

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Neurobiofizikos bakalauro studijų programos IV kurso studentas

Martynas Lukošius

Bakalauro baigiamasis darbas

**Garso poveikis *Lepidium sativum* ir *Nitellopsis obtusa* fiziologinėms ir
morfologinėms savybėms**

Darbo vadovas:

Doc. dr. V. Kisnierienė

Darbo konsultantas:

Doc. Dr. R. Buišas

Vilnius 2024

Turinys

Santrumpos	3
ĮVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. Garso fizikinės savybės.....	6
1.2. Garso įtaka augalams makro lygmenyje	7
1.2.1. Augalų reakcija į lapų vibracijas, kurias sukelia vabzdžių kenkėjų kramtymas....	8
1.2.2. Fonotropizmas.....	9
1.3. Kalcio pernašos sistemos augalų ląstelėse.....	11
1.4. Garso įtaka augalams molekuliniam lygmenyje.....	12
1.5. Garso poveikis augalų fiziologijai.....	14
1.6. Augalų generuojamas garsas.....	15
1.7. Garsas kaip augalų komunikacijos signalas.....	16
1.8. Garso įtaka augalų genų ekspresijai.....	17
1.9. Žmogaus sukurtų objektų skleidžiamo triukšmo potenciali grėsmė augalams.....	18
2. METODIKA	19
2.1. <i>Lepidium sativum</i>	19
2.2. <i>Nitellopsis obtusa</i>	20
2.3. Metodikos kūrimas.....	21
3. Rezultatai ir jų aptarimas.....	27
3.1 <i>Niteliopsis obtusa</i> chloroplastų kokybinė analizė.....	27
3.2 Fonotropizmo rezultatai.....	29
3.3 <i>Lepidium sativum</i> foto sistemos pigmentų koncentracijų įvertinimas.....	31
3.4 <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelių pigmentų koncentracijų įvertinimas.....	36
3.5 <i>Lepidium sativum</i> chlorofilo fluorescencijos parametrų analizė.....	43
3.6 <i>Lepidium sativum</i> chlorofilo fluorescencijos parametras, (pakartotinis eksperimentas)46	
3.7 <i>Lepidium sativum</i> šaknų ilgio duomenų analizė.....	49
3.8 <i>Lepidium sativum</i> viršutinės dalies ilgio duomenų analizė.....	51
3.9 <i>Lepidium sativum</i> šaknų ir viršūnių augimo greičio analizė 3–6 dienų laikotarpiu.53	
3.10 <i>Lepidium sativum</i> šaknų ir viršūnių augimo greičio analizė 6–9 dienų laikotarpiu.55	
IŠVADOS.....	57
SANTRAUKA.....	58
SUMMARY.....	59
LITERATŪRA.....	60

Santrumpos

PM - plazmolemos

dB – decibelas

Hz - hertzas

UV - Ultravioletiniai spinduliai

Rpm – apsisukimai per minutę

OD - optinis tankis

Fv/Fm - kintamos ir maksimalios fluorescencijos santykis

Įvadas

Garsas yra vienas iš aplinkos veiksnių, kuris gali turėti įtakos augalų augimui ir vystymuisi. Šis veiksnys tampa vis aktualesnis šiuolaikiniame pasaulyje, kurio aplinka vis dažniau yra veikiamą įvairių žmogaus sukurtų triukšmų. Tyrimai parodė, kad garsas gali turėti įtakos įvairių augalų rūšių fiziologinėms ir morfologinėms savybėms, nors poveikio mechanizmų supratimas dar tik pradėtas (Del Stabile et al., 2022).

Kol kas dar nėra iki galo aišku, koku mechanizmu garsas veikia augalų augimą, nors biologiniai garso poveikiai augalams jau buvo nagrinėti ankstesniuose tyrimuose. Buvo nustatyta, kad veikiant augalus garso stimulų, tam tikri streso sukelti genai gali būti aktyvuojami transkripcijos lygmenyje. Tai rodo, kad garsas gali turėti įtakos augalų genų raiškai ir sukelti fiziologinius pokyčius (Frongia et al., 2020).

Nors žinios apie garsinę komunikaciją tarp augalų yra ribotos, parodyta, kad augalai patys gali skleisti garso bangas žemais dažniais, pavyzdžiui, 50–120 Hz. Be to, augalai skleidžia ir ultragarsines vibracijas, kurių dažnis siekia 20–100 kHz; šios vibracijos buvo užfiksuotos prijungus jutiklius tiesiai prie augalų stiebų. Tokie atradimai leidžia manyti, kad augalai gali ne tik reaguoti į aplinkos garsus, bet ir patys generuoti vibracinius signalus, kurie galimai turi biologinę reikšmę (Hassanien et al., 2014).

Šiame darbe aprašomas tyrimas yra svarbus dėl kelių priežasčių. Pirma, jis gali padėti suprasti, kaip garsas, kaip aplinkos veiksnys, veikia augalus, kas gali turėti įtakos žemės ūkio ir aplinkosaugos praktikoms. Antra, gauti rezultatai gali prisidėti prie bendro žinių bagažo apie augalų fiziologiją ir morfologiją, suteikdami daugiau informacijos apie tai, kaip augalai reaguoja į įvairius stresorius. Galų gale, šis tyrimas gali padėti kurti naujas strategijas augalų auginimui ir apsaugai nuo neigiamo aplinkos triukšmo poveikio.

Kadangi yra tyrimų kaip garsas veikia kukurūzų šaknų pasisukimo laipsnį link garso šaltinio, pravartu sužinoti ar toks pat efektas galimas ir kitose augalų rūšyse. Sėjamoji pipirnė (*Lepidium sativum*) yra plačiai auginama daržovė, dažnai naudojama kaip modelinis organizmas augalų fiziologijos tyrimuose dėl savo greito ir lengvo auginimo. Kadangi yra tyrimų kaip garsas veikia chloroplastų kalcio kanalus, pravartu sužinoti ar garsas paveiki foto sintetinamų pigmentų koncentracijas. Dėl savo anatominių ir fiziologinių savybių chloroplastų tyrimams yra patogus naudoti žvaigždėtasis maurašakis (*Nitellopsis obtusa*). Ši charofitų rūšis yra plačiai tyrinėjama Europoje, jos reakcijos į aplinkos veiksnius gali padėti suprasti, kaip įvairūs stresoriai veikia vandenines augalų rūšis.

Šiame darbe bus tiriamas garso poveikis sėjamosios pipirnės (*Lepidium sativum*) ir žvaigždėtojo maurašakio (*Nitellopsis obtusa*) fiziologinėms ir morfologinėms savybėms. Fiziologinės savybės apima augalų augimą, vystymąsi, biomasės kaupimąsi ir fotosintezės aktyvumą, o morfologinės savybės - tai augalų struktūros ypatumai, fonotropizmas ir formos pokyčiai, tokie kaip šaknų ilgio, lapų dydžio ir bendros augalų formos pokyčiai.

Tikimasi, kad šis tyrimas atskleis naujų duomenų apie augalų atsaką į garso poveikį, praturtindamas mūsų supratimą apie augalų ir aplinkos sąveiką ir prisidės prie tvaraus žemės ūkio ir aplinkosaugos tikslų.

Darbo tiklas - ištirti garso poveikį *Lepidium sativum* ir *Nitellopsis obtusa* fiziologinėms ir fotobiologinėms ir morfologinėms savybėms.

Uždaviniai:

- Sukurti eksperimentinę metodiką garso poveikiui tirti.
- Įvertinti garso poveikį augalų augimui.
- Nustatyti *Lepidium sativum* šaknų fonotropizmą.
- Įvertinti garso poveikį *Nitellopsis obtusa* chloroplastų morfologijai.
- Nustatyti garso poveikį tirtų augalų fotosintetinančių pigmentų (chlorofilo a, chlorofilo b, karotenoidų) koncentracijoms.
- Nustatyti garso poveikį *Lepidium sativum* antros fotosistemos efektyvumui.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Garso fizikinės savybės

Garsas yra mechaninės vibracijos, sklindančios bangų pavidalu per terpę, kuri gali būti skysta, dujinė arba kieta. Garso bangos susidaro, kai garso šaltinis sukuria vibracijas, kurios perduodamos per aplinkinę terpę. Šios vibracijos keliauja nuo šaltinio garso greičiu, formuodamos garso bangas (Frongia et al., 2020).

Garso bangos plinta įvairiais būdais, priklausomai nuo terpės. Ore ir vandenyje garsas sklinda išilginėmis bangomis, kuriose dalelės juda išilgai bangos sklidimo krypties. Kietose medžiagose garsas gali plisti tiek išilginėmis, tiek skersinėmis bangomis, kuriose dalelės juda statmenai bangos sklidimo kryptčiai (Frongia et al., 2020).

Paprastai svyravimas – mažas ir periodinis, tada garsas yra banga, apibūrinama lygtimi:

$$\lambda = \frac{c}{f}$$

λ – bangos ilgis, f – dažnis ir c – garso greitis.

Garso bangos yra apibūdinamos dažniu (matuojamu hercais, Hz), intensyvumu (matuojamu decibelais, dB) ir tembru, kuris leidžia atskirti skirtingus garsus net esant tam pačiam dažniui. Garso greitis priklauso nuo terpės savybių, ypač nuo jos elastingumo ir tankio. Greitis didėja su didėjančiu elastingumu ir mažėja su didėjančiu tankiu (Frongia et al., 2020).

Natūraliai girdimo garso dažnių diapazonas skirstomas į keturias pagrindines juostas:

- Žemi dažniai: nuo 20 Hz iki 200 Hz
- Vidutinio žemi dažniai: nuo 200 Hz iki 1 kHz
- Vidutinio aukšti dažniai: nuo 1 kHz iki 5 kHz
- Aukšti dažniai: nuo 5 kHz iki 20 kHz

Dažniai, žemesni nei 20 Hz, vadinami infragarsu, o aukštesni nei 20 kHz – ultragarsu. Garso garsumas suvokiamas kaip garso slėgio lygis, matuojamas decibelais (dB) (Frongia et al., 2020). Type equation here.

Garsas yra ne tik virpėjimo energija; tai taip pat yra slėgis, kurį sukelia virpėjimo bangos, judančios tinkama terpė, kaip suspaudimo ir išretėjimo bangos. Tačiau, kad garsas būtų suvokiamas, nepakanka, kad jis būtų girdimojo dažnio diapazone; jis taip pat turi turėti pakankamą garso slėgį, t. y. akustinio reiškinių sukeltą slėgio pokytį, palyginti su statine verte. Pavyzdžiui, ore 20 μ Pa garso slėgis atitinka 0 dB garso slėgio lygį (Del Stabile et al., 2022).

1.2. Garso įtaka augalams makro lygmenyje

Gyvūnų pasaulyje garsas ir vibracijos yra svarbūs orientacijos ir komunikacijos įrankiai. Evoliucijos metu įvairūs organizmai išvystė specializuotas struktūras ir mechanizmus, kad galėtų priimti ir apdoroti akustinę bei mechaninę energiją. Pavyzdžiui, žmonės turi išorines ausis, kurios surenka oro vibracijas ir perduoda jas ausies būgneliui, kuris paverčia akustinę energiją mechanine. Tačiau daugelis kitų gyvūnų neturi išorinių ausų ar ausies būgnelio, tačiau vis tiek sugeba girdėti ir reaguoti į garsus. Tai rodo, kad įvairios morfologinės struktūros gali būti pritaikytos garsui ir vibracijoms suvokti (Gagliano, Mancuso, et al., 2012).

Augalai taip pat gali būti veikiami garsu ir vibracijomis per įvairias struktūras. Nors augalų sensoriniai mechanizmai dar nėra pilnai suprasti, yra įrodymų, kad jie gali reaguoti į mechanines vibracijas ir tam tikrus garso dažnius. Parodyta kad, jaunų kukurūzų šaknys generuoja struktūrizuotas akustines emisijas, kurios gali būti aptinkamos tam tikru atstumu . Tokie tyrimai rodo, kad augalai gali turėti specifinius dažnio jutimo mechanizmus, leidžiančius jiems prisitaikyti prie aplinkos pokyčių (Gagliano et al., 2012).

Garso įtakos augalams pavyzdys gali būti straipsnis (Kim et al., 2015). Šiame tyrime buvo nagrinėjama, ar garsinės bangos galėtų sulėtinti pomidorų nokimą. Nuskinti vaisiai buvo apdoroti žemo dažnio garso bangomis (1 kHz) 6 valandas, o po to 14 dienų stebėtos įvairios vaisių savybės esant 23 ± 1 °C temperatūrai. Po septynių dienų nuo apdorojimo 85% apdorotų vaisių buvo žali, palyginti su mažiau nei 50% neapdorotų vaisių.

Dauguma pomidorų vaisių perėjo į raudoną nokimo stadiją praėjus 14 dienų po apdorojimo. Etileno gamyba ir kvėpavimo greitis buvo mažesni garso bangomis apdorotuose pomidoruose nei neapdorotuose. Be to, apdorotuose vaisiuose spalvos pasikeitimai ir minkštimo tvirtumo pokyčiai buvo sulėtėję.

1.2.1. Augalų reakcija į lapų vibracijas, kurias sukelia vabzdžių kenkėjų kramtymas

Pagal (Body et al., 2019) vabzdžių maitinimosi vibracijos sukelia lakiųjų junginių, išskiriamų lapų, pokyčius. Jos taip pat mažina daugelio fitohormonų, įskaitant gibberelinus, citokininas, auksiną, abscizinę rūgštį, salicilo rūgštį ir keletą jasmonatų, koncentracijas.

Pagal (Appel & Cocco, 2014) gliukozinatų ir antocianinų atsakas buvo sukeltas kramtymo vibracijų, tačiau antocianinų atveju tiesioginio poveikio nebuvo; vietoj to, antocianinai buvo išlikę dėl prieš tai vykusio eksperimento poveikio todėl šis procesas pasireiškė kaip gynybos sustiprėjimas ir reakcija į prieš tai vykusias žoleėdžių atakas. Ar gynybos indukcija buvo pakankamai didelė, kad turėtų ekologinį poveikį? Naktinių vikšrų *Spodoptera exigua*, mintačių *A. thaliana*, atveju yra stipri neigiama koreliacija ($r = -0.719$) tarp indukuotų gliukozinatų ir vikšrų augimo greičio. Remiantis šiuo ryšiu, autoriai apskaičiavo, kad kramtymo vibracijų poveikis, sukeliantis bendrą gliukozinatų indukciją, sumažino *S. exigua* augimo greitį maždaug 15–20 %. Svarbu paminėti, kad buvo leidžiamas įrašytas graužimo garsas, be tiesioginio lapų graužimo.

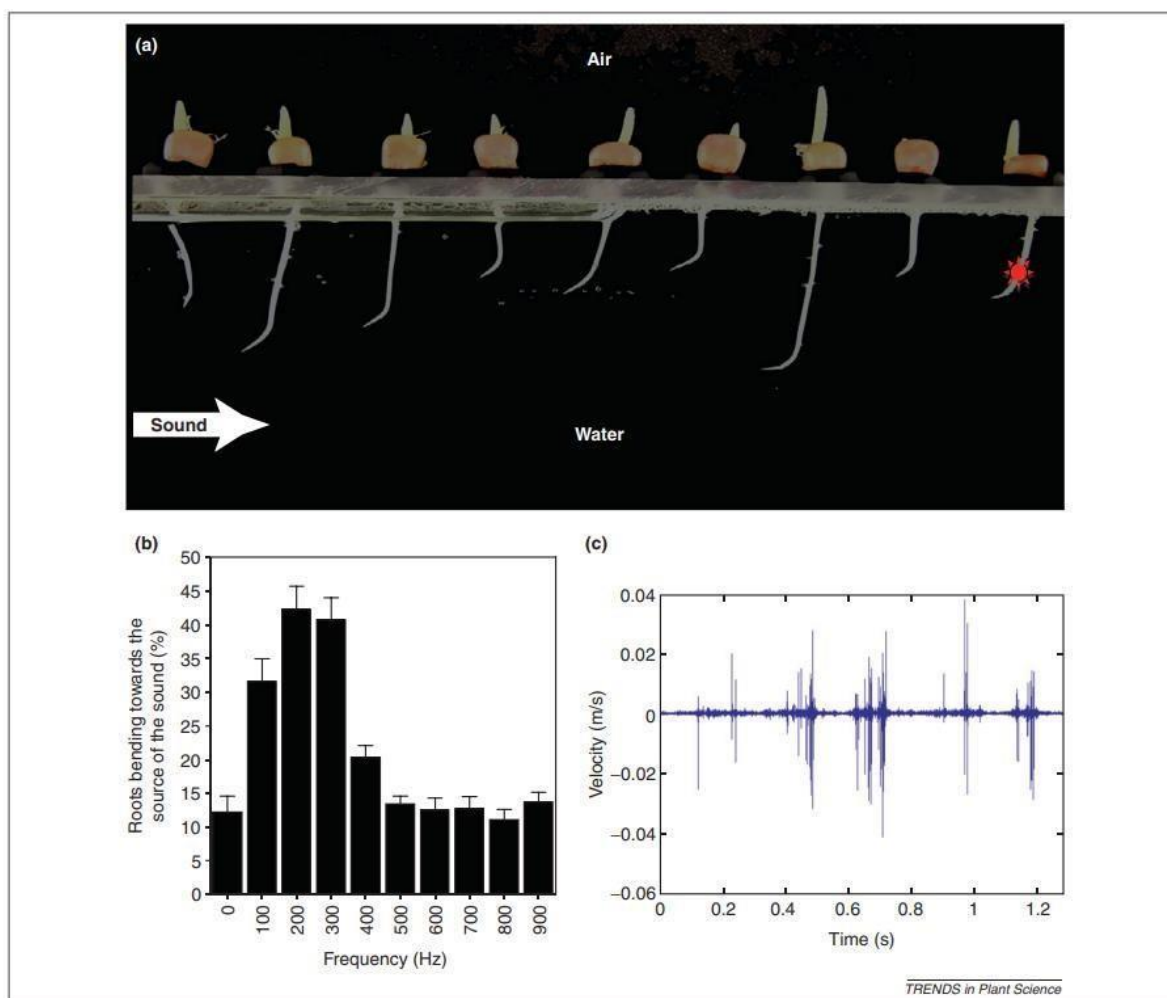
1.2.2. Fonotropizmas augaluose

Fonotropizmas yra augalų reakcija į garsinius signalus, kai jie auga link ar nuo garso šaltinio. Eksperimentai su augalais, tokiais kaip baltažiedis vairėnis *Arabidopsis thaliana* ir kukurūzai (*Zea mays*), parodė, kad augalai gali reaguoti į tam tikro dažnio garsus. Pavyzdžiui, 2 savaites veikimos *Arabidopsis thaliana* šaknys nukrypo link 200 Hz dažnio garso šaltinio, kas rodo, kad šis dažnis gali skatinti šaknų augimą tam tikra kryptimi (Rodrigo-Moreno et al., 2017)

