده را نشان نمی‌دهد. تغییرات مشاهده شده در ساختار سلول توسط میکروسکوپ نوری، بعد از تیمار سلول‌ها با امواج فراصوت در شکل ۴ آورده شده است. اندازه شکست‌های ایجاد شده در سلول‌ها متفاوت بود که این تغییرات بستگی به زمان اعمال امواج، اندازه سلول و غیره دارد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر دما و مدت زمان تیمار با امواج فراصوت و همچنین اثر متقابل دما × زمان بر شکست سلولی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین درصد شکست سلولی به ترتیب مربوط به تیمار در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۴ دقیقه امواج فراصوت (۱۸/۷۳۳ درصد) و دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد و ۲۰ دقیقه اعمال امواج فراصوت (۱۷/۴۸ درصد) بوده است.

با توجه به نمودار اثر متقابل مشاهده می‌شود که در دماهای ۲۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش زمان اعمال امواج فراصوت از ۲ دقیقه به ۲۰ دقیقه درصد شکست سلول‌ها

به طور معنی‌داری افزایش یافته است (شکل ۵) ولی در دماهای ۴۰ و ۶۰ چنین روندی مشاهده نشد.

شکل ۴- شکست‌های حاصل از امواج فراصوت در سلول‌های توتون



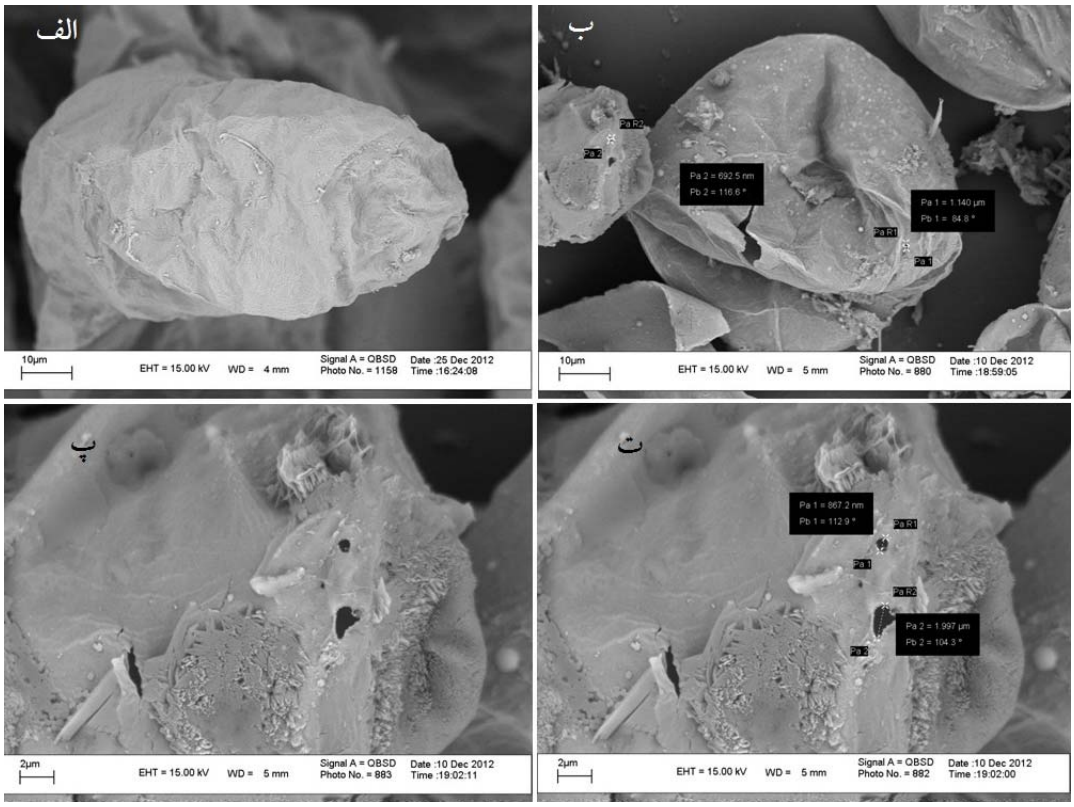
شکل ۵- میانگین درصد شکست سلول‌های کشت سوسپانسیون توتون در دماها و زمان‌های مختلف امواج فراصوت

