مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال یازدهم، شماره دوم، پیاپی سی‌وششم، زمستان ۱۴۰۰ (۷۳-۶۳)

Crop Biotech.
Winter (2021) 11(2): 63-73. DOI: 10.30473/cb.2022.61147.1857

«مقاله پژوهشی»

تأثیر تنش فراصوت بر مقدار فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برگ و کالوس گیاه *Securigera securidaca* L.

منا فراجی هریس[۱]، محمدرضا واعظی کاخکی[۲*]، نسرین ملانیا[۳]، محمد آرمین[٤]

۱. دانشجوی دکتری رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار، ایران.

۲. استادیار، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران.

۳. دانشیار، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران.

٤. دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی سبزوار، سبزوار، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۰۷/۰۲ – تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۱۱/۲۸)

The effect of ultrasonic stress on the amount of total phenolic content and antioxidant activity in the *Securigera Securidaca* L. leaves and callus

Mona Faraji Heriss[1], Mohammad Reza Vaezi[2]*, Nasrin Mollania[3], Mohammad Armin[4]

1. Ph.D Student, Department of Agricultural Biotechnology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.
2. Assistant Professor of Plant Physiology and Genetics, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.
3. Associate Professor of Biochemistry, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.
4. Associate Professor, Department of Agronomy, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

(Received: Sep. 24, 2021 - Accepted: Feb. 28, 2022)

Abstract

Abiotic stress and callus formation can increase total phenolic content and antioxidant activity. The aim of this study was to increase the amount of total phenol and antioxidant activity in *Securigera securidaca* L. and its calli by ultrasonic stress in vitro conditions. The plants were grown in the greenhouse. Callus formation was performed with MS culture medium containing α-naphthalene acetic acid (2.2 mg/L) and 6-Benzylaminopurine (8.8 mg/L). Ultrasonic stress was applied to the main plants for 10, 20 and 30 minutes in 15 days in vitro conditions; in addition, the ultrasonic stress was applied to the calli for 10 minutes at the same time. The samples were collected on the first, fifth, tenth and fifteenth days. The samples were then dried in an oven, then their ethanolic extract was prepared. Total phenol content and antioxidant activity tests were performed by Folin-Ciocalteu and Wu methods respectively on the leaves of the main plant and its calli. The results showed that the amount of total phenol in the 30 minutes on the first day of ultrasonic treatment is higher than the control. In all treatments, antioxidant activity was reduced compared to the control sample. The highest amount of phenol was observed in calli in ultrasonic stress treatment on the 15th day. Antioxidant activity was reduced in calli under ultrasonic stress compared to the control sample. Therefore, it can be concluded that ultrasonic stress in the samples of this experiment increased the amount of phenolic but did not affect the antioxidant activity. Callus formation and ultrasonic stress also increase total phenol content simultaneously.

Keywords: abiotic stress, *Securigera securidaca*, secondary metabolism, ultrasonic stress