Kukurūzų šaknys taip pat rodo atsaką į garso bangas, augdamos link ar nuo garso šaltinio priklausomai nuo dažnio ir intensyvumo. Pagal (Gagliano, Mancuso, et al., 2012) *Zea mays* šaknys geriausiai reagavo į 220 Hz dažnį pasisuktadamos į garso šaltinį (1 pav., a). Tačiau pastebėta, kad šaknys reagavo ir į kitus dažnius, bet geriausias poveikis matomas tarp 200 ir 300 Hz (1 pav., b). (trukmė nenurodyta)

1 paveikslas

Šaknų bioakustiką



Jaunų šaknų elgesys buvo tiriamas atsižvelgiant į garsą, dažnio selektyvumą ir akustines emisijas. a) Jaunų šaknų elgesys reaguojant į nuolatinį 220 Hz garsą, sklindantį iš kairės pusės (balta rodyklė). Šaknies galas aiškiai lenkiasi link garso šaltinio. (b) Fonotropinis tyrimas,

vertinantis jaunų šaknų reakciją į vandens tekėjimo sukurtas vibracijas (apie 10 mm/s garso greičio lygį) skirtingais dažniais. Geriausia reakcija matoma tarp 200 ir 300 Hz. (c) Jaunų šaknų akustinės emisijos, matuotos optiškai naudojant mikroskanavimo lazerinį Doplerio vibrometrą. Vibracijos buvo matuojamos šaknies galos išilginėje zonoje (raudona žvaigždutė panelėje a). Šaknys generuoja struktūrizuotas akustines emisijas, kurios pasireiškia garsiais (apie 2 cm/s) ir dažniais spraktelėjimais, kurie taip pat gali būti matomi tam tikroje atstumo nuo skysčio terpės. Šaltinis :M. Pagano, daktaro disertacija, Firenzės universitetas, spaudoje.

Iki šiol tokių akustinių emisijų generavimų mechanizmai ir prisitaikymo vertė lieka neaiškūs.

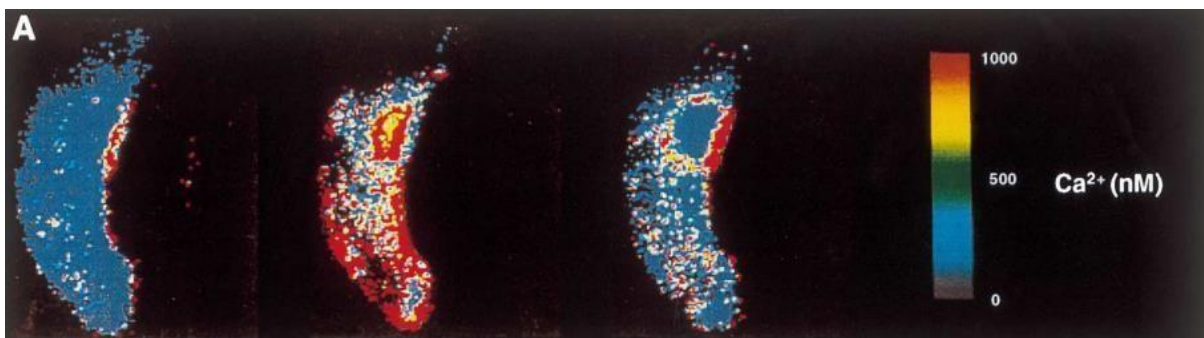
1.3. Kalcio pernašos sistemos augalų ląstelėse

Kalcis yra esminis struktūrinis, metabolinis ir signalinis elementas ląstelėje. Kalcio (Ca^{2+}) fiziologinės funkcijos yra užtikrinamos koordinuotu jo transportu per ląstelių membranas, kurį vykdo kalciui pralaidūs jonų kanalai, kalcio-ATPazės ir kalcio-vandenilio jonų mainikliai ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ mainikliai). Gyvos ląstelės sugeba neįtikėtinai tiksliai palaikyti Ca^{2+} cheminį aktyvumą citosolyje. Augalai evoliucionavo Ca^{2+} transportavimo ir Ca^{2+} buferinės sistemas, kurios veikia kartu, kad išlaikytų $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ lygį 50–150 nM ribose, net kai citoplazmą supa daug didesnis Ca^{2+} koncentracijos (0,1–10 mM) ląstelės sienelėje ir tam tikrose organelėse, tokiose kaip endoplazminis tinklas ir vakuolė (Demidchik et al., 2018).

Chloroplastai ir mitochondrijos veikia kaip Ca^{2+} saugyklos, reguliuojančios citoplazminio Ca^{2+} lygius, taip pat pasižymi savitu Ca^{2+} signalizavimu. Biotiniai ir abiotiniai signalai sukelia Ca^{2+} signalus chloroplastuose ir mitochondrijose. Manoma, kad chloroplastai ir mitochondrijos atlieka vaidmenį dalijantis ir specializuojant sudėtingus medžiagų apykaitos procesus eukariotinėse ląstelėse: fotosintezę, aminorūgščių apykaitą, lipidų apykaitą, kai kurių fitohormonų ir vitaminų apykaitą chloroplastuose, ir kvėpavimą bei lipidų apykaitą mitochondrijose. Šie medžiagų apykaitos procesai turi būti reguliuojami reaguojant į vidinius ir išorinius signalus. Ca^{2+} gali veikti kaip vienas iš svarbiausių pranešėjų, reguliuojančių medžiagų apykaitą organelėse. (Nomura & Shiina, 2021)

2. Paveikslas

Kalcio signalų augalų ląstelėse pavyzdys



Commelina žiotelės reakcija į ABA poveikį. Ca^{2+} -jautrus dvispalvis dažiklis Indo-1 buvo mikroinjekuotas į žiotelės citoplazmą epidermio ruože, o fluorescencijos santykio vaizdavimas buvo naudojamas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vizualizavimui. Kairėje esančiame vaizde matomas ramybės būsenoje esantis $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nestimuliuotoje žiotelėje. Vidurinis ir dešinysis vaizdai rodo $[\text{Ca}^{2+}]_i$ toje pačioje žiotelėje praėjus 15 s ir 2 min po 100 nM ABA pridėjimo. Pastebėtina, kad reakcija į ABA sukelia taškinius, trumpalaikius $[\text{Ca}^{2+}]_i$ padidėjimus, kurie yra erdviškai lokalizuoti pikai. Šaltinis: © American Society of Plant Physiologists Rudd & Franklin-Tong, 1999

1.4. Garso įtaka augalams molekuliniam lygmenyje

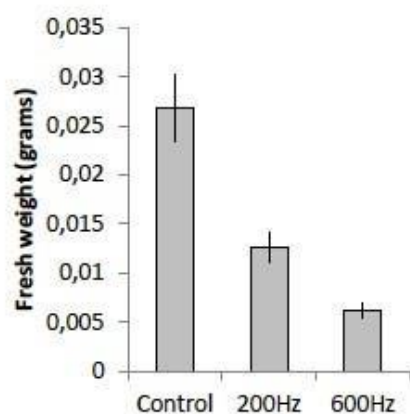
Molekuliniam lygmenyje, garso bangos gali paveikti augalų fiziologinius procesus, ypač per Ca^{2+} signalizacijos kelius ir plazminės membranos H^+ -ATPazės aktyvumą. Tyrimai rodo, kad garso stimuliacija gali sukelti Ca^{2+} srautus į ląstelę per mechanojautrius kanalus, tokius kaip MscS ir MSL, taip pat per plazminės membranos Ca^{2+} kanalus. Šie Ca^{2+} srautai aktyvuoja nuo kalmodulino priklausomus baltymus kinazes (CDPK), kurios fosforilina H^+ -ATPazes, padidindamos jų aktyvumą. Tai lemia elektrocheminio gradiento susidarymą per plazminę membraną, kuris yra būtinas maistinių medžiagų transportui ir ląstelių augimui.

Pavyzdžiui, tyrimai su chrizantemų kalusu parodė, kad garso bangų poveikis (1 kHz, 100 dB) padidino H^+ -ATPazės aktyvumą, kuris buvo susijęs su nuo Ca^{2+} priklausomu fosforiliniu ir padidėjusiu kalio kanalų pralaidumu bei Ca^{2+} persiskirstymu ląstelėse, ypač vakuolėse (Mohanta, n.d., 2018). Šie rezultatai sutampa su kitų autorių išvadomis, kad Ca^{2+} veikia kaip antrinis signalas, galimai aktyvinantis plazminės membranos kanalus, kurie sukelia potencialo valdomą signalų kaskadą. Chrizantemų ląstelėse, veikiamose 1000 Hz dažnio ir 100 dB intensyvumo garsu, pastebėtas H^+ -ATPazės aktyvumo padidėjimas, kuris buvo reguliuojamas citoplazminio Ca^{2+} kiekio pokyčių. Trumpalaikis Ca^{2+} koncentracijos padidėjimas suaktyvino kalcio priklausomas baltymų kinazes, kurios galimai aktyvavo H^+ -ATPazę ir taip prisidėjo prie baltymų bei transkripcijos faktorių reguliacijos, veikiančios genų raišką (Stabile et al., 2022).

Pagal (Rodrigo-Moreno et al., 2017) augalų ląstelėse pirminis išorinio K^+ kanalų aktyvumo padidėjimas kartu su ankstyvu K^+ kiekio sumažėjimu rodo panašų K^+ srauto reguliavimo dalyvavimą signalo perdavimo procese, kurį sukelia garsas. Tačiau svarbu atkreipti dėmesį, kad antrinis K^+ kiekio sumažėjimas ir stebėtas K^+ srautas gali būti susiję su garso sukeltu augimo sumažėjimu (3 pav.). Elektrolitų nutekėjimas, dažniausiai susijęs su K^+ ištekėjimu, lemia negrįžtamą K^+ praradimą stresą patiriančiuose augaluose ir laikomas atsako požymiu sveikose augalų ląstelėse reaguojant į daugumą abiotinių ir biotinių stresų, stabdančių augimą, galbūt taupant augalų išteklius prisitaikymui ir atstatymui. Iš tiesų, patvirtinant nuomonę, kad K^+ koncentracijos sumažėjimas garso paveiktuose augaluose buvo susijęs su garso sukeltu augimo sumažėjimu, garso paveiktų daigų fenotipas rodo trumpesnes šonines šaknis ($10,1 \pm 2,8$ mm kontroliniuose augaluose, $n = 8$; ir $2,8 \pm 0,4$ garso paveiktuose augaluose, $n = 10$, T-testas, $P < 0,001$), kaip stebima K^+ trūkumą patiriančiuose augaluose. Pridėjus K^+ , šaknų augimas garso paveiktuose augaluose atsistatė iki kontrolinių augalų verčių.

3 paveikslas

Grafikas iš Rodrigo-Moreno et al., 2017



Garsas sumažino *Arabidopsis thaliana* daigų, augintų 10 dienų skirtingų garso dažnių sąlygomis, augimą. Duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ SE (n=13). (Rodrigo-Moreno et al., 2017)

Šie mechanizmai rodo, kad garso bangos gali būti svarbus aplinkos veiksnys, reguliuojantis augalų augimą ir vystymąsi per specifinius signalinius kelius. Tolimesni tyrimai šioje srityje gali atskleisti naujas galimybes taikyti garso stimuliaciją žemės ūkyje siekiant pagerinti augalų produktyvumą ir atsparumą stresui.

1.5.Garso poveikis augalų fiziologijai

Tyrime (Jung et al., 2018) aptariami eksperimentai, kuriuose skirtingi garso dažniai paveikė augalų vystymąsi, įskaitant šaknų augimo greitį, tropines reakcijas ir net reakcijas į stresą. Autoriai nurodo, kad specifiniai dažniai gali aktyvuoti kalcio jonų kanalus, kurie yra svarbūs signalų perdavimui augalo ląstelėse. Tai rodo, kad garsas gali būti suvokiamas kaip mechaninis signalas, į kurį augalas reaguoja aktyvindamas įvairias ląstelių signalizacijos grandines. Ypatingai svarbu pažymėti, kad tyrimas atskleidžia ir potencialią garsinių bangų įtaką fotosintezei. Garsas, kaip nurodo (Ghosh et al., 2016), gali turėti įtakos chloroplastų struktūrai ir funkcijai, o netiesiogiai – ir fotosintetinių pigmentų kaupimuisi ar veiklai. Nors patys autoriai daugiausia dėmesio skiria šaknų reakcijoms, jų darbe pagrindžiamas garsinių stimulų poveikis visam augalui – nuo molekulinio iki visuminio organizmo lygmens.

1.6. Augalų generuojamas garsas

Kadangi augalai gali reaguoti į garsą, ar gali jie patys generuoti garsą?(Zweifel & Zeugin, 2008) Ultragarsinis akustinės emisijos (UAE) reiškinys medžiuose dažnai siejamas su vandens stulpelių griūtimi dėl per stiprių įtempių (kavitacijos). Tačiau decibelų (dB) diapazone, mažesniame nei kuriame sukeliama kavitacija, buvo nustatytas glaudus ryšys tarp UAE intensyvumo ir kamieno spindulio pokyčių. UAE buvo nuolat registruojama ant subrendusių paprastosios pušies (*Pinus sylvestris*) ir pūkuotosios ąžuolo (*Quercus pubescens*) kamienų sausoje vidinės Alpių vietovėje

Šveicarijoje per du sezonus. Vidutiniai 20 Hz įrašai buvo siejami su mikroklimato sąlygomis ore ir dirvoje, sulos tėkmės greičiais ir kamieno spindulio svyravimais kuris rodo augimo sumažėjimą (ΔW). Žemo dB diapazone (27 ± 1 dB) UAE reguliariai didėjo ir mažėjo dienos metu ir naktį, atitinkant ΔW pokyčius debesuotomis dienomis ir naktį. Šios žemo dB emisijos buvo pertraukiamos, kai UAE staiga pereidavo tarp žemo ir aukšto dB diapazono (36 ± 1 dB) giedromis, saulėtomis dienomis, kas atitiko plačiai palaikomą UAE aiškinimą kaip garsą nuo kavitacijų. Hipotezė teigia, kad žemo dB signalai sausros paveiktuose medžiuose yra sukelti kvėpavimo ir/arbaambio augimo, nes šios fiziologinės veiklos priklauso nuo audinių vandens kiekio ir buvo parodyta, kad jos CO₂ išskyrimo kreivės yra panašios į ΔW ir žemo dB UAE kreives.

Taigi UAE šaltinis kuris sukelia žemo decibelų signalo pokyčius, glaudžiai sekant stiebo spindulio pokyčius rodo poveikį augimui. Žemo decibelų UAE kilmė yra neaiški. Tačiau yra tam tikrų įrodymų, kad šiuos signalus sukelia stiebo audinių procesai, kurie priklauso nuo vandens soties, tokie kaip augimas, kvėpavimas ir priežiūros metabolizmas. (Zweifel & Zeugin, 2008)

1.7. Garsas kaip augalų komunikacijos signalas

Augalų komunikacija cheminėmis medžiagomis, kontaktu ar šviesos bangų ilgiais dabar yra gerai pripažinta, ir šių komunikacijos tipų tyrimai jau yra gerokai pažengę. Autoriai hipotezavo, kad augalai taip pat naudoja kitus alternatyvius bendravimo būdus, pavyzdžiui, garsą ar magnetines bangas. (Gagliano, Renton, et al., 2012). Šiame tyrime mokslininkai patikrino jaunų čili augalų gebėjimą jausti savo kaimynus ir atpažinti savo gimines naudojant alternatyvius būdus, kurie nėra priskiriami pripažintiems augalų komunikacijos būdams. Mokslininkai nustatė, kad kaimyninio augalo buvimas turėjo reikšmingą įtaką sėklų daigumui net tada, kai visi žinomi komunikacijos signalų šaltiniai buvo užblokuoti. Be to, nepaisant signalų apribojimo, daigai paskirstė energiją savo stiebams ir šaknų sistemoms skirtingai, priklausomai nuo kaimyninio augalo tapatybės (Gagliano, Renton, et al., 2012).

1.8. Garso įtaka augalų genų ekspresijai

Yra žinoma, kad kinazės, kurias manoma, kad gali aktyvinti garsovibracijos, keičia genų ekspresiją. Pagal (Jeong et al., 2008) autoriai naudodami garso paveiktą subtrakcinę cDNR biblioteką kuri buvo sukurta naudojant mRNR, išskirtą iš dviejų savaitių ryžių augalų lapų, kurie buvo apdoroti klasikinės muzikos klausymu 4 valandas., identifiko rinkinį garsui reaguojančių genų augaluose ir pademonstravo garso reguliavimą per mRNR ekspresijos analizę. Tiek šviesos, tiek tamsos sąlygomis garsas padidino *rbcS* ir *ald* genų ekspresiją. Šie genai taip pat aktyvuojami šviesos, todėl šie rezultatai rodo, kad garsas galėtų būti alternatyva šviesai kaip geno reguliatorius. *Ald* mRNR ekspresija reikšmingai padidėjo veikiant 125 ir 250 Hz dažniu, o lygiai reikšmingai sumažėjo veikiant 50 Hz dažniu, kas rodo, kad reakcija priklauso nuo dažnio. Autoriai norėdami ištirti, ar *ald* promotorius aktyvuojamas garso, sukūrė transgeninius ryžių augalus, turinčius chimera geną, kuriame yra sujungti *ald* promotorius ir GUS reporteris. Trijuose nepriklausomuose transgeniniuose linijiose, veiktuose 50 arba 250 Hz dažniu 4 valandas, GUS mRNR ekspresija buvo padidėjusi veikiant 250 Hz dažniu, tačiau sumažėjusi veikiant 50 Hz dažniu. Taigi, garsui reaguojančios mRNR ekspresijos modelis, stebėtas *ald* promotorius, glaudžiai sutapo su *ald* ekspresija, kas rodo, kad 1,506 bp *ald* promotorius reaguoja į garsą.