نتایج میکروسکوپ الکترونی نشان داد که امواج فراصوت از توانایی ایجاد شکاف‌های ریز تا متلاشی کردن کامل سلول برخوردارند. همچنین نتایج میکروسکوپ الکترونی نشان داد که امواج فراصوت علاوه بر شکست در سلول از توانایی ایجاد حفرات ریز در دیواره سلول نیز برخوردار می‌باشد (شکل ۶). براساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره، اندازه حفرات ایجاد شده از ۸۵/۲ نانومتر تا ۵/۱۸۹ میکرومتر متغیر بود (شکل ۶).

بحث

در مورد تأثیر امواج فراصوت بر زنده‌مانی سلول‌ها با توجه به شکل ۳ مشاهده می‌شود که در دماهای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش مدت زمان تیمار با امواج فراصوت زنده‌مانی سلول‌ها نیز به طور معنی‌داری کاهش یافته است. همچنین در دماهای ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد زنده‌مانی سلول‌ها به شدت کاهش یافته و در مدت زمان‌های ۱۴ و ۲۰ دقیقه تیمار با امواج فراصوت، زنده‌مانی سلول‌ها به صفر رسیده است (شکل ۳). با این حال، به دلیل وجود اثر متقابل معنی‌دار بین میزان دما و مدت زمان تیمار با امواج

فراصوت، این کاهش زنده‌مانی سلول‌ها با افزایش مدت زمان اعمال تیمار در همه دماهای تیمار با امواج فراصوت یکسان نبود. به‌طوری‌که با افزایش مدت زمان اعمال امواج فراصوت از دو دقیقه به ۸ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها معنی‌دار نبوده ولی در سایر دماها، این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود (شکل ۳). ویو و لین (۲۰۰۲) در مطالعه‌ای که روی زنده‌مانی سلول‌های جین‌سینگ انجام داده‌اند، بیان کرده‌اند که در قدرت‌های بالا و زمان‌های طولانی اعمال امواج فراصوت، زنده‌مانی سلول‌ها به میزان قابل توجهی کاهش یافته است (۳۷).



شکل ۶- تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از سلول توتون: الف) سلول شاهد بدون تیمار با امواج فراصوت، ب) تصویر سلول کامل سونیکه شده با امواج فراصوت، پ و ت) نمای نزدیک از شکاف‌های حاصل از امواج فراصوت بر سطح سلول و اندازه شکاف‌ها

با توجه به غلظت برابر سلول در تمامی تیمارها به دلیل استفاده از یک سوسپانسیون سلولی در این آزمایش، درصد شکست سلولی در هر تیمار از مقایسه تعداد سلول‌های سالم در آن تیمار با سلول‌های شاهد تعیین شد. براساس نتایج تأثیر امواج فراصوت بر شکست دیواره سلولی مشاهده می‌شود که بیشترین درصد شکست سلولی مربوط به تیمار در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۴ دقیقه امواج فراصوت (۱۸/۷۳۳ درصد) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۲۰ دقیقه اعمال امواج فراصوت (۱۷/۴۸ درصد) بوده است که این نتیجه می‌تواند در استفاده از این تکنیک برای استخراج متابولیت‌های ثانویه از سلول‌های گیاهی مفید باشد (۲). امروزه استخراج با روش فراصوت بدلیل کارایی بالاتر و میزان مصرف انرژی و آب کمتر، به صورت جایگزینی مناسب برای روش‌های استخراج قدیمی و به عنوان روشی اثبات شده در فراوری مواد گیاهی، به‌ویژه ترکیبات با وزن مولکولی پایین تبدیل شده است (۲۸). اثر افزایشی امواج فراصوت در میزان استخراج مواد گیاهی مربوط به شکستن سلول‌ها و رهایش محتویات آنها به