چکیده

تنش‌های غیر زیستی و کالوس‌زایی می‌توانند سبب افزایش ترکیبات فنلی شوند. هدف از این پژوهش افزایش مقدار فنل‌کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه دارویی عدس‌الملک (*Securigera securidaca*) و کالوس‌های حاصل از آن به‌وسیله تنش فراصوت، در شرایط درون آزمایشگاهی بود. گیاهان در گلخانه رشد کردند. کالوس‌زایی با محیط کشت MS حاوی ۲/۲ میلی‌گرم بر لیتر آلفا نفتالیک استیک اسید و ۸/۸ میلی‌گرم از ٦-بنزیل آمینو پورین انجام شد. تنش فراصوت بر روی گیاه اصلی به‌مدت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه و در طی ۱۵ روز، در شرایط درون آزمایشگاهی اعمال شد. تنش فراصوت بر روی کالوس به‌مدت ۱۰ دقیقه و به‌مدت ۱۵ روز صورت گرفت. نمونه‌ها در روزهای گوناگون (روز اول، پنجم، دهم و پانزدهم) جمع‌آوری شدند. سپس نمونه‌ها در آون خشک و عصاره اتانولی از آن‌ها تهیه شد. آزمون‌های تعیین مقدار فنل‌کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌وسیله روش‌های Folin-Ciocalteu و Wu بر روی برگ‌های گیاه اصلی و کالوس آن انجام شد. نتایج نشان دادند بیشترین مقدار فنل کل در گیاه در تنش فراصوت، در روز اول و تیمار ۳۰ دقیقه بود. در تمامی تیمارها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به نمونه شاهد کاهش یافته بود. بیشترین مقدار فنل‌کل در کالوس‌های در تیمار تنش فراصوت، در روز پانزدهم مشاهده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کالوس‌های در تنش فراصوت نسبت به نمونه کنترل کاهش یافت؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تنش فراصوت در نمونه‌های این آزمایش سبب افزایش مقدار فنل‌کل شد اما بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تأثیری نداشت. همچنین کالوس‌زایی و تنش فراصوت به‌طور هم‌زمان سبب افزایش مقدار فنل‌کل می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: تنش فراصوت، تنش غیرزیستی، عدس‌الملک، متابولیت‌های ثانویه.

* نویسنده مسئول: محمدرضا واعظی کاخکی
E-mail: vaezi@hsu.ac.ir

مقدمه

مصرف طولانی‌مدت داروهای شیمیایی ضد دیابتی اثرهای جانبی و مضری را بر بیماران می‌گذارد. بنابراین استفاده از گیاهان دارویی می‌تواند جایگزین مناسبی در این زمینه باشد. تحقیقات گوناگونی برای شناسایی و بررسی تأثیرگذاری منابع گیاهی مختلف در حال انجام است. ترکیبات مؤثر دارویی گیاهان، در متابولیت‌های ثانویه آن‌ها قرار دارد. بنابراین برای تولید صنعتی این مولکول‌های فیتوشیمیایی ارزشمند می‌توان از تکنیک‌هایی نظیر کشت بافت گیاهی و تنش‌های غیر زیستی کمک گرفت. هدف از انجام این آزمایش، افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاه دارویی عدس‌الملک به‌وسیله تنش فراصوت به‌عنوان یک تنش غیر زیستی و کالوس‌زایی به‌عنوان یک تکنیک کشت بافتی بود.

یکی از گیاهان مؤثر در درمان دیابت، گیاه عدس‌الملک یا گنده‌تلخه با نام علمی *Securigera securidaca* از خانواده *Fabaceae* می‌باشد. این گیاه به‌عنوان گیاه علفی یک‌ساله بومی آسیای غربی، اروپا، استرالیا و ایران به‌ویژه در استان‌های تهران و خوزستان معرفی می‌شود (افضل، ایمتیاز و الیامین، ۲۰۱۹). مطالعات نشان می‌دهد که سوسپانسیون حاصل از بذر این گیاه دارای اثر محافظتی در برابر افزایش قند خون ناشی از آلوکسان است و در طب سنتی برای پایین آوردن قند خون از آن استفاده می‌شود (جمشیدزاده، پاسداران و حیدری، ۲۰۱۸؛ توفیقی، سبزواری و رضایی طالقانی،۲۰۱۶؛ گراتائو، مونتریو و تزوتو، ۲۰۱۵).