Toliau nagrinėjant šia tema autoriai (Jeong et al., n.d.) 24 valandas veikė garsu ryžių augalus kurie buvo taip pat paveikti sausros penkias dienas. Eksperimento metu buvo pastebėta, kad garsas inicijavo fiziologinius pokyčius, rodančius augalų toleranciją sausrai.

Buvo pastebėta, kad skirtingo dažnio garsai paveikė žiotelės laidumą streso aplinkoje, palyginti su kontrole. 1,5 kHz paveiktas augalas parodė didžiausią žiotelės laidumą, palyginus su kitais atvejais. Buvo pastebėta, kad atsparūs sausrai augalai išnaudoja savo pranašumą mažindami lapų dydį ir žiotelės laidumą vandens garams, reaguodami į vandens trūkumą. Sausrai atsparių augalų, vandens balansas ir žiotelių reguliavimas yra svarbios fiziologinės savybės, kurios veiksmingai palaikomos sausros streso sąlygomis ir optimizuoja augimą. Todėl galima teigti, kad tam tikro dažnio garsas galėjo suaktyvinti tam tikrus genus, kurie gali būti susiję su žiotelių laidumo reguliavimu sausros streso aplinkoje.

1.9. Žmogaus sukurtų objektų skleidžiamo triukšmo potenciali grėsmė augalams

Garso tarša kaip ir kitos taršos rūšys, yra rimta problema didžiajai daliai žemės aplinkos. Pagal (Francis et al., 2012) Naudodami stebėjimus, augalijos tyrimus ir žiedadulkių pernešimo bei sėklų pašalinimo eksperimentus, autoriai nustatė, kad triukšmo tarša gali turėti poveikį per bendruomenes, trikdydama arba stiprindama šias ekologines sąsajas. Konkrečiai, triukšmo tarša netiesiogiai padidino gėlių apdulkinimą kolibriaais, tačiau pakeitė gyvūnų, kurie medžioja ir sklaido *Pinus edulis* sėklas, bendruomenę, kas galėtų paaiškinti sumažėjusį *P. edulis* daigų įsitvirtinimą triukšmingose vietovėse. Tačiau deja nėra padaryta daug tyrimų šia tema.

Dar vienas pavyzdys kaip garsas gali kenkti augalams yra straipsnis (Gagliano et al., 2017). Augalai naudoja drėgmės gradientus, kad nukreiptų savo šaknis per dirvožemį, kai aptinkamas vandens šaltinis, tačiau nežinoma, kaip jie pirmiausia aptinka šaltinį. Autoriai panaudojo modelinį augalą *Pisum sativum*, kad ištirtu mechanizmą, kuriuo šaknys jaučia ir randa vandenį. Autoriai nustatė, kad šaknys sugeba rasti vandens šaltinį, jausdamos vibracijas, kurias sukelia vandens judėjimas vamzdžiuose, net ir esant drėgmės trūkumui substrate. Kai buvo prieinami ir drėgmės, ir akustiniai signalai, šaknys pirmenybę teikė drėgmei dirvožemyje, o ne akustinėms vibracijoms, kas rodo, kad akustiniai gradientai leidžia šaknims plačiau aptikti vandens šaltinį iš tolo, o drėgmės gradientai padeda tiksliau pasiekti tikslą. Rezultatai taip pat parodė, kad triukšmo buvimas paveikė šaknų gebėjimą tinkamai suvokti ir reaguoti į aplinkos garsus.

Šiame tyrime, daigai eksperimente 3 buvo veikiami dviejų akustinių signalų vienu metu. Autoriai spėja, kad daigų gebėjimas aptikti įrašytą vandens garsą buvo sumažintas, nes signalas buvo užgožtas baltojo triukšmo (t. y., maskavimo efektas) (Gagliano et al., 2017).

Taigi galima daryti išvada triukšmingos vietovės daro įtaką augalų gebėjimui daugintis, bei aptikti vandenį dirvožemyje.

2. Darbo metodika

2.1 Sėjamoji pipirinė (*Lepidium sativum*)

Sėjamoji pipirinė (*Lepidium sativum*) yra greitai augantis valgomas augalas priklausantis Brassicaceae šeimai. Šis augalas yra dažnai naudojamas kulinarijoje ir kaip vaistinė žolėlė (Wikipedia 2024). Moksliniuose tyrimuose *L. sativum* naudojamas dėl maistinės vertės ir antioksidacinės savybių (Ben Farhat et al., 2023), kaip maisto papildas (Hosny et al., 2023), prieš vėžiniams tyrimams (Ibrahim et al., 2023) ir tt. Augalas kilęs iš pietvakarių Azijos ir buvo minimas Vakarų Europoje dar prieš daugelį šimtmečių. Augalui reikia minimalių žemės ūkio išteklių, jis gerai auga pusiau sausringuose regionuose ir nereikalauja daug trąšų. Sėjamoji pipirinė yra vėsiojo sezono vienmetis augalas ir tiesi žolinė augalija, kuri greitai auga iki 50 cm aukščio, o jos sėklos gali būti nuimamos per 70–90 dienų, duodamos 800–1000 kg/ha derlių (Behrouzian et al., 2014).

4 paveikslas

Lepidium sativum



Šaltinis : <https://www.magicgardenseeds.com/Cress-Lepidium-sativum-organic-seeds>

2.2 Žvaigždėtasis maurašakis (*Nitellopsis obtusa*)

Nitellopsis obtusa yra didelis gėlavandenis dumblis. Jis taip pat žinoma kaip žvaigždėtasis maurašakis. Šis dumblis užauga iki daugiau nei 1,5 metro ilgio, yra ryškiai permatomai žalios spalvos, o šakos auga iš pagrindinio stiebo apskritomis kekėmis ir lengvai lūžta. Šį dumblių lengva atskirti nuo kitų charofitų dėl žvaigždės formos svogūnėlių, kurie leidžia vegetatyvinį dauginimąsi (Wikipedia 2023). Baltos, ryškios, žvaigždės formos svogūnėliai, kurie veikia kaip nelytinės reprodukcinės struktūros ir organai žiemojant, atsiranda iš rizoidinių mazgų, o žali svogūnėliai – iš pagrindinių ašių ir šakelių mazgų. (Larkin et al., 2018)

Atskirtos nuo pamatinio augalo, tarpinės ląstelės gali išgyventi kelis mėnesius ir gali būti laikomos atskirais vienaląsčiais organizmais. Characeae šeimos dumblių laikymas yra ypač paprastas: kai jie surenkami iš vandens telkinio, ląsteles galima laikyti kelis mėnesius dechloruotame vandentiekio vandenyje su apšvietimu, nereikalaujant jokių papildų (išskyrus retkarčiais keičiant vandenį akvariume). (Pupkis et al., 2020)

N. obtusa kaip modelinis augalas tinka fotobiologines savybės tirti, nes ji galima rasti Lietuvos ežeruose, tarpubambliai yra dideli apie 10cm ir turi standartiškas augalo organeles ir turi didelius chloroplastus.

Tyrimo objektas: *Nitellopsis obtusa* (N.A. Desvaux) J. Groves menturdumblių ląstelės ir *Lepidium sativum* sėjamoji pipirinė. Menturdumbliai yra rinkti iš Lietuvos ežerų, laikyti panašiomis kaip natūraliomis sąlygomis. *L. sativum* sėklos perkamos iš daržininkystės parduotuvių kaip „Žalia stotelė“.

2.3 Metodikos kūrimas

Eksperimentinės auginimo kameros kūrimas:

Bakalaurinio darbo metu laboratorijoje specialiai šiam tyrimui buvo pagamintos keturios auginimo kameros (**5 pav.**). Kamrų vidus iš visų pusių apdengtas garso izoliacine medžiaga. Šviesos praėjimui buvo paliktas 5 cm skersmens ertmė dangtyje. Iš vidaus, ant sienos įmontuotas garsiakalbis, kuris pakeltas nuo dugno 5 cm kiekvienoje dėžėje (**6 pav.**). Kameros stoge įstatytos augalų auginimui skirtos LED E27 230V 15W lempos, kurios buvo pakeltos, kad nešildyti kameros vidaus ir užtikrinti vienodą šviesos stiprumą visoje kameroje. Šviesos stiprumas buvo apie 600 lx. Dienos/nakties 12h/12h režimas buvo valdomas į rozetę įstatomu laikmačiu. Garsiakalbiai skleidė 80 db žemo 200Hz, vidutinio 1KHz, aukšto 10KHz dažnio garsą. Garso šaltinis buvo reguliuojamas į telefoną įdiegta programa „Frequency generator“. Kadangi garso stiprumo iš telefono nepakako, papildomai buvo pritaisyti YX1667 - LM386 - 12W - 3-12VAC/DC garso galios stiprintuvo moduliai. Ant kameros dugno buvo dedamos priklausomai nuo daromo eksperimento: *Lepidium sativum* kvadratinėse petri lekstelėse arba *Nitellopsis obtusa* plastikiniuose mėgintuvėliuose.

5 paveikslas

Augimo kameros



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Kiekvieno dažnio garso poveikiui tirti sukurta atskira auginimo kamera. Šviesos šaltinis valdomas automatiškai.

6 paveikslas

Garsiakalbio pozicija kameros viduje



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Garso šaltinis visose kamerose įmontuotas vienodu atstumu nuo tiriamojo objekto. Aido galimybę panaikina garso izoliacinė medžiaga.

Dažnių parinktis:

Tyrime pasirinkti trys skirtingi garso dažniai – žemas (200 Hz), vidutinis (1 kHz) ir aukštas (10 kHz) – siekiant įvertinti skirtingo spektro akustinio poveikio įtaką augalų fiziologinėms, fotobiologinėms ir morfologinėms savybėms. Šie dažniai buvo parinkti remiantis ankstesniais moksliniais tyrimais, kurie rodo, kad augalai gali skirtingai reaguoti į skirtingo dažnio garso bangas (Jeong et al., 2008; Stabile et al., 2022). Be to, toks dažnių spektras leidžia apimti tiek žemo dažnio vibracines stimuliacijas, kurios gali veikti mechanosensorinius kanalus, tiek aukšto dažnio signalus, kurie galimai veikia ląstelių signalines kaskadas bei antrinių signalų (pvz., Ca^{2+}) aktyvaciją. Toks pasirinkimas užtikrina galimybę palyginti dažnių poveikių spektrą bei identifikuoti jautriausius fiziologinius atsakus.

***Lepidium sativum* auginimas:**

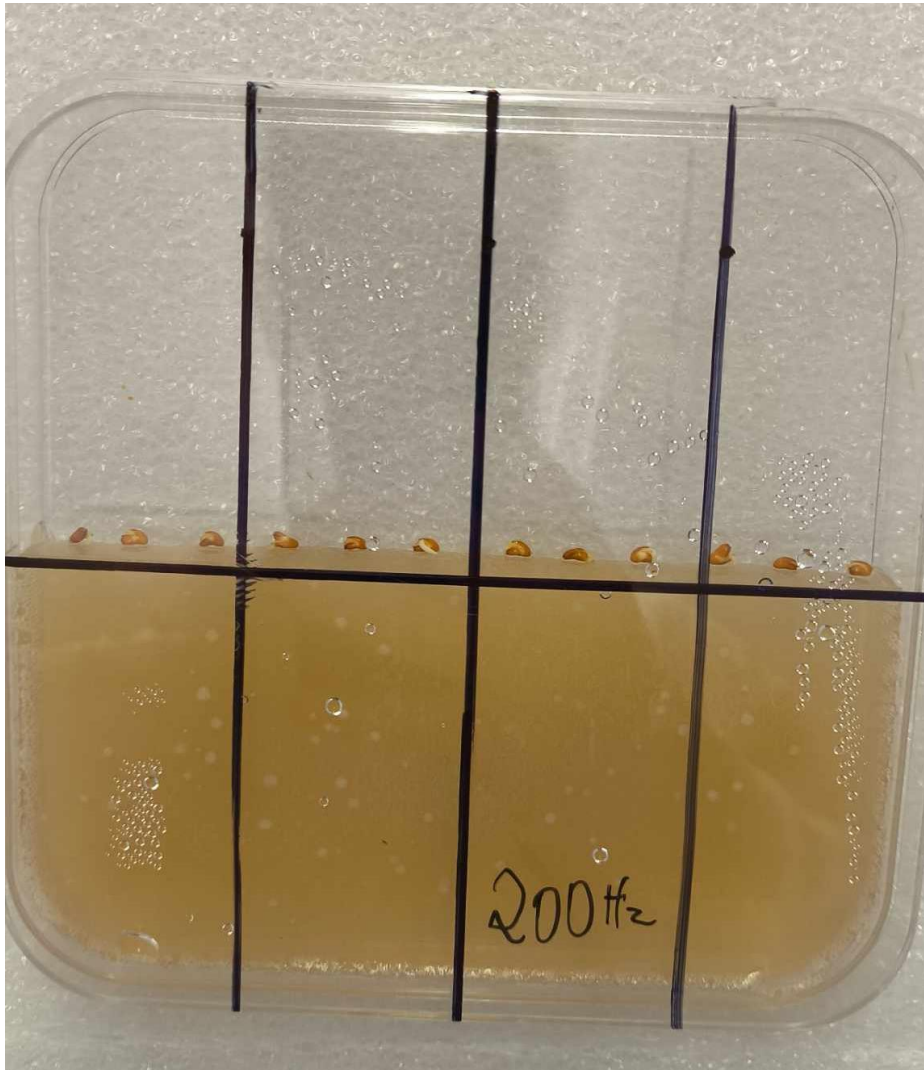
Auginimo terpės paruošimas. Į kolbą su litru distiliuoto vandens dedama 20g agaro ir šiek tiek pamaišoma. Kolba dedama ant elektrinės viryklės, kaitinama ir nuolatos maišoma magnetine maišykle kol pilnai ištirps agaro milteliai. Paruošiamas 2% koncentracijos agaro auginimo substratas. Petri lėkštelės gerai išvalomos denatūruotu etilo alkoholiu ir dedamos po Biosan DNA/RNA UV-Cleaner box UV lempa 10 min. Paruoštas agaras pilamas į keturias petri lėkšteles ir jam sustingus perpjaunamas per pusę.

***Lepidium sativum* sėklų ruošimas sėjimui:**

Pirma sėklos buvo laikomos spirito tirpale 2 minutes, kad dezinfekuotųsi. Tuomet daug kartų buvo plaunamos distiliuotu vandeniu ir paliekamos valandai, kad išsiskirtų sėklų gleivės. Petri lėkštelės buvo suskirstytos į keturias dalis ir į kiekvieną dalį dedamos po 3 *Lepidium sativum* sėklas taip užtikrinant apytiksliai vienodą sėjimą visoje lėkštelėje (7 pav). Sėklos buvo sėjamos kuo mažiau atidarius lėkštutes, šalia spiritinės lemputės. Kiekviena sėkla buvo keliama už sėklų gleivių su švirkštu ir dedama ant nupjauto agaro paviršiaus.

7 paveikslas

Pasėtos Lepidium sativum sėklos



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Lėkštelėje daiginama 12 sėklų. Sėjamosios pipirnės garsu buvo veikiamos visą augimo laiką, iškart po sėjimo. Auginimai vyko dažniausiai iki 10 dienų.

Foto sistemos pigmentų koncentracijų įvertinimas.

Mėginių ruošimas:

Foto sistemos pigmentų koncentracijai pamatuoti mėginiai imti iš 10 dienų augintų sėjamosios pipirnės daigų. Kiekvienos tiriamosios grupės visi augaliukų lapeliai buvo nukirpti, pamatuoti, bei sulyginti, kad sutaptų masės. Tuomet buvo trinami su 1mL 80% acetonu iki homogeniškos masės ir pilami 1,5 ml Eppendorf mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai buvo laikomi lede šaltai ir uždengti nuo šviesos, kad užtikrinti chlorofilo stabilumą. Mėginiai buvo maišomi

aparatu Biosan Vortex V-1plus 10 minučių. Paskutinis žingsnis buvo sumaišytus mėginius centrifuguoti Sigma 1-14 centrifugoje 5 minutes (14 725 aps./min.). Po centrifugavimo supernatantas buvo pilamas į 1mL kiuvetę ir matuojama šviesos absorbcija Viernier spektrofotometru. Registruojamos OD reikšmės buvo ties 470 nm, 646,8 nm, 663,2 nm ir 750 nm.

Nitellopsis obtusa fotosistemos pigmentų koncentracijai pamatuoti pirmiausia reikėjo nusausti pavienes ląsteles. Tada vienas ląstelės galas buvo nukerpamas ir visas jos turinys išspaudžiamas į mėgintuvėlį, bei supurtomas Biosan Vortex V-1plus 1 minutę. 20 µl ląstelės turinio buvo skiedžiama su 1 ml 80% acetono tirpalu į 1,5 ml Eppendorfą ir vėl supurtoma 1 min. Tada mėginiai buvo centrifuguojami 5 minutes (14 725 aps./min.) Sigma 1-14 centrifugoje. Po centrifugavimo supernatantas buvo pilamas į 1mL kiuvetę ir matuojama šviesos absorbcija Viernier spektrofotometru. Registruojamos OD reikšmės buvo ties 470 nm, 646,8 nm, 663,2 nm ir 750 nm.