محیط استخراج است (۱۹). امواج فراصوت، مراحل فرایند استخراج یعنی تورم بافت به منظور جذب حلال و نیز خروج ترکیبات از بافت به حلال را از طریق ایجاد تخلخل و منافذ در دیواره سلول‌ها و بهبود انتشار و انتقال جرم تسهیل و تسریع می‌کنند (۳۶). از این رو، استفاده از این امواج در استخراج ترکیبات مختلف از بافت‌های گیاهی، بازدهی عمل و سرعت فرایند استخراج را افزایش داده و مصرف حلال را کاهش می‌دهد (۳۵). در همین رابطه گزارش شده که استخراج روغن از دانه کلزا با کمک امواج فراصوت با سرعت بیشتری انجام می‌شود. از سوی دیگر مشخص شده که نوع حلال بازدهی استخراج با امواج فراصوت را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۰). در مطالعه‌ای روی تأثیر استفاده از امواج فراصوت با قدرت بالا بر استخراج روغن از دانه‌های آسیاب شده زیتون مشخص شد که در حضور این امواج، دیواره سلول‌ها و بافت‌های گیاهی تخریب شده و ترکیبات آنتی اکسیدانی (پلی‌فنل‌ها و توکوفرول‌ها) و رنگدانه‌های (کلروفیل و کاروتنوئید) بیشتری به داخل روغن راه یافته و باعث افزایش ارزش تغذیه‌ای می‌شوند (۱۵).

همانطور که می‌دانیم یک دیواره سخت و ضخیم در سلول گیاهی وجود دارد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی (شکل ۶ ب و پ) این تحقیق نشان داد که امواج فراصوت منافذی با اندازه‌های متفاوت (با توجه به شدت امواج فراصوت و مدت زمان تیمار) را در دیواره سلول‌های توتون ایجاد می‌کند. بنابراین، استفاده از امواج فراصوت می‌تواند یک روش مناسبی را برای انتقال ژن به داخل پروتوپلاست‌های گیاهی و سلول‌های طبیعی گیاهی مهیا کند (۹ و ۱۰). ثابت شده است که تیمار با امواج فراصوت می‌تواند نفوذپذیری موقت غشا پلاسمایی را تغییر داده و جذب را تسهیل کند. در مقایسه با دیگر روش‌های مستقیم انتقال DNA، همچون بمباران ذره‌ای، الکتروپوریشن و ریزتزریقی، تیمار با امواج فراصوت می‌تواند ساده‌تر انجام شود (۱۷).

با افزایش دمای حمام اولتراسوند به ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد در تیمار امواج فراصوت، درصد زنده‌مانی سلول‌های توتون به شدت کاهش یافت (شکل ۳). ازجمله فرایندهایی که ممکن است در کاهش زنده‌مانی و افزایش شکست سلول‌های تیمار شده با امواج فراصوت مؤثر باشند، می‌توان به اثر مکانیکی و سونوشیمیایی صوت اشاره کرد. فرایند مکانیکی فراصوت گرادیانهای فشار بالایی را درون مایع به وجود می‌آورد که باعث آسیب رساندن به بافت‌های بیولوژیکی و سلول‌ها می‌گردد (۲۷). طبق مکانیزم اثرات سونوشیمیایی صوت، هر حباب کاویتاسیون تولید شده به وسیله امواج فراصوت به‌منزله میکروراکتور کوچکی عمل می‌کند که تولید نقاط داغ موضعی کرده و می‌تواند آنزیم‌های سلول را دناتوره کند (۳۲ و ۳۸).

نتیجه‌گیری کلی

بنابراین، با توجه به اینکه یکی از آثار امواج فراصوت در سلول‌ها افزایش نفوذپذیری غشا است، بنابراین می‌توان با تعیین دامنه‌ای از امواج که توانایی ایجاد حفره‌های آنی و یا اعمال شوک با کمترین آسیب به سلول را داشته باشد، برای انتقال ماکرومولکول‌ها و افزایش متابولیت‌های ثانویه در سلول استفاده کرد. از تیمارهایی که حداکثر شکست سلولی را دارند، می‌توان برای استخراج متابولیت از سلول-های گیاهی استفاده کرد.

منابع

۱. حسامی ر، شریعتی م. ۱۳۹۱. پاسخ شاخص کارایی فتوسنتزی (PI_{ABS}) نسبت به کمبود نیترات در گیاهان تنباکو (*Nicotiana plumbaginifolia*) تراریخته شده با ژن ناقل نیترات AtNRT2.1 با استفاده از فلئورسنس کلروفیل a. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). ۴ (۲۷): ۵۶۹-۵۷۹.

۲. رضاییان م، فرامرزی م ع، نیکنام و، ابراهیم‌زاده ح. ۱۳۹۳. بررسی اثر تنش شوری بر رشد، پراکسیداسیون لیپیدها، زیمایه‌های پاداکساینده و فیکوبیلی پروتئین‌ها در دو گونه نوستوک. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران. ۴ (۲۷): ۶۶۱- ۶۷۳.

۳. کوهی ل، زارع ن، اصغری زکریا ر، شیخ‌زاده مصدق پ. ۱۳۹۳. نقش تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و جداکشت‌های مختلف بر پاسخ کشت بافتی و سوسپانسیون سلولی بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.). مجله اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی ۲ (۳۰): ۲۰۳- ۲۱۴.

4. Bao, S., Thrall, B.D., Miller, D.L. 1997. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *ultrasound medicine biology journal*. 23:953– 9.

5. Carl, N.M.D. 1999. Rapid flowering *Nicotiana tabacum* L. *Sex Plant Reproduction*, 12: 123-124.

6. Chen, L., Jin, H., Ding, L. 2008. Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from *Herba Epimedii. Separation and Purification Technology*, 59: 50-56.

7. Dahlem, O., Reisse, J., Halloin, V. 1999. The radially vibrating horn: a scaling-up possibility for sonochemical reactions. *Chemical Engineering Science*, 54: 2829- 2838.

8. Daniell, H. 2003. Medical molecular farming: expression of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines via chloroplast genome. In: Plant Biotechnology 2002 and Beyond (ed. Vasil, I.K.). 371-376. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

9. Fechheimer, M., Boylan, J.F., Parker, S., Sisken, J.E., Patel, G.L., Zimmer, S.G. 1987. Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proceedings of National Academy of Sciences* U.S.A. 84: 8463–7.

10. Fechheimer, M., Taylor, D.L. 1987. Introduction of exogenous molecules into the cytoplasm of *Dictyostelium discoideum* amoebae by controlled sonication. *Methods Cell Biology*, 28: 179– 90.

11. Frizzel, L.A. 1988. Biological effects of acoustic cavitation. In: Ultrasound, its chemical, physical, biological effects (ed. Suslick, K.) 287-303. VCH Publishers, Weinheim.

12. Gebicki, S., Gebicki, J.M. 1993. Formation of peroxides in amino acids exposed to oxygen free radicals. *Biochemical Journal*, 289: 743-749.

13. Henglein, R. 1995. Chemical effects of continuous and pulsed ultrasound in aqueous solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2: S115-S121.

14. Huber, P.E., Pfisterer, P. 2000. In vitro and in vivo transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound. *Gene Therapy.* 7:1516–25.

15. Jiménez, A., Beltran, G. 2007. Highpower ultrasound in olive paste pretreatment. Effect on process yield and virgin olive oil characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14: 725-731.

16. Joersbo, M., Brunstedt, J. 1992. Sonication: a new method for gene transfer to plants. *Physiologiae Plantarum,* 85: 230-234.

17. Jun, L. 2008. Preparation of fluorescence starch-nanoparticle and its application as plant transgenic vehicle, *J. Centeral South univiversity of Technology*, 15: 768-773.

18. Kieffer, H., Triouleyre, C., Bertsch, C., Farine, S., Leva, Y., Walter, B. 2004. Mannose and xylose cannot be used as selectable agents for *Vitis vinifera* L. transformation. *LaboratoireVigne Biotechnologies etEnvironnement*, 43: 35-39.

19. Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z.H., Da, T., Yalin,Y., Chenggang, C., Tianhua, F., Fan, Z.H. 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin From *Jerusalem artichoke* tubers. *Journal of Food Engineering*, 79: 1087-1093.