Chlorofilų a, b ir karotinoidų kiekis buvo nustatytas spektrofotometrinio metodu pagal Lichtenthaler ir Wellburn (1983, 1987). Vertintos 3 dienas garsu veiktos ląstelės.

Naudotos formulės:

$$\text{Chlorofilas a } (\mu\text{g/mL}) = 12.25 \times (A_{663} - A_{750}) - 2.79 \times (A_{646} - A_{750})$$

$$\text{Chlorofilas b } (\mu\text{g/mL}) = 21.50 \times (A_{646} - A_{750}) - 5.10 \times (A_{663} - A_{750})$$

$$\text{Visas Chlorofilas (a + b)} = \text{Chlorofilas a } (\mu\text{g/mL}) + \text{Chlorofilas b } (\mu\text{g/mL})$$

$$\text{Karotinoidai } (\mu\text{g/mL}) = (1000 \times A_{470} - 1.82 \times \text{Chl a} - 85.02 \times \text{Chl b}) / 198$$

Antros fotosintezės efektyvumo įvertinimas.

Antros fotosintezės efektyvumui pamatuoti naudotas junior pam chlorofilo fluorometras. Visų tiriamųjų grupių augalų *Lepidium sativum* daigai, palaikyti tamsoje 30 minučių ir naudoti antros foto sistemos efektyvumo įvertinimui. Prie augaliuko lapelių buvo dedamas šviesolaidis ir mėlynos šviesos diodu, kurio maksimalaus spinduliavimo bangos ilgis 445 nm, generuojamas šviesos impulsas. Kompiuterio ekrane stebimos Fv/Fm reikšmės. Vertinti augaliukai buvo 10 dienų po sėjimo.

$$Fv/Fm = \frac{(Fm - Fo)}{Fm},$$

kur:

- **Fo** – minimalioji fluorescencija (kai visi PSII reakciniai centrai atviri),
- **Fm** – maksimali fluorescencija (kai visi PSII centrai uždaryti),
- **Fv** – kintamoji fluorescencija (Fm - Fo).

Sėjamosios pipirines augimo įvertinimas.

Šaknų ir viršūnių ilgiams pamatuoti naudotas elektroninis slankmatis.

Šaknies ilgiai matuoti nuo augaliuko hipokotilo iki šaknies galiuko, o stiebo ilgiai matuoti nuo hipokotilo iki lapo pamato. Vertinimai vyko kas 2 dienas, iki 10 dienų po sodinimo.

Sėjamosios pipirines augimo greičio įvertinimas.

Norint įvertinti, kaip keitėsi *Lepidium sativum* šaknų ir viršutinės dalies augimas skirtingose grupėse per eksperimentą, apskaičiuoti augimo greičiai (mm/dienai) tarp dviejų laikotarpių: nuo 3 iki 6 dienos (3–6 d.) ir nuo 6 iki 9 dienos (6–9 d.). Augimo greitis kiekvienam individui buvo skaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{Augimo greitis} = \frac{L_{\text{vėliau}} - L_{\text{ankščiau}}}{\text{dienų skirtumas}}$$

Chloroplastų kokybinė analizė.

Nitellopsis obtusa chloroplastų kokybinis stebėjimas buvo vykdomas ECLIPSE FN1 Nikon mikroskopu po 2 dienų garso poveikio.

Statistinės analizės naudoti metodai:

- Fotosistemos pigmentų koncentracijoms nustatyti naudoti ANOVA ir Scheffe testas, Kruskal-Wallis ANOVA ir Dunn's testas, Welch ANOVA ir Games-Howell testas
- Antros fotosistemos efektyvumui nustatyti naudotas Kruskal-Wallis ANOVA ir Dunn's testas
- Šaknų ir viršūnių ilgiams nustatyti naudotas Kruskal-Wallis ANOVA ir Dunn's testas
- Duomenų normalumui patikrinti naudotas Shapiro-Wilk testas

3. Rezultatai

3.1 *Nitellopsis obtusa* chloroplastų kokybinė analizė

Atlikta mikroskopinė *Nitellopsis obtusa* ląstelių stebėseną siekiant įvertinti galimus chloroplastų išsidėstymo ar būklės pokyčius po garso dažnių poveikio. Tikėtasi, kad skirtingų dažnių ekspozicija (200 Hz, 1 kHz, 10 kHz) galėtų sukelti pokyčius chloroplastų organizacijoje, kuri galėtų atspindėti fotosintetinės sistemos jautrumą arba adaptacines reakcijas į garso dirgiklį.

Tačiau atlikus stebėjimus nebuvo pastebėta aiškių ar sisteminių skirtumų tarp kontrolinės ir garso dažniams paveiktų ląstelių. Chloroplastų išsidėstymas, tankis ar morfologija neparodė ženklių vizualinių pakitimų, kuriuos būtų galima objektyviai susieti su akustine stimuliacija.

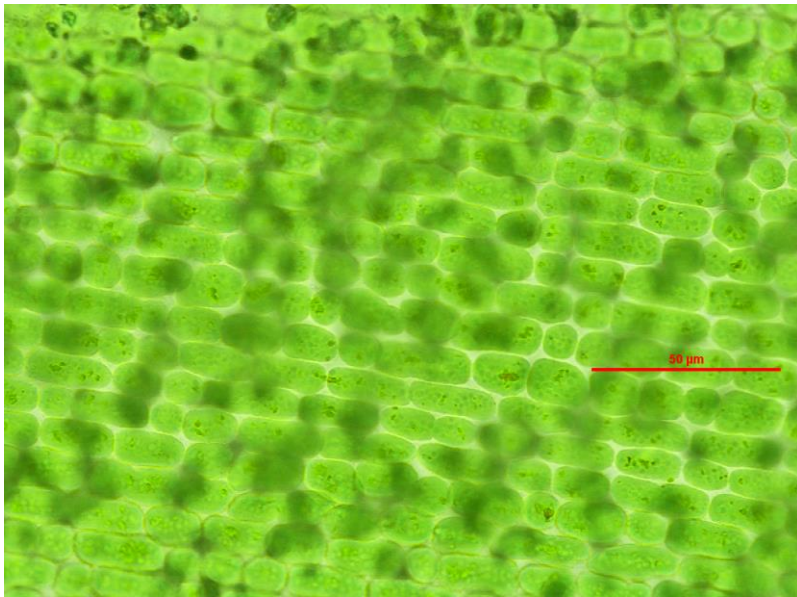
Nepaisant to, kad vizualūs pokyčiai nebuvo identifikuoti, šis rezultatas paskatino atlikti detalesnę analizę fotosintetinių pigmentų koncentracijų lygmeniu, kadangi pigmentiniai pokyčiai gali vykti subląstelinio lygiu ir nebūti aiškiai matomi šviesiniu mikroskopu.

Literatūros apžvalga parodė, kad tam tikri garso dažniai gali turėti įtakos jonų kanalams ir taip įtakoti fotosintezės veiklą, įskaitant chlorofilo koncentraciją, fotosistemos aktyvumą. Tokie pigmentai kaip chlorofilas a, chlorofilas b bei karotinoidai yra tiesiogiai susiję su fotosintetinės sistemos efektyvumu, ir jų kiekio pokyčiai gali būti svarbus fiziologinis rodiklis, rodantis aplinkos dirgiklių (tokių kaip garso dažniai) poveikį.

Todėl *Nitellopsis obtusa* ir *Lepidium sativum* tyrimai buvo tęsiami spektrofotometriniu pigmentų kiekybine analize, kuri leido įvertinti, ar garso poveikis turėjo įtakos fotosintetinių sistemų būklei.

8 paveikslas

Nitelliopsis obtusa chloroplastai



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Nitelliopsis obtusa chloroplastai buvo stebimi per ECLIPSE FN1 Nikon mikroskopą su Nikon NIR Apo 40x/0.8W objektyvu.

3.2 Fonotropizmo rezultatai

Eksperimento metu taip pat buvo siekiama nustatyti **fonotropizmo** – šaknų kryptingo augimo garso šaltinio link – buvimą. Vertinant šaknų morfologiją ir jų orientaciją, buvo tikimasi pastebėti nukrypimo nuo vertikalios ašies požymių kryptimi į (ar nuo) stimuliuojantį garso šaltinį.

Tačiau **aiškaus fonotropinio atsako** nė vienoje grupėje (200 Hz, 1 kHz, 10 kHz) nepavyko užfiksuoti. Šaknų augimas dažniausiai išliko vertikalus arba neparodė nuoseklios krypties, kurią būtų galima sieti su garso šaltiniu.

9 paveikslas

200Hz grupės šaknys auga vertikaliai.



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Galimos priežastys:

- **Garso intensyvumas ir kryptingumas galėjo būti per silpni**, kad išprovokuotų aiškų augimo nukreipimą.
- **Augimo trukmė (iki 9 d.) galėjo būti per trumpa**, kad fonotropizmo efektas išryškėtų.
- **Fonotropizmo pasireiškimas gali būti rūšiai specifinis** ir silpnesnis ar nepastebimas pipirnėms (*Lepidium sativum*).
- **Mechaniniai veiksniai** (pvz., augimo terpės pasipriešinimas) galėjo turėti didesnę įtaką šaknų kryptčiai nei akustinis signalas.
- **Gravitropizmo ir fototropizmo** dominavimo veiksnio stiprumas.

3.3 *Lepidium sativum* foto sistemos pigmentų koncentracijų įvertinimas.

Chlorofilo a (Chl a) koncentracijos analizė

Analizė parodė, kad vidutinis chlorofilo a kiekis ($\mu\text{g/ml}$) skirtingose garso dažnių grupėse skyrėsi nežymiai. Aukščiausias kiekis buvo nustatytas kontrolinėje grupėje (vidurkis = 286,28 $\mu\text{g/ml}$), o žemiausias – 1 kHz grupėje (vidurkis = 255,05 $\mu\text{g/ml}$). Kitose grupėse fiksuoti tarpiniai vidurkiai: 10 kHz – 282,49 $\mu\text{g/ml}$ ir 200 Hz – 271,13 $\mu\text{g/ml}$.

Normalumo prielaida buvo patvirtinta, nes Shapiro–Wilko testas visoms grupėms parodė $p > 0,05$ (pvz., kontrolė: $p = 0,29$; 1 kHz: $p = 0,62$), todėl galima daryti prielaidą, kad duomenys yra gauti iš normaliai pasiskirsčiusių imčių.

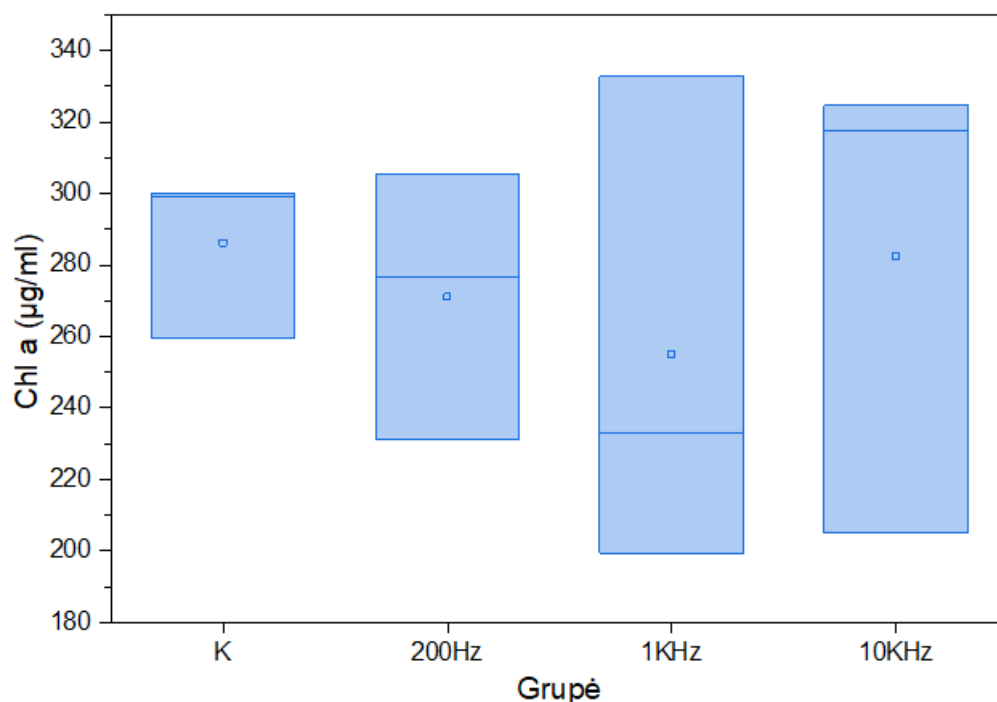
Atliekant vienfaktorinę dispersinę analizę (ANOVA), nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingo skirtumo tarp grupių ($F(3,8) = 0,21$; $p = 0,8868$). Tai reiškia, kad taikyti skirtingi garso dažniai neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos chlorofilo a kiekiui palyginus su kontrole.

Dispersijų vienodumo (Levene) testas parodė, kad dispersijos tarp grupių statistiškai nesiskiria ($F(3,8) = 2,17$; $p = 0,17$), todėl tenkinama ANOVA sąlyga apie vienodas dispersijas.

Po-hoc Scheffé testas taip pat neatskleidė reikšmingų skirtumų tarp jokių grupių porų (visos p reikšmės $> 0,9$). Visos grupės priklauso tai pačiai statistinei grupei ("A"), o tai reiškia, kad **nėra statistiškai reikšmingų skirtumų tarp nė vienos iš porų.**

10 paveikslas

Lepidium sativum chlorofilo a koncentracijos priklausomybė nuo skirtingo dažnio garso poveikio.



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Mūsų tyrimas nepatvirtino skirtumų, tačiau tyrimas, atliktas su *Sansevieria trifasciata* augalais parodė, kad skirtingi garso dažniai (600 Hz, 1240 Hz ir 1600 Hz) skirtingai paveikė augalų maistinių medžiagų įsisavinimą ir chlorofilo kiekį. Nors žemiausio dažnio (600 Hz) poveikis chlorofilo kiekiui nebuvo reikšmingas, aukštesni dažniai (1240 Hz ir 1600 Hz) žymiai padidino chlorofilo kiekį, o tai rodo, kad garsas gali skatinti fotosintetinių pigmentų sintezę (Altuntas, 2016).

Chlorofilo b (Chl b) koncentracijos analizė

Tyrimo metu nustatyta, kad *Lepidium sativum* (pipirnės) lapuose chlorofilo b kiekis skyrėsi tarp skirtingų grupių, tačiau šie skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi.

Aprašomoji statistika rodo, kad kontrolinėje grupėje (K) chlorofilo b kiekis vidutiniškai siekė $126,66 \pm 12,26 \mu\text{g/ml}$, 10 kHz grupėje – $124,07 \pm 12,57 \mu\text{g/ml}$, 1 kHz – $109,51 \pm 23,59 \mu\text{g/ml}$, o 200 Hz – $119,22 \pm 7,78 \mu\text{g/ml}$. Nors 1 kHz grupėje chlorofilo b kiekis buvo mažiausias, šie skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi.

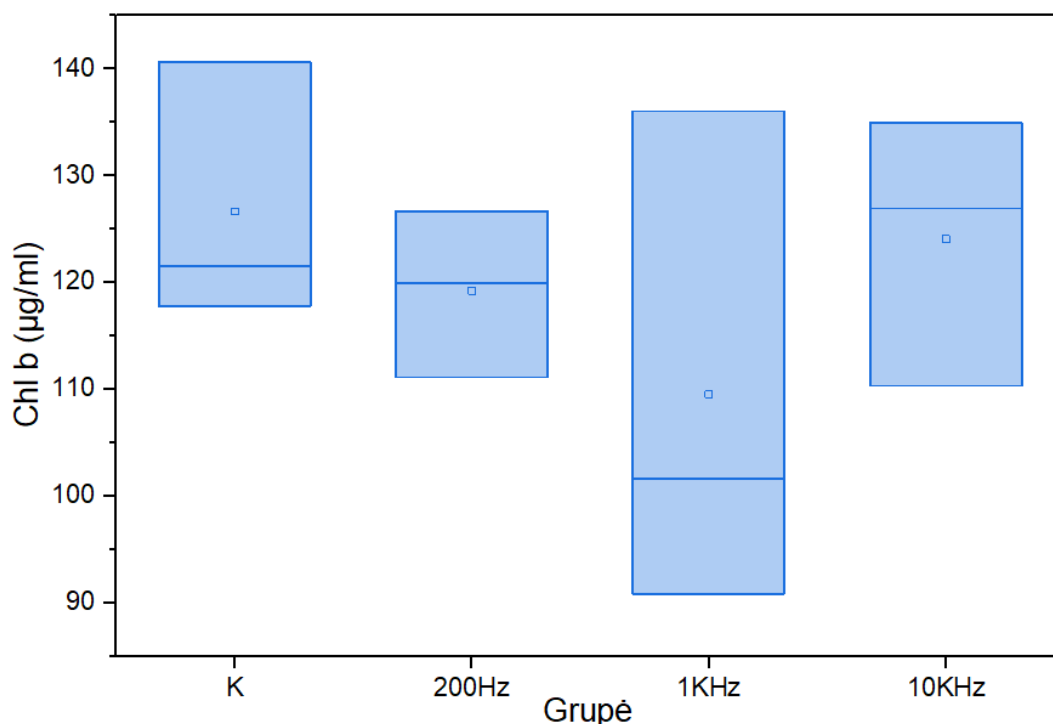
Normalumo prielaidą visoms grupėms patvirtino Shapiro–Wilk testas ($p > 0,29$), o Levene testas parodė, kad dispersijos tarp grupių nesiskyrė ($F(3,8) = 2,06$, $p = 0,1839$).

Vienfaktorė dispersinė analizė (ANOVA) parodė, kad tarp grupių nėra reikšmingų skirtumų: $F(3,8) = 0,74$, $p = 0,5569$. Tai rodo, kad taikytas garsas skirtingais dažniais neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio chlorofilo b kiekiui ($p > 0,05$).