20. Liu, Y., Uno, H., Takatsuki, H., Hirano, M., Sakanishi, A. 2005. In vitro transfection of HeLa-S3 cells and its optimal condition estimated by hemolysis with duty cycle ultrasound. *European Biophysics Journal.* 34:163– 9.

21. Liu, Y., Yang, H., Sakanishi, A. 2005. Ultrasound: Mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. *Biotechnology advances.* 24:1-16

22. Manas, P., Munoz, B., Sanz, D., Condon, S. 2006. Inactivation of lysozyme by ultrasonic waves under pressure at different temperatures. *Enzyme and Microbial Technology.* 39: 1177-1182.

23. Miller, D.L., Bao, S., Gies, R.A., Thrall, B.D. 1999. Ultrasonic enhancement of gene transfection in murine melanoma tumors.

31. Steward, N., Martin, R., Engasser, J.M., Goergen, J.L. 1999. A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. *Plant Cell Reports,* 19:171–176.

32. Suslick, K.S. 1988. Ultrasound: Its physical, chemical and biological effects, VCH, New York.

33. Suslick, K.S. 1989. The chemical effects of ultrasound. *Scientific American*. 260, 80-86.

34. Tso, T.C., 2005. Production, physiology and biochemistry of tobacco plant. Institute of international development and education in agricultural and life sciences, New York, USA.

35. Vilkhu, K., Mawson, R. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies,* 9: 161-169.

36. Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 303-313.

37. Wu, J., Lin, L. 2002. Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 51–57.

38. Wyber, J.A,. Andrews, J,. Demanuele, A. 1997. The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells. *Pharmaceutical Research,* 14: 750-756.

Ultrasound in medicine and biology. 25:1425–1430.

24. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497.

25. Nagarajan, K., Prasadrao, J.A.V. 2004. Textbook of field crops production, Published by Directorate of Information and Publication of Agriculture Indian Council of Agricultural Research Krishi Anusandh Bhavan, Pusa, New Delhi. 769-812.

26. Potapovich, M.V., Adzerikho, I.E., Eremin, A.N., Metelista, D.I. 2003. Kinetics of inactivation of catalase in solutions under high- and low-frequency ultrasound. *Russian Journal of Physical Chemistry,* 77: 299-306.

27. Riesz, P., Kondo, T. 1992. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radical Biology &Medicine,* 13: 247-70.

28. Rodrigues, S.P., Gustavo, A.S. 2007. Ultrasound extraction of compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. *Journal of Food Engineering*, 80: 869-872.

29. Rossing T.D. 2007. Introduction to Acoustics. In: Springer Handbook of Acoustics (ed. Rossing T.D.) 1-6. Springer, New York.

30. Stanisavljevic, I.T., Lazic, M.L. 2007. Ultrasonic extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14: 646-652.

The effect of ultrasound on viability of tobacco cells

Koohi L., Zare N., Amani A. and SheikhZadeh-Mosaddegh P.

Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran

Abstract

Tobacco (*Nicotianatabacum* L.) is a model plant for tissue culture and genetic engineering from the past decades. In this study the effect of ultrasonic waves (produced by BANDELIN SONOREX DIGITEC) on Tobacco cells viability and disruption were investigated. For callus induction, tobacco leaf explants cultured on MS medium supplemented with 2,4-D and Kinetin. The cell suspension culture was initiated by transferring of calli into liquid medium. Then, the cell suspensions exposed to ultrasonic wave with different levels of temperature and duration. Cells viability was determined by Trypan blue staining, and cells disruption and morphological changes were determined by hemocytometer method, optical microscope and Scanning electron microscopy. Results showed that the viability of cells was significantly influenced by temperature and duration of ultrasonic waves. The highest level of cell viability was obtained at 40° C and 2 min ultrasonication (%76.702) and at 25° C and 2 min ultrasonication (%75.67). The highest cells disruption were observed at 50° C and 14 min ultrasonication (% 18.733) and at 25° C and 20 min of ultrasonic treatment (% 17.48). Scanning electron microscopy (SEM) was confirmed the formation of different sized pores on cell wall under ultrasound treatment.

Key words: Cell Viability, *Nicotiana tabacum* L. , Suspension culture, Ultrasonic Waves