Tolesnė post-hoc Scheffė analizė patvirtino, kad nė vienas porinis grupių palyginimas nebuvo reikšmingas (visos $p > 0,61$). Tai reiškia, kad nei viena grupė statistiškai nesiskyrė nuo kontrolinės grupės ar viena nuo kitos pagal chlorofilo b kiekį.

11 paveikslas

Lepidium sativum Chlorofilo b koncentracijos priklausomybė nuo grupės veikiant skirtingo dažnio garsu.



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Karotinoidų (car) koncentracijos analizė

Kadangi kai kurios grupės neatitiko normalumo prielaidų (Shapiro–Wilk testas: $p < 0,05$ 10 kHz ir 200 Hz grupėse), karotenoidų kiekio skirtumai tarp sąlygų buvo vertinti naudojant neparametrinį Kruskalio–Walliso testą.

Aprašomoji statistika rodo, kad karotenoidų kiekio medianos tarp grupių skyrėsi nedaug:

Lentelė 1

Karotinoidų koncentracijų medianos

- Kontrolė – 115,76 µg/ml
- 10 kHz – 117,94 µg/ml
- 1 kHz – 118,53 µg/ml
- 200 Hz – 110,93 µg/ml

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

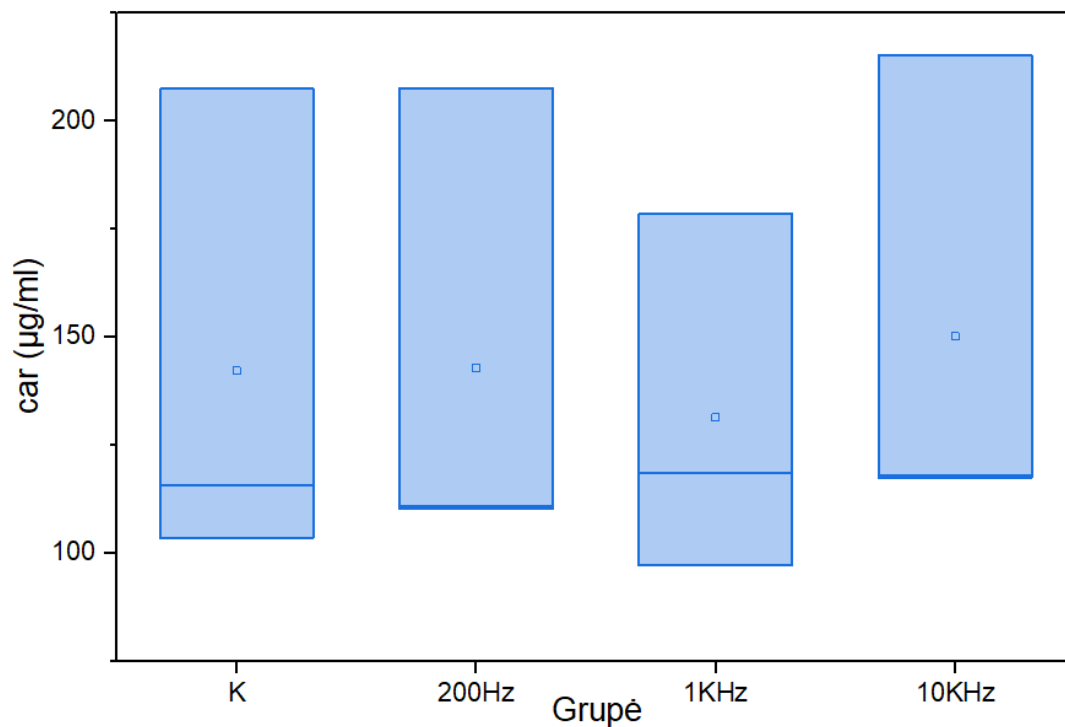
Tačiau reikšmių pasiskirstymas grupėse buvo gana platus, o didžiausios reikšmės visose grupėse viršijo 200 µg/ml.

Kruskalio–Walliso testas parodė, kad statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių nėra: $\chi^2(3) = 1,05$, $p = 0,7889$.

Dunno post hoc analizė papildomai patvirtino, kad nė viena grupių pora nesiskyrė reikšmingai ($p = 1$ visais atvejais), kas rodo, kad skirtingų dažnių garso poveikis neturėjo reikšmingos įtakos karotenoidų kiekiui pipirnių augaluose.

12 paveikslas

Lepidium sativum karotenoidų koncentracijos priklausomybė nuo grupės veikiant garsu.



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Mūsų tyrimas nepatvirtino skirtumų tačiau yra duomenų, kad garso stimuliacija gali turėti reikšmingą poveikį augalų antrinių metabolitų, tarp jų ir karotenoidų, biosintzei. Pasak (Wu et al., 2023) garso bangos, ypač tam tikrų dažnių (pvz., 1 kHz), gali skatinti tokių junginių kaip flavonoidai, fenoliniai junginiai bei karotenoidai sintezę, reguliuodamos augalų transkripcijos veiksnius ir epigenetinius mechanizmus.

3.4 *Nitellopsis obtusa* ląstelių pigmentų koncentracijų įvertinimas

Chlorofilo a (Chl a) koncentracijos analizė

Siekiant įvertinti garso bangų poveikį *Nitellopsis obtusa* chlorofilo a koncentracijai, buvo atliktas Chl a kiekio ($\mu\text{g/ml}$) nustatymas keturiose grupėse: kontrolėje, 200 Hz, 1 kHz ir 10 kHz dažniuose.

Normalumo testas

Visų keturių grupių duomenys buvo įvertinti naudojant Shapiro–Wilk testą, kuris parodė, kad nė vienoje grupėje negalima atmesti duomenų normalumo hipotezės ($p > 0,05$), todėl duomenys laikomi iš normaliai pasiskirsčiusių populiacijų (1 lentelė).

Lentelė 2

Shapiro–Wilk normalumo testas Chl a koncentracijos duomenims.

Grupė	DF	Statistika	p reikšmė	Sprendimas
Kontrolė	8	0,91	0,34	Normalumas patvirtintas
10 kHz	8	0,84	0,07	Normalumas patvirtintas
1 kHz	7	0,87	0,20	Normalumas patvirtintas
200 Hz	8	0,90	0,29	Normalumas patvirtintas

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Reikšmingumo analizė

Kadangi duomenys tenkino normalumo prielaidą, tačiau grupių dispersijos buvo nevienodos, buvo taikytas **Welch ANOVA** testas, kuris parodė, kad bent vienos grupės vidutinė Chl a koncentracija reikšmingai skyrėsi nuo kitų ($F(3, 13,78) = 5,46, p = 0,0107$).

Toliau atlikta **Games–Howell post hoc analizė** parodė, kad reikšmingas skirtumas nustatytas tarp 10 kHz grupės ir kontrolės ($p = 0,0068$), taip pat tarp 10 kHz ir 200 Hz grupės ($p = 0,0341$). Tuo tarpu 1 kHz grupė nesiskyrė reikšmingai nei nuo kontrolės, nei nuo kitų grupių (2 lentelė).

Lentelė 3

Games–Howell post hoc analizės rezultatai

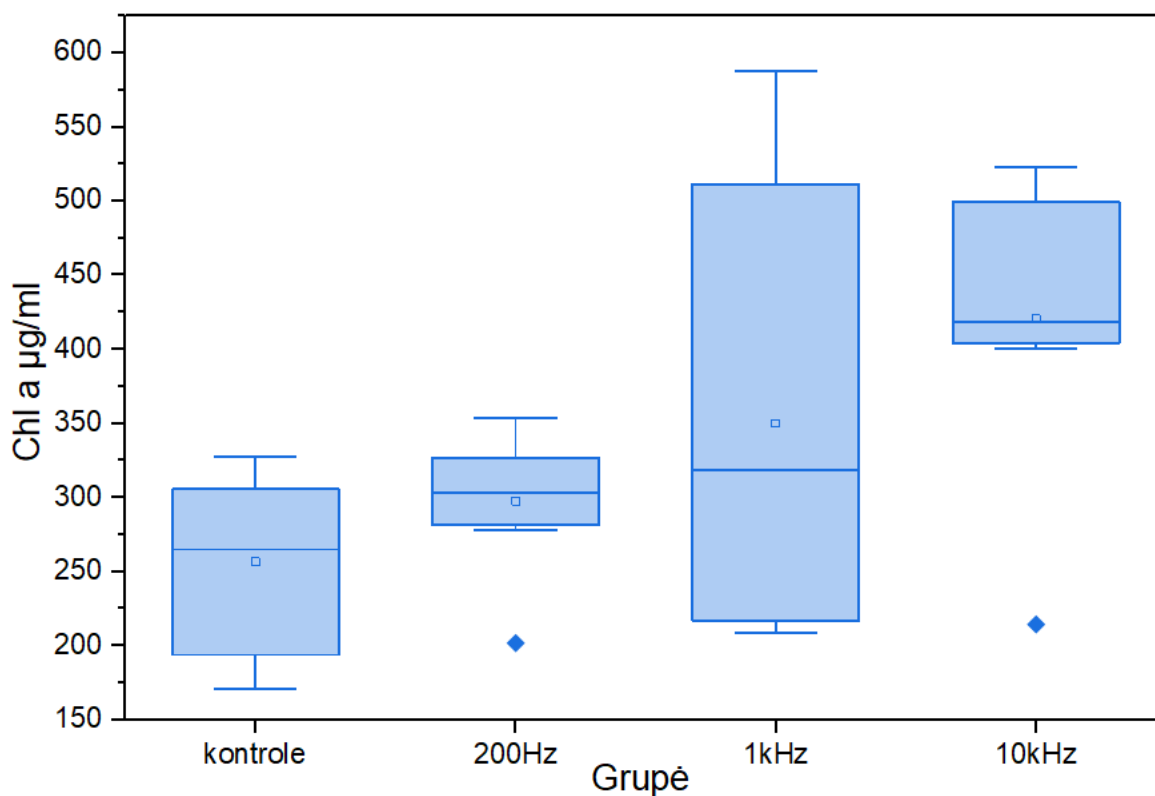
Palyginimas	Vid. skirtumas	p reikšmė	Reikšmingumas
10 kHz – Kontrolė	+164,2	0,0068	Taip
10 kHz – 200 Hz	+123,2	0,0341	Taip
1 kHz – Kontrolė	+93,5	0,4365	Ne
1 kHz – 10 kHz	–70,7	0,6999	Ne
200 Hz – Kontrolė	+41,0	0,4351	Ne
200 Hz – 1 kHz	–52,5	0,7975	Ne

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Rezultatai rodo, kad **10 kHz garso dažnio poveikis statistiškai reikšmingai padidino *Nitellopsis obtusa* chlorofilo a koncentraciją**, lyginant su kontrole ir 200 Hz dažniu. Tai leidžia manyti, kad aukštesnio dažnio garsas gali stimuliuoti fotosintetinių pigmentų sintezę, nors tikslesni mechanizmai reikalauja tolimesnių tyrimų. Reikšmingų pokyčių 1 kHz ir 200 Hz dažnių grupėse nenustatyta.

13 paveikslas

Nitelliopsis obtusa chlorofilo a koncentracijos priklausomybė nuo grupės veikiant garsu



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Chlorofilo b (Chl b) koncentracijos analizė

Siekiant įvertinti skirtingų dažnių garso poveikį *Nitelliopsis obtusa* chlorofilo b (Chl b) kiekiui, buvo atlikta Welch ANOVA analizė, nes duomenų dispersijos buvo nevienodos tarp grupių. Prieš tai atlikta Shapiro-Wilk analizė parodė, kad visų grupių (kontrolė, 10 kHz, 1 kHz, 200 Hz) duomenys neprieštarauja normalumo prielaidai (visų grupių $p > 0,05$), todėl galima naudoti parametrinius metodus.

Lentelė 4

Shapiro–Wilk normalumo testas Chl b koncentracijos duomenims.

Grupė	DF	Statistikos reikšmė	p reikšmė	Sprendimas
Kontrolė	8	0,89	0,24	Normalumas patvirtintas
10 kHz	8	0,83	0,07	Normalumas patvirtintas
1 kHz	7	0,88	0,22	Normalumas patvirtintas
200 Hz	8	0,91	0,38	Normalumas patvirtintas

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Welch ANOVA rezultatai:

Welch ANOVA analizė parodė statistiškai reikšmingą skirtumą tarp bent vienos grupės ir kitų ($F(3, 13,62) = 6,01$; $p = 0,0075$), kas leidžia teigti, kad garso dažnio poveikis reikšmingai veikia *Chl b* kiekį *N. obtusa* ląstelių mėginiuose.

Lentelė 5

Games–Howell post hoc analizės rezultatai

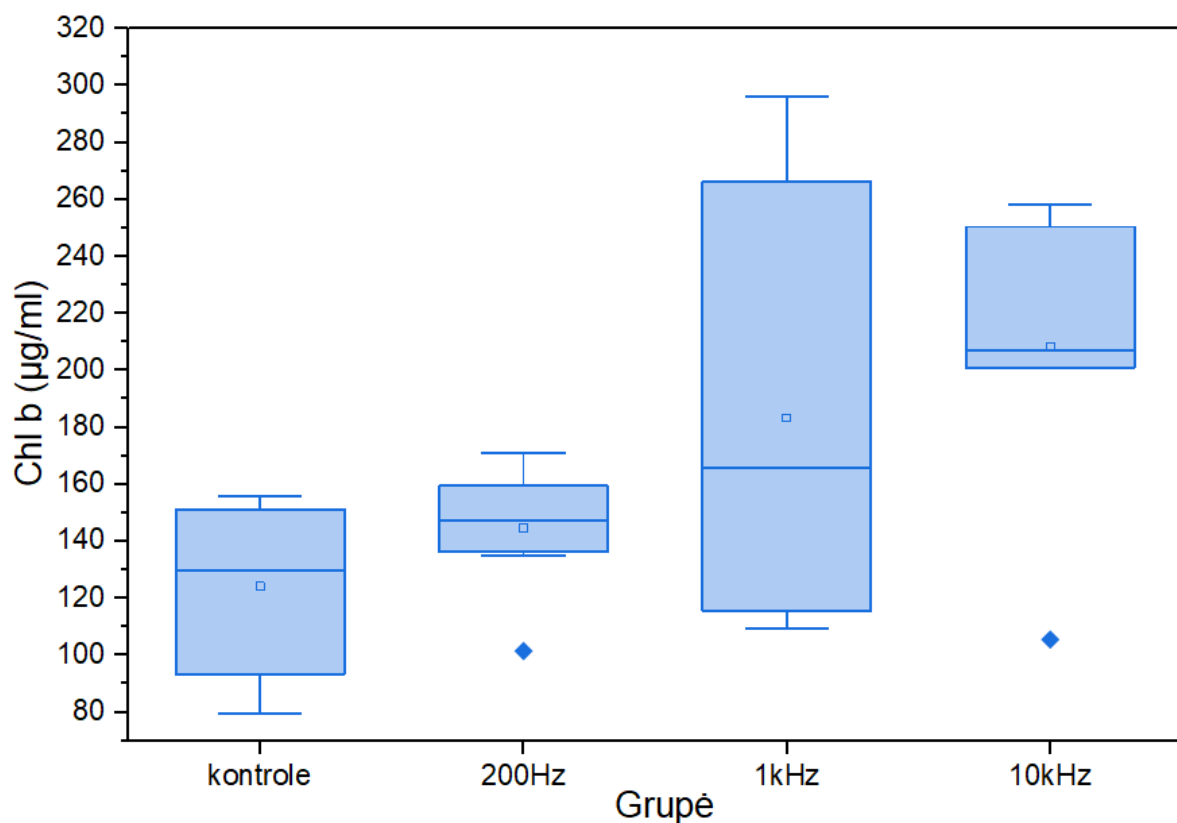
Palyginimas	Vid. skirtumas (µg/ml)	p reikšmė	Reikšmingumas ($\alpha = 0,05$)
10 kHz – Kontrolė	+84,27	0,0058	Reikšminga
1 kHz – Kontrolė	+59,18	0,2534	Nereikšminga
1 kHz – 10 kHz	–25,09	0,8596	Nereikšminga
200 Hz – Kontrolė	+20,59	0,4082	Nereikšminga
200 Hz – 10 kHz	–63,68	0,0285	Reikšminga
200 Hz – 1 kHz	–38,59	0,5513	Nereikšminga

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Pastebėta, kad 10 kHz dažnio garsas statistiškai reikšmingai padidino Chl b kiekį, palyginti su kontrole ($p < 0,01$). Taip pat 10 kHz grupė reikšmingai skyrėsi nuo 200 Hz grupės ($p < 0,05$), o tai rodo galimą dažnio priklausomą atsaką. Kiti poriniai palyginimai nebuvo statistiškai reikšmingi.

14 paveikslas

Nitelliopsis obtusa chlorofilo b koncentracijos priklausomybė nuo grupės veikiant garsu.



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Karotinoidų (car) koncentracijos analizė

Kadangi Levene testas parodė, jog dispersijos tarp grupių nėra vienodos ($p < 0,05$), buvo taikytas Welch ANOVA

Lentelė 6

Shapiro–Wilk normalumo testas karotinoidų koncentracijos duomenims.

Grupė	DF	Statistinė reikšmė	p reikšmė	Sprendimas
Kontrolė	8	0,92	0,39	Normalumas patvirtintas
10 kHz	8	0,96	0,79	Normalumas patvirtintas
1 kHz	7	0,89	0,28	Normalumas patvirtintas
200 Hz	8	0,92	0,39	Normalumas patvirtintas

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Visų keturių grupių duomenys atitiko normalumo prielaidą ($p > 0,05$), todėl Welch ANOVA taikymas yra statistiškai pagrįstas.

Welch ANOVA rezultatai

Welch ANOVA analizė neparodė statistiškai reikšmingo karotinoidų kiekio skirtumo tarp grupių ($F(3, 13,01) = 1,86$; $p = 0,186$).

Lentelė 7

Welch testas

Šaltinis	DF (grupių)	DF (klaidos)	F reikšmė	p reikšmė
Welch ANOVA	3	13,01	1,86	0,186

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Porinių grupių palyginimai – Games-Howell testas

Games-Howell testas, tinkamas naudoti esant nevienodomis dispersijoms, neparodė statistiškai reikšmingų skirtumų tarp jokios dviejų grupių poros (visos p reikšmės $> 0,22$). Pastebėta tam tikra tendencija tarp 10 kHz ir 200 Hz grupių ($p = 0,22$), tačiau ji nepasiekė statistinio reikšmingumo.

Lentelė 8

Games–Howell post hoc analizės rezultatai

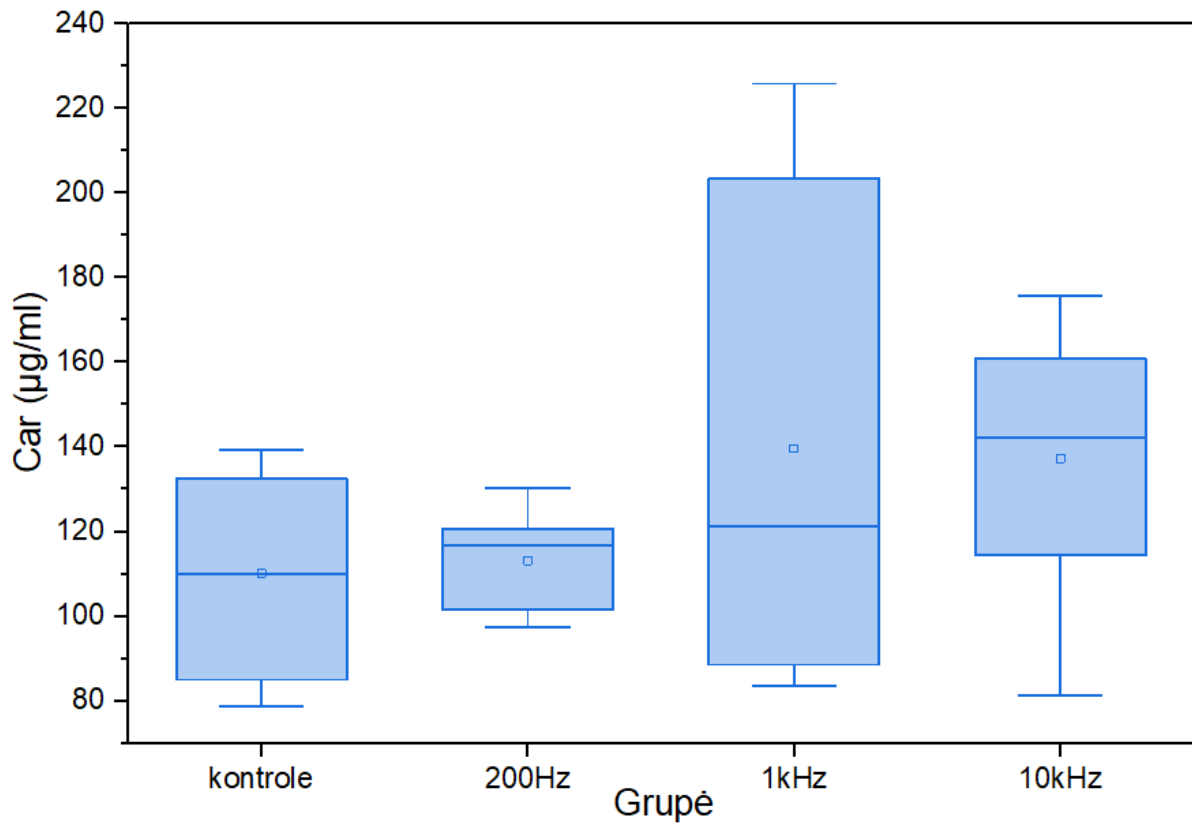
Palyginimas	Vid. skirtumas	p reikšmė	95% PI (apat. – virš.)	Reikšmingumas
10 kHz – Kontrolė	+27,17	0,236	[-12,60 – 66,94]	Ne
1 kHz – Kontrolė	+29,54	0,591	[-43,88 – 102,97]	Ne
200 Hz – Kontrolė	+3,01	0,987	[-25,11 – 31,13]	Ne
1 kHz – 10 kHz	+2,37	0,999	[-72,02 – 76,76]	Ne
200 Hz – 10 kHz	–24,16	0,224	[-60,09 – 11,78]	Ne
200 Hz – 1 kHz	–26,53	0,633	[-99,80 – 46,75]	Ne

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Welch ANOVA analizė parodė, kad *Nitelliopsis obtusa* karotinoidų kiekis tarp skirtingų garso dažnių grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p > 0,05$). Nors kai kuriose grupėse (ypač 1 kHz ir 10 kHz) stebėtas didesnis vidutinis karotinoidų kiekis, šie skirtumai nepasiekė reikšmingumo ribos. Rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad garso poveikis karotinoidų sintezei galimai yra nežymus arba labai individualus, ir reikalingi papildomi tyrimai su didesniu imčių kiekiu.

15 paveikslas

Nitelliopsis obtusa karotinoidų koncentracijos priklausomybė nuo grupės veikiant garsu.



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Mūsų tyrimas nepatvirtino skirtumų tačiau yra duomenų, kad garso bangos gali paveikti augalų karotenoidų koncentraciją. Pavyzdžiui, tyrime, kuriame buvo tiriamas garso dažnio poveikis *Dunaliella salina* augimui ir beta-karoteno kiekiui, nustatyta, kad 200 Hz garso dažnis kartu su nitrato trūkumu padidino beta-karoteno kiekį 37% lyginant su kontrole (Keramati et al., 2021).

3.5 *Lepidium sativum* chlorofilo fluorescencijos parametru analizė (PAM fluorometras)

Normalumo įvertinimas

Norint pasirinkti tinkamą statistinį metodą, pirmiausia buvo patikrintas normalumo pasiskirstymas naudojant Shapiro-Wilk testą. Daugumos grupių duomenys neatitiko normalumo prielaidos ($p < 0,05$), todėl buvo pasirinktas neparametrinis metodas – Kruskal-Wallis ANOVA, kuris nereikalauja normalumo ir vienodų dispersijų.

Lentelė 9

Shapiro–Wilk normalumo testas PAM fluorometro duomenims.

Grupė	n	Statistinė reikšmė	p reikšmė	Sprendimas
Kontrolė	9	0,82988	0,04451	Atmestas normalumas
10 kHz	8	0,68421	0,00149	Atmestas normalumas
1 kHz	10	0,83041	0,03385	Atmestas normalumas
200 Hz	9	0,95755	0,77233	Normalumas patvirtintas

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Lentelė 10

Aprašomoji statistika

Grupė	n	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
Kontrolė (k)	9	0,652	0,741	0,766	0,788	0,799
10 kHz	8	0,649	0,761	0,784	0,796	0,801
1 kHz	10	0,716	0,771	0,781	0,792	0,809
200 Hz	9	0,646	0,674	0,741	0,778	0,808

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Kruskal-Wallis ANOVA rezultatai

Neparametrinis **Kruskal-Wallis ANOVA** testas neparodė statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių fluorescencijos parametro reikšmėse (Chi-square = 5,67, $p = 0,129$).

Lentelė 11

Kruskal-Wallis ANOVA duomenys

Testas	Chi-square	Laisvės laipsniai (DF)	p reikšmė
Kruskal-Wallis	5,67	3	0,129

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Fluorescencijos parametras tarp grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p > 0,05$).

Post-hoc analizė – Dunn's testas

Nors bendras Kruskal-Wallis rezultatas nebuvo reikšmingas, papildomai buvo atlikta porinių grupių palyginimų analizė naudojant **Dunn's testą**. Nė vienas iš porinių palyginimų nebuvo statistiškai reikšmingas (visos p reikšmės $> 0,18$).

Lentelė 12

Dunn's testo post hoc analizės rezultatai

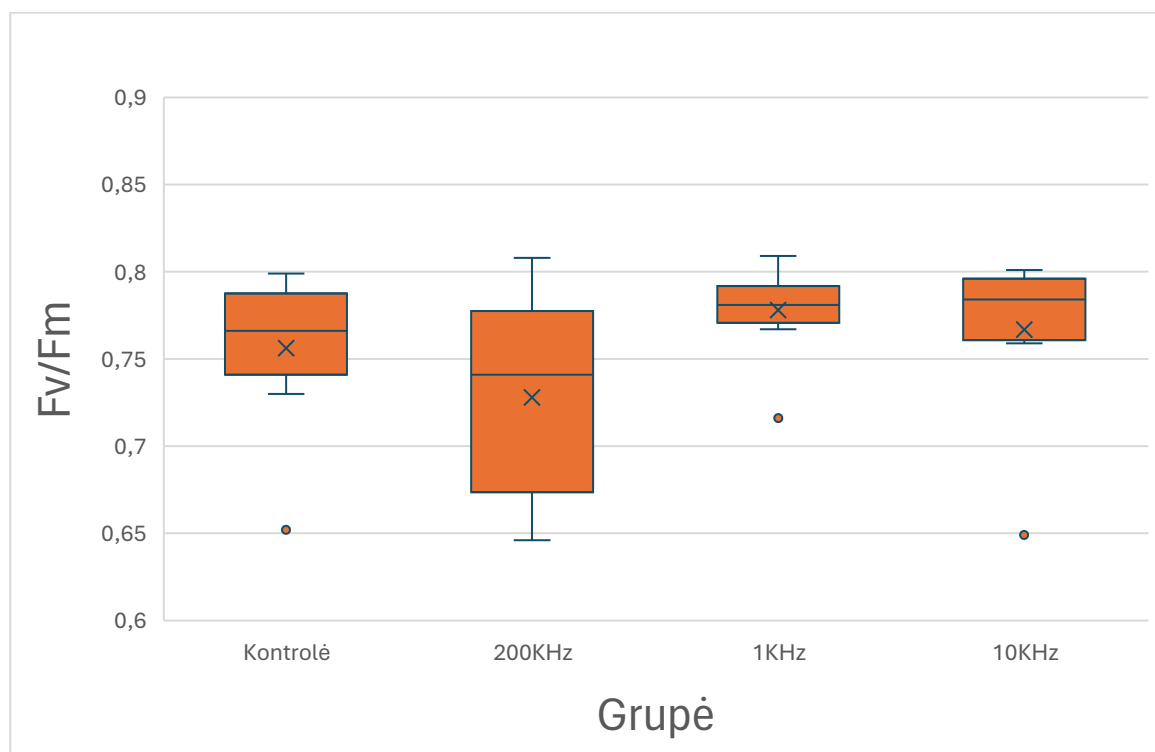
Palyginimas	Reikšmių skirtumas	Z reikšmė	p reikšmė	Reikšmingumas
Kontrolė – 10kHz	–4,92	–0,96	1,00	Ne
Kontrolė – 1kHz	–6,02	–1,24	1,00	Ne
Kontrolė – 200Hz	+4,39	+0,88	1,00	Ne
10kHz – 1kHz	–1,10	–0,22	1,00	Ne
10kHz – 200Hz	+9,31	+1,82	0,41	Ne
1kHz – 200Hz	+10,41	+2,15	0,19	Ne

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Nors *Lepidium sativum* augalams veikiant 1 kHz ir 10 kHz dažnio garsu buvo stebimos aukštesnės fluorescencijos reikšmės, šie pokyčiai **nebuvo statistiškai reikšmingi**. Fluorescencijos parametras reikšmingai nesiskyrė tarp skirtingų sąlygų, nors pastebima tendencija rodo galimą 1 kHz poveikį, kuris galėtų būti tiriamas išsamiau didesnių imčių tyrimuose.

16 paveikslas

Lepidium sativum Fv/Fm santykio priklausomybė nuo grupės veikiant garsu.



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

3.6 *Lepidium sativum* chlorofilo fluorescencijos parametras (PAM fluorometras), (pakartotinis eksperimentas)

Normalumo testas

Visų pirma buvo atlikta Shapiro-Wilk analizė, įvertinanti duomenų pasiskirstymo normalumą. Dviejose grupėse (kontrolė ir 10 kHz) buvo nustatyta reikšminga deviacija nuo normalumo ($p < 0,05$), todėl tolesnei analizei naudotas neparametrinis Kruskal-Wallis ANOVA metodas.

Lentelė 13

Shapiro–Wilk normalumo testas pakartotinio eksperimento PAM fluorometro duomenims.

Grupė	n	Statistinė reikšmė	p reikšmė	Sprendimas
Kontrolė	10	0,70281	0,00095	Atmestas normalumas
10 kHz	10	0,74604	0,00319	Atmestas normalumas
1 kHz	10	0,88150	0,13577	Normalumas patvirtintas
200 Hz	10	0,94510	0,61107	Normalumas patvirtintas

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Lentelė 14

Pakartotinio eksperimento aprašomoji statistika

Grupė	n	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
Kontrolė (k)	10	0,606	0,73125	0,751	0,774	0,777
10 kHz	10	0,480	0,67575	0,7395	0,768	0,779
1 kHz	10	0,613	0,679	0,699	0,770	0,772
200 Hz	10	0,581	0,652	0,718	0,748	0,783

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Kruskal-Wallis ANOVA rezultatai

Kruskal-Wallis ANOVA testas neparodė statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių ($\text{Chi-square} = 2,89$; $p = 0,41$), todėl negalima atmesti nulio hipotezės, kad visų grupių mediana yra ta pati.

Lentelė 15

Pakartotinio eksperimento Kruskal-Wallis ANOVA duomenys

Testas	Chi-square	DF	p reikšmė
Kruskal-Wallis	2,89	3	0,410

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Nėra statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių ($p > 0,05$).

Dunn's post-hoc testas

Post-hoc analizė (Dunn's testas) parodė, kad tarp jokių porinių palyginimų taip pat nebuvo reikšmingų skirtumų (visos p reikšmės $> 0,36$), nors kontrolės grupės reikšmės tendencingai buvo aukštesnės už 200 Hz grupę ($Z = 1,62$).

Lentelė 16

Pakartotinio eksperimento Dunn's testo post hoc analizės rezultatai

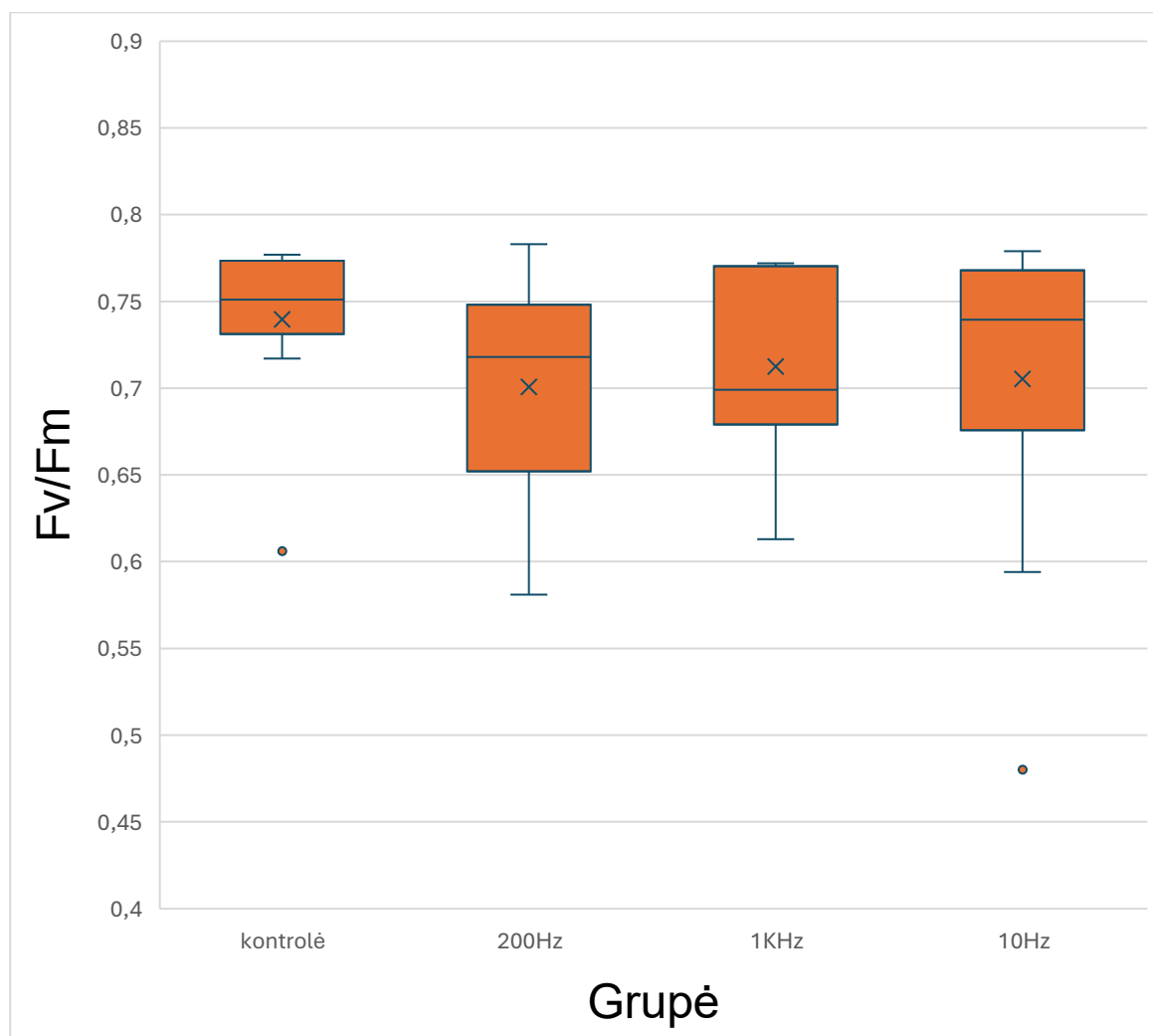
Palyginimas	Reikšmių skirtumas	Z reikšmė	p reikšmė	Reikšmingumas
Kontrolė – 10kHz	+4,60	+0,88	1,00	Ne
Kontrolė – 1kHz	+6,55	+1,25	1,00	Ne
Kontrolė – 200Hz	+8,45	+1,62	0,636	Ne
10kHz – 1kHz	+1,95	+0,37	1,00	Ne
10kHz – 200Hz	+3,85	+0,74	1,00	Ne
1kHz – 200Hz	+1,90	+0,36	1,00	Ne

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Antrajame fluorescencijos parametro vertinime PAM fluorometru statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių nenustatyta. Visgi galima pastebėti, kad kontrolinės grupės mediana buvo aukštesnė nei 200 Hz ir 1 kHz grupėse, tačiau šie skirtumai buvo per maži, kad būtų laikomi reikšmingais. Tokia tendencija galėtų būti įdomi gilesniam, didesnės apimties tyrimui.

17 paveikslas

*Pakartotinio eksperimento *Lepidium sativum* Fv/Fm santykio priklausomybė nuo grupės veikiant garsu*



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

3.7 *Lepidium sativum* šaknų ilgio duomenų analizė

Siekiant įvertinti skirtingų garso dažnių (10 kHz, 1 kHz ir 200 Hz) poveikį *Lepidium sativum* šaknų ilgiui, duomenys buvo surinkti trijose laiko atkarpose: po 3, 6 ir 9 dienų nuo eksperimentų pradžios. Kadangi kai kurių grupių duomenys neatitiko normalumo prielaidų (tai patvirtino Shapiro–Wilk testas, $p < 0,05$), statistinei analizei buvo taikytas neparametrinis Kruskal–Wallis testas.

3 diena

Duomenų normalumo testas parodė, kad 10 kHz grupėje reikšmingai nukrypta nuo normalumo ($p = 0,01489$), todėl naudotas Kruskal–Wallis testas, kuris neskyrė statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių ($\chi^2 = 1,344$; $p = 0,719$). Dunn post-hoc analizė taip pat neparodė reikšmingų skirtumų tarp jokių grupių porų (visos p reikšmės $> 0,05$).

6 diena

Normalumo testas atskleidė, kad 10 kHz, 1 kHz ir 200 Hz grupių duomenys reikšmingai nukrypo nuo normalumo ($p < 0,01$), todėl vėl naudotas Kruskal–Wallis testas. Šio testo rezultatai parodė, kad skirtumai tarp grupių nebuvo statistiškai reikšmingi ($\chi^2 = 0,894$; $p = 0,827$). Dunn post-hoc analizė neidentifikavo reikšmingų porinių skirtumų tarp jokios grupių kombinacijos.

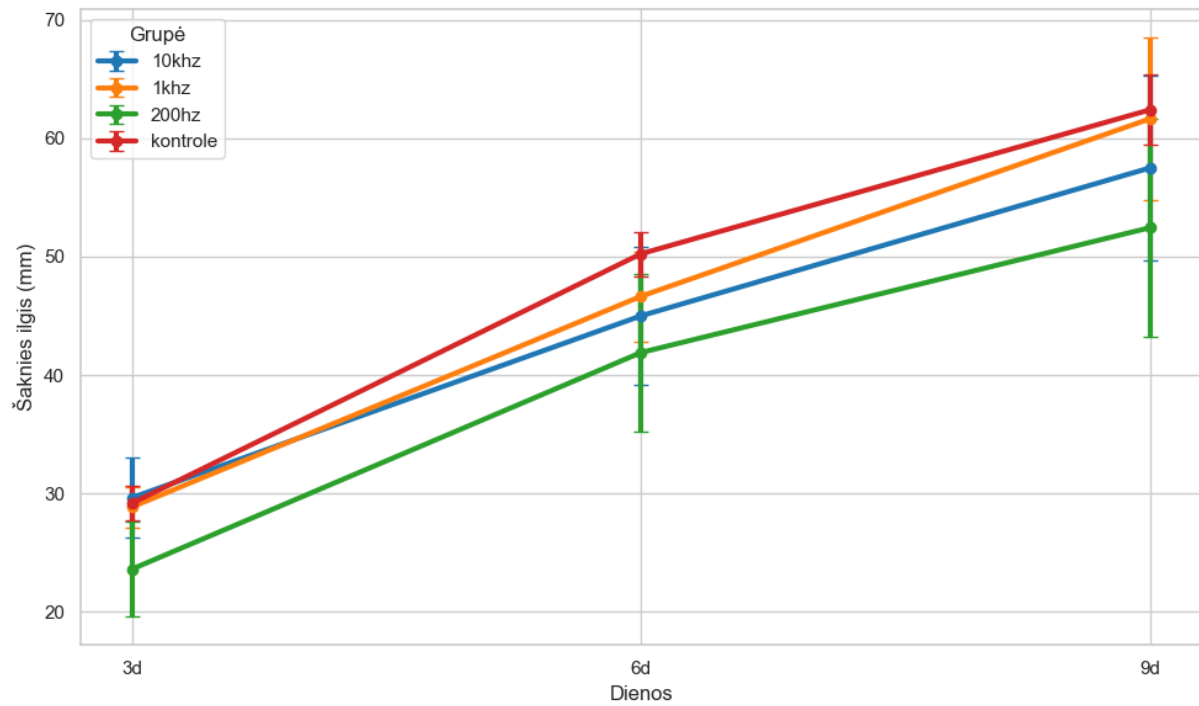
9 diena

Visos eksperimentinės grupės 9 dieną atitiko normalumo prielaidą ($p > 0,05$), tačiau siekiant užtikrinti rezultatų palyginamumą, analizė buvo atlikta vienodu būdu – taikant Kruskal–Wallis testą. Rezultatai parodė, kad nėra statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių ($\chi^2 = 0,353$; $p = 0,950$). Dunn testas taip pat neparodė reikšmingų skirtumų tarp dažnių porų.

Remiantis visų trijų laiko taškų analize, galima teigti, kad skirtingų garso dažnių poveikis *Lepidium sativum* šaknų ilgiui per tiriamą laikotarpį nebuvo statistiškai reikšmingas. Nors kai kuriose grupėse buvo pastebėtas didesnis skaitmeninis išsibarstymas ar mažesnės/aukštesnės reikšmės, bendras garso dažnių poveikis šaknų augimui nebuvo patvirtintas statistiniais metodais.

18 paveikslas

Lepidium sativum šaknų dydžio priklausomybė nuo augimo dienos veikiant garsu.



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

3.8 *Lepidium sativum* viršutinės dalies ilgio duomenų analizė

Norint įvertinti, ar skirtingi garso dažniai (10 kHz, 1 kHz, 200 Hz) turi įtakos *Lepidium sativum* viršūnių augimui, buvo atlikti eksperimentiniai matavimai po 3, 6 ir 9 dienų. Kadangi kai kuriose grupėse buvo užfiksuota nukrypimų nuo normalumo, statistinei analizei taikytas neparametrinis Kruskal–Wallis testas, o reikšmingumo atveju – Dunn post-hoc testas.

3 diena

Shapiro–Wilk testas parodė, kad visos grupės, išskyrus 200 Hz ($p = 0,0421$), atitiko normalumo prielaidą. Dėl to pasirinktas Kruskal–Wallis testas, kuris neskyrė statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių ($\chi^2 = 2,236$; $p = 0,525$). Dunn post-hoc analizė neidentifikavo reikšmingų porinių skirtumų tarp grupių (visos p reikšmės $> 0,05$).

6 diena

Tik 200 Hz grupė neatitiko normalumo prielaidų ($p = 0,0237$), todėl vėl buvo pasirinkta neparametrinė analizė. Kruskal–Wallis testas parodė, kad viršūnių ilgių skirtumai tarp dažnių yra statistiškai nereikšmingi ($\chi^2 = 1,196$; $p = 0,754$). Post-hoc analizė taip pat neatskleidė reikšmingų skirtumų tarp nė vienos grupių poros.

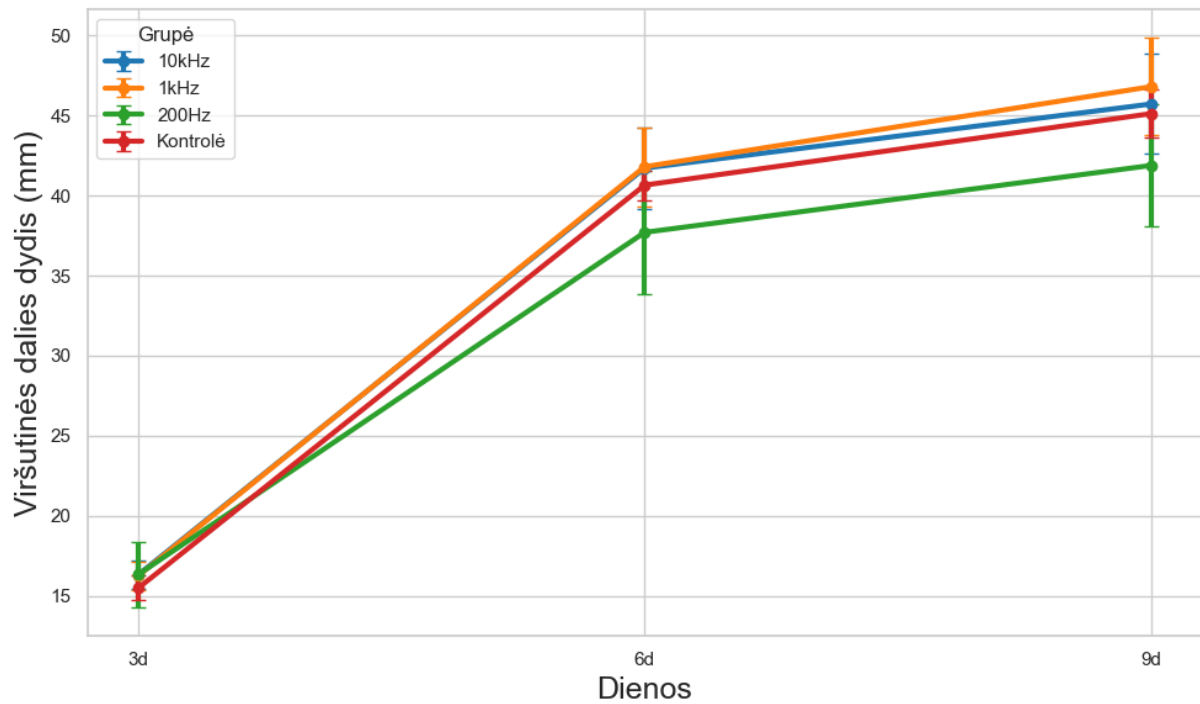
9 diena

Normalumo prielaidų neatitiko 10 kHz ($p = 0,025$) ir 200 Hz ($p = 0,019$) grupės. Kruskal–Wallis testas atskleidė, kad bendras viršūnių ilgių skirtumas tarp grupių nebuvo reikšmingas ($\chi^2 = 3,593$; $p = 0,309$). Dunn post-hoc testas taip pat neparodė reikšmingų skirtumų tarp porų (visos p reikšmės $> 0,05$).

Visų trijų laiko taškų duomenų analizė rodo, kad skirtingi garso dažniai neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos *Lepidium sativum* viršūnių ilgiui. Nors buvo pastebėti skaitmeniniai skirtumai tarp kai kurių grupių, jie nebuvo pakankami, kad būtų laikomi reikšmingais statistiniu požiūriu. Šie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad trumpalaikio poveikio metu tiriamų garso dažnių diapazone viršūnių augimas reikšmingai nesikeičia.

19 paveikslas

Lepidium sativum viršutinės dalies dydžio priklausomybė nuo augimo dienos veikiant garsu.



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

3.9 *Lepidium sativum* šaknų ir viršūnių augimo greičio analizė 3–6 dienų laikotarpiu

Vertinant pipirnių šaknų ir viršūnių augimo greičius 3–6 dienų laikotarpiu, buvo tiriamos keturios grupės: kontrolė, 200 Hz, 1 kHz ir 10 kHz.

Normalumo testas (Shapiro–Wilk)

- **Šaknys:** Visų grupių duomenys atitiko normalumo prielaidą ($p > 0,05$).
- **Viršūnės:** Visų grupių duomenys taip pat atitiko normalumo prielaidą ($p > 0,05$).

Lentelė 17

Šaknų augimo greičių (mm/d) 3–6 dienų laikotarpiu duomenų aprašomoji statistika

Grupė	N	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
Kontrolė	12	4,17	6,04	7,42	8,35	8,67
200 Hz	10	0,17	1,55	7,67	9,25	18,17
1 kHz	10	0,17	5,50	6,84	7,17	8,00
10 kHz	11	1,03	2,33	8,17	8,83	10,00

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Lentelė 18

Viršūnių augimo greičių (mm/d) 3–6 dienų laikotarpiu duomenų aprašomoji statistika

Grupė	N	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
Kontrolė	12	5,87	7,46	8,67	9,03	10,73
200 Hz	10	1,67	5,79	7,09	9,44	9,90
1 kHz	10	5,17	7,21	8,84	10,00	11,33
10 kHz	11	2,67	7,70	9,33	10,00	11,33

Statistinė analizė (Kruskal–Wallis ANOVA)

- Šaknys: augimo greičiai tarp grupių statistiškai nesiskyrė ($\chi^2(3) = 3,09$, $p = 0,378$).
- Viršūnės: augimo greičiai taip pat nesiskyrė ($\chi^2(3) = 3,00$, $p = 0,392$).

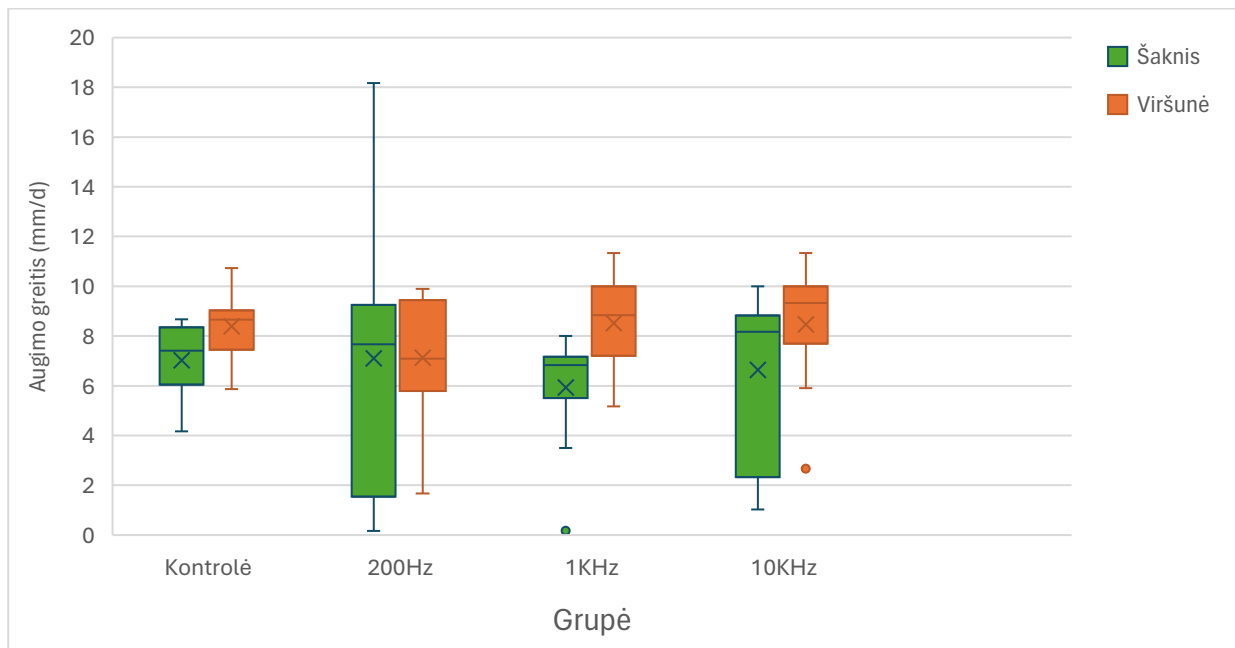
Post-hoc testas (Dunn testas)

- Po pagrindinės analizės Dunn testas nerodė reikšmingų skirtumų tarp grupių porų nei šaknų, nei viršūnių augimo greičiuose ($p > 0,05$).

3–6 dienų laikotarpiu *Lepidium sativum* šaknų ir viršūnių augimo greičiai keturiose grupėse (kontrolė, 200 Hz, 1 kHz, 10 kHz) statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Šaknų grupėje didžiausia mediana buvo 10 kHz dažnio grupėje (8,17 mm/d), o viršūnių – taip pat 10 kHz (9,33 mm/d), tačiau šie skirtumai nebuvo reikšmingi. Garso dažnių poveikis augimo greičiui 3–6 dienų laikotarpiu buvo nedaug išreikštas ir nepatvirtintas statistiškai.

20 paveikslas

Lepidium sativum 3–6 dienų augimo greičio (mm/d) priklausomybė nuo grupės veikiant garsu.



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

3.10 *Lepidium sativum* šaknų ir viršūnių augimo greičio analizė 6–9 dienų laikotarpiu

Atliekant augimo greičio tyrimą 6–9 dienų laikotarpiu, vertinti pipirnių šaknų ir viršūnių augimo greičiai keturiose grupėse: kontrolė, 200 Hz, 1 kHz ir 10 kHz.

Normalumo testas (Shapiro–Wilk)

- **Šaknys:** Kontrolės grupės duomenys atitiko normalumo prielaidą ($p = 0,116$), tačiau visų kitų grupių (200 Hz, 1 kHz, 10 kHz) duomenys neatitiko normalumo prielaidos ($p < 0,05$).
- **Viršūnės:** Visų grupių duomenys atitiko normalumo prielaidą ($p > 0,05$).

Lentelė 19

Šaknų augimo greičių (mm/d) 6–9 dienų laikotarpiu duomenų aprašomoji statistika

Grupė	N	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
Kontrolė	12	2,00	2,30	3,54	6,13	6,83
200 Hz	10	0,00	0,00	2,42	5,46	13,00
1 kHz	10	0,00	1,33	2,08	6,17	11,00
10 kHz	11	0,43	0,50	2,77	6,33	12,00

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Lentelė 18

Viršūnių augimo greičių (mm/d) 6–9 dienų laikotarpiu duomenų aprašomoji statistika

Grupė	N	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
Kontrolė	12	0,33	0,85	1,75	2,50	2,67
200 Hz	10	0,23	0,66	1,38	2,16	2,80
1 kHz	10	0,33	0,63	1,72	2,30	3,33
10 kHz	11	0,43	0,50	1,83	2,63	3,67

Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Statistinė analizė (Kruskal-Wallis ANOVA)

- Šaknų augimo greičiai skirtingose grupėse statistiškai nesiskyrė ($\chi^2(3) = 1,76$, $p = 0,623$).
- Viršūnių augimo greičiai skirtingose grupėse statistiškai nesiskyrė ($\chi^2(3) = 1,72$, $p = 0,633$).

Post-hoc testas (Dunn testas)

- Po pagrindinės analizės atliktas Dunn post-hoc testas neparodė statistiškai reikšmingų skirtumų tarp jokių porų tarp grupių nei šaknų, nei viršūnių augimo greičiuose (koreguotos p reikšmės $> 0,05$).

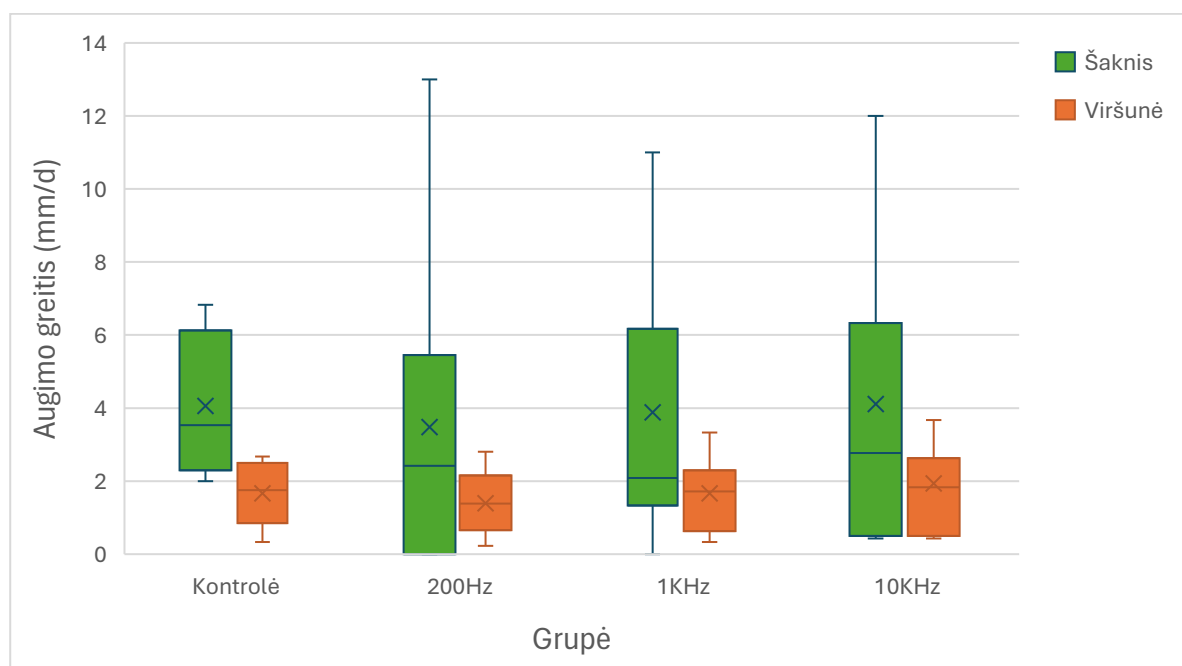
6–9 dienų laikotarpiu pipirnių šaknų ir viršūnių augimo greičiai skirtingose garso dažnių grupėse (200 Hz, 1 kHz, 10 kHz) statistiškai nesiskyrė nuo kontrolinės grupės.

Didžiausi medianiniai augimo greičiai šaknų grupėje buvo 10 kHz dažnio grupėje (2,77 mm/d), o viršūnių grupėje taip pat 10 kHz (1,83 mm/d), tačiau skirtumai nebuvo reikšmingi.

Bendras duomenų vaizdas rodo, kad garso dažnių poveikis 6–9 dienų laikotarpiu nebuvo reikšmingas nei pipirnių šaknų, nei viršūnių augimo greičiui.

21 paveikslas

Lepidium sativum 6–9 dienų augimo greičio (mm/d) priklausomybė nuo grupės veikiant garsu.



Šaltinis: parengta autoriaus, remiantis atliktu tyrimu

Išvados

- Sukurta eksperimentinė metodika buvo sėkmingai pritaikyta skirtingų dažnių garso (200 Hz, 1 kHz ir 10 kHz) poveikio *Lepidium sativum* ir *Nitellopsis obtusa* tyrimams.
- Garsas darė nežymų poveikį *Lepidium sativum* augimo greičiui, tačiau veikiant 10 kHz dažnio garsui stebėta ūglių augimą skatinanti tendencija.“
- Lyginant *Lepidium sativum* ūglių ilgius veikiant skirtingu garsu statistiškai reikšmingų skirtumų nestebėta.
- Fonotropizmo reakcija *Lepidium sativum* šaknims nebuvo nustatyta.
- Garsas neveikė *Nitelliopsis obtusa* chloroplastų morfologijos
- Chlorofilo a ir b koncentracija *Nitelliopsis obtusa* ląstelėse reikšmingai padidėjo veikiant 10kHz dažnio garsu, bet *Lepidium sativum* lapuose nepakito, taip pat nenustatytas karotenoidų koncentracijos pokytis abiejuose augaluose.
- *Lepidium sativum* fotosintezės efektyvumas veikiant garsu nepakito.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Martynas Lukošius

Bakalauro baigiamasis darbas

Garso poveikis *Lepidium sativum* ir *Nitellopsis obtusa* fiziologines ir morfologinėms savybėms

Santrauka

Šiame darbe buvo tirtas garso poveikis *Lepidium sativum* ir *Nitellopsis obtusa* augalų fiziologinėms, morfologinėms ir fotobiologinėms savybėms. Tyrimo tikslas – įvertinti, kaip skirtingo dažnio garsas (200 Hz, 1 kHz, 10 kHz) veikia augalų augimo parametrus, pigmentų koncentracijas ir antros fotosistemos efektyvumus.

Eksperimentams buvo sukurta metodika, leidžianti standartizuotai taikyti garsinius stimulus augalams augimo metu. Vertinant *Lepidium sativum*, buvo analizuojamas viršūnių ir šaknų augimo greitis ir antros fotosistemos efektyvumas kontrolinėmis sąlygomis ir po skirtingo dažnio garso poveikio. Abu augalai buvo vertinti pagal fotosistemos pigmentų koncentracijos pokyčius. Taip pat atliktas šaknų fonotropizmo stebėjimas ir chloroplastų morfologinis įvertinimas.

Rezultatai parodė, kad garsas neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio *Lepidium sativum* augimo greičiui, tačiau pastebėtos tam tikros augimo tendencijos, ypač veikiant aukšto dažnio (10 kHz) garsu. *Nitellopsis obtusa* atveju nustatyta, kad 10 kHz garsas reikšmingai padidino chlorofilo a ir b koncentraciją, kas rodo, kad garso dažnis gali paveikti fotosintetinių pigmentų kaupimąsi. Šaknų fonotropizmas nebuvo stebėtas, o chloroplastų išsidėstyme struktūrinių pokyčių neaptikta. Literatūros analizė patvirtina, kad garsas gali daryti įtaką augalų fotosintezei per Ca^{2+} kanalus bei H^{+} -ATPazės aktyvumą ir paveikti pigmentų sintezę.

Tyrimas parodė, kad nors garsas ne visada sukelia aiškius morfologinius pokyčius, jis gali turėti reikšmingą įtaką augalų fotobiologiniams procesams, priklausomai nuo dažnio.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Martynas Lukošius

Bachelor thesis

**Effects of sound on fiziological and morphological characteristics of
Lepidium sativum and *Nitellopsis obtusa***

Summary

This study investigated the effects of sound on the physiological, morphological, and photobiological characteristics of *Lepidium sativum* and *Nitellopsis obtusa* plants. The aim of the research was to evaluate how sound of different frequencies (200 Hz, 1 kHz, 10 kHz) affects plant growth parameters, pigment concentrations, and the efficiency of photosystem II.

An experimental methodology was developed to apply standardized acoustic stimuli to plants during their growth. In the case of *Lepidium sativum*, the growth rates of shoots and roots as well as the efficiency of photosystem II were analyzed under control conditions and after exposure to different sound frequencies. Both plant species were assessed for changes in photosynthetic pigment concentrations. Additionally, root phonotropism observations and morphological evaluation of chloroplasts were performed.

The results showed that sound did not have a statistically significant effect on the growth rate of *Lepidium sativum*, although certain growth trends were observed, particularly under high-frequency (10 kHz) sound exposure. In the case of *Nitellopsis obtusa*, it was found that 10 kHz sound significantly increased the concentrations of chlorophyll a and b, indicating that sound frequency can influence the accumulation of photosynthetic pigments. Root phonotropism was not observed, and no structural changes were detected in the distribution of chloroplasts. The literature review supports that sound may influence plant photosynthesis through Ca^{2+} channels and H^+ -ATPase activity and can affect pigment synthesis.

The study demonstrated that while sound does not always cause clear morphological changes, it can significantly impact plant photobiological processes depending on the frequency.

LITERATŪRA

1. Appel, H. M., & Cocroft, R. B. (2014). Plants respond to leaf vibrations caused by insect herbivore chewing. *Oecologia*, 175(4), 1257–1266. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-2995-6>
2. Behrouzian, F., Razavi, S. M. A., & Phillips, G. O. (2014). Cress seed (*Lepidium sativum*) mucilage, an overview. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 3(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.01.001>
3. Ben Farhat, M., Belhaj Amor, G., Beji-Seraïri, R., Selmi, S., Khammassi, S., Saidani-Tounsi, M., & Abdelly, C. (2023). Enhancement of nutritional quality and antioxidant properties of *Lepidium sativum* L. sprouts by salt treatment and domestic cooking.
 - a. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 32, 100736. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2023.100736>
4. Body, M. J. A., Neer, W. C., Vore, C., Lin, C.-H., Vu, D. C., Schultz, J. C., Cocroft, R. B., &
 - a. Appel, H. M. (2019). Caterpillar Chewing Vibrations Cause Changes in Plant
 - b. Hormones and Volatile Emissions in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*,
 - c. 10, 810. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00810>
5. Collins, M. E., & Foreman, J. E. K. (n.d.). *THE EFFECT OF SOUND ON THE GROWTH*
6. *OF PLANTS*.
7. Del Stabile, F., Marsili, V., Forti, L., & Arru, L. (2022). Is There a Role for Sound in Plants?
 - a. *Plants*, 11(18), 2391. <https://doi.org/10.3390/plants11182391>
8. Demidchik, V., Shabala, S., Isayenkov, S., Cuin, T. A., & Pottosin, I. (2018). Calcium transport across plant membranes: Mechanisms and functions. *New Phytologist*,
 - a. 220(1), 49–69. <https://doi.org/10.1111/nph.15266>
9. Francis, C. D., Kleist, N. J., Ortega, C. P., & Cruz, A. (2012). Noise pollution alters ecological services: Enhanced pollination and disrupted seed dispersal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1739), 2727–2735.

- a. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0230>
10. Frongia, F., Forti, L., & Arru, L. (n.d.). Sound perception and its effects in plants and algae.
 - a. *Plant Signaling & Behavior*, 15(12), 1828674.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1828674>
11. Gagliano, M., Grimonprez, M., Depczynski, M., & Renton, M. (2017). Tuned in: Plant roots use sound to locate water. *Oecologia*, 184(1), 151–160.
 - a. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3862-z>
12. Gagliano, M., Mancuso, S., & Robert, D. (2012). Towards understanding plant bioacoustics.
 - a. *Trends in Plant Science*, 17(6), 323–325.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.002>
13. Gagliano, M., Renton, M., Duvdevani, N., Timmins, M., & Mancuso, S. (2012). Out of Sight but Not out of Mind: Alternative Means of Communication in Plants. *PLoS ONE*,
 - a. 7(5), e37382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037382>
14. Hosny, H., Omran, N., & Handoussa, H. (2023). Nutritional supplement of *Lepidium sativum* L. seeds alleviates metabolic disorders and inflammatory responses in high-fat dietinduced obese rats via modulating AMPK/SREBP-1c of PPAR γ signaling pathway.
15. *Journal of King Saud University - Science*, 35(7), 102831.
 - a. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102831>
16. Ibrahim, M. M., Mounier, M. M., & Bekheet, S. A. (2023). Targeting apoptotic anticancer response with natural glucosinolates from cell suspension culture of *Lepidium sativum*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 53.
<https://doi.org/10.1186/s43141-023-00511-y>
17. Jeong, M.-J., Cho, J.-I., Park, S.-H., Kim, K.-H., Lee, S. K., Kwon, T.-R., Park, S.-C., & Siddiqui, Z. S. (n.d.). *SOUND FREQUENCIES INDUCE DROUGHT TOLERANCE IN RICE PLANT*.
18. Jeong, M.-J., Shim, C.-K., Lee, J.-O., Kwon, H.-B., Kim, Y.-H., Lee, S.-K., Byun, M.-O., &
 - a. Park, S.-C. (2008). Plant gene responses to frequency-specific sound signals.
 - b. *Molecular Breeding*, 21(2), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9122-x>
19. Kim, J.-Y., Lee, J.-S., Kwon, T.-R., Lee, S.-I., Kim, J.-A., Lee, G.-M., Park, S.-C., & Jeong, M.-J. (2015). Sound waves delay tomato fruit ripening by negatively regulating ethylene biosynthesis and signaling genes. *Postharvest Biology and Technology*, 110,

- a. 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.015>
20. Larkin, D. J., Monfils, A. K., Boissezon, A., Sleith, R. S., Skawinski, P. M., Welling, C. H., Cahill, B. C., & Karol, K. G. (2018). Biology, ecology, and management of starry stonewort (*Nitellopsis obtusa*; Characeae): A Red-listed Eurasian green alga invasive in North America. *Aquatic Botany*, 148, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2018.04.003>
21. Nomura, H., & Shiina, T. (2021). Chapter 20—Calcium transport systems in chloroplasts and mitochondria of plant cells. In S. K. Upadhyay (Ed.), *Calcium Transport Elements in Plants* (pp. 337–371). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821792-a.4.00023-0>
22. Pupkis, V., Buisas, R., Lapeikaite, I., & Kisnieriene, V. (2020). Using Plant Cells of *Nitellopsis obtusa* for Biophysical Education. *The Biophysicist*, 2(1), 18–29. <https://doi.org/10.35459/tbp.2019.000130>
23. Rodrigo-Moreno, A., Bazihizina, N., Azzarello, E., Masi, E., Tran, D., Bouteau, F., Baluska, F., & Mancuso, S. (2017). Root phonotropism: Early signalling events following sound perception in Arabidopsis roots. *Plant Science: An International Journal of*
24. *Experimental Plant Biology*, 264, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.08.001>
25. Rudd, J. J., & Franklin-Tong, V. E. (1999). Calcium signaling in plants. *Cellular and*
- a. *Molecular Life Sciences: CMLS*, 55(2), 214–232. <https://doi.org/10.1007/s000180050286>
26. Yi, J., Bochu, W., Xiujuan, W., Chuanren, D., & Xiaocheng, Y. (2003). Effect of sound stimulation on roots growth and plasmalemma H⁺-ATPase activity of chrysanthemum (*Gerbera jamesonii*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27(1), 65–69.
- a. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00037-1)
27. Zweifel, R., & Zeugin, F. (2008). Ultrasonic acoustic emissions in drought-stressed trees – more than signals from cavitation? *New Phytologist*, 179(4), 1070–1079.
- a. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02521.x>
28. Altuntas, H. O. and O. (2016). The Effect of Sound Waves at Different Frequencies upon the Plant Element Nutritional Uptake of Snake Plant (*Sansevieria Trifasciata*) Plants. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(48), 1–5. <https://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i48/54716>
29. Ghosh, R., Mishra, R. C., Choi, B., Kwon, Y. S., Bae, D. W., Park, S.-C., Jeong, M.-J., & Bae, H. (2016). Corrigendum: Exposure to Sound Vibrations Lead to Transcriptomic,

- Proteomic and Hormonal Changes in Arabidopsis. *Scientific Reports*, 6, 37484. <https://doi.org/10.1038/srep37484>
30. Hassanien, R. H., Hou, T., Li, Y., & Li, B. (2014). Advances in Effects of Sound Waves on Plants. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(2), 335–348. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60492-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60492-X)
 31. Jung, J., Kim, S.-K., Kim, J. Y., Jeong, M.-J., & Ryu, C.-M. (2018). Beyond Chemical Triggers: Evidence for Sound-Evoked Physiological Reactions in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 25. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00025>
 32. Keramati, A., Pajoum Shariati, F., Tavakoli, O., Akbari, Z., & Rezaei, M. (2021). The effect of audible sound frequency on the growth and beta-carotene production of *Dunaliella salina*. *South African Journal of Botany*, 141, 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.026>
 33. Wu, L., Yang, N., Guo, M., Zhang, D., Ghiladi, R. A., Bayram, H., & Wang, J. (2023). The role of sound stimulation in production of plant secondary metabolites. *Natural Products and Bioprospecting*, 13(1), 40. <https://doi.org/10.1007/s13659-023-00409-9>