ترکیبات مؤثر دارویی گیاهان، در متابولیت‌های ثانویه آنان قرار دارد. متابولیت‌های ثانویه ترکیبات آلی هستند که توسط قارچ‌ها، باکتری‌ها و گیاهان تولید می‌شوند. این ترکیبات برای رشد و نمو گیاه ضروری نیستند اما در مکانیسم‌های دفاعی گیاه و فرآیندهای سیگنالینگ آن در شرایط تنش‌های زنده و غیر زنده نقش مهمی را ایفا می‌کنند (ایسبیلیر و ساگیروکلو، ۲۰۱۳). تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان بسیار کم است. معمولاً استخراج این مواد از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست؛ بنابراین تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه به‌وسیله کشاورزی سنتی کافی نمی‌باشد (کابرا، سمانا و هیی، ۲۰۱۴). برای غلبه بر این محدودیت‌ها می‌توان از روش‌های آزمایشگاهی و بیوتکنولوژی مختلفی استفاده کرد. برای تولید صنعتی این مولکول‌های فیتوشیمیایی می‌توان از تکنیک‌هایی نظیر کشت بافت گیاهی و تنش‌های غیر زیستی کمک گرفت (رائو و راتود، ۲۰۱۵؛ یو، مینگ و لین، ۲۰۱۶). یکی از مزیت‌های روش کشت سلولی، مستقل بودن از تغییرات جغرافیایی و عوامل محیطی و در عین حال سرعت بالای رشد آن می‌باشد. در این روش ممکن است ترکیبات جدیدی تولید شود که در شرایط طبیعی در گیاه مادری وجود ندارد. محققین سعی می‌کنند با استفاده از این روش‌ها تولید این متابولیت‌های ثانویه باارزش گیاهی را افزایش دهند (کارتال، کونوکلوگیل و ایندرایانتو، ۲۰۰۴). به‌عنوان مثال تشکیل کالوس در گیاه *Teucrium polium* باعث افزایش محتوای فنل‌کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شده است (نامدئو، ۲۰۰۷).

همه تنش‌های غیر زنده مستقر در گیاه، ضرورتاً مضر نیستند. در برخی موارد در تعدادی از گونه‌های گیاهی، وقتی گیاهان در شرایط کنترل شده و در شرایط آزمایشگاهی رشد می‌کنند، این تنش‌ها می‌توانند مفید نیز واقع شوند. حتی می‌توان از الیسیتورهای غیر زیستی مکانیکی مانند، تنش فراصوت برای تحریک رشد و نمو نیز استفاده کرد (داسیلوا و دوبراسکی، ۲۰۱۴). به‌طور کلی استفاده از الیسیتورهای در مطالعات مربوط به زیست‌فناوری متابولیت‌های گیاهی، دو هدف اصلی را دنبال می‌کنند: ۱- بدست‌آوردن اطلاعات در زمینه مسیرهای بیوسنتزی که منجر به تشکیل و تنظیم متابولیت‌های ثانویه می‌شود ۲- افزایش تولید

متابولیت‌های ثانویه برای کاربرد تجاری (رابرتز و شولر، ۱۹۹۷). امواج صوتی که چه از محیط اطراف گیاه و چه به‌صورت طبیعی و یا به‌طور مصنوعی به گیاه اعمال می‌شوند، می‌توانند بر فرآیندهای مختلفی مانند جوانه‌زنی بذر، القای احتمالی سیستم آنتی‌اکسیدانی، تغییرات القا شده در پروتئین‌های محلول، محتوای قندی بافت‌های‌گیاهی، فعالیت ATPases پلاسما، افزایش تعداد سلول‌ها در مرحله S و تغییر پیشرفت چرخه سلولی و تغییرات رشد در شرایط آزمایشگاهی تاثیرگذار باشند. افزون بر این، گزارش شده است که سیگنال‌های صوتی باعث تغییر در بیان ژن نیز می‌شوند (داسیلوا و دوبراسکی، ۲۰۱۴؛ داسیلوا، هیوگی و گلیاس،۲۰۲؛ دوبروسکی، آسبوت و هوموکی، ۲۰۱۷؛ ورونا، بلاسکو و یسریل، ۲۰۱۹؛ زانون، داویس و مارکوئر ۲۰۱۴). فرایند استخراج ترکیبات فنلی در گیاهان دارویی از جمله موضوعاتی است که همواره مورد توجه دانشمندان بوده است. می‌دانیم که تنش فراصوت باعث افزایش ترکیبات فنلی و خواص آنتی‌اکسیدانی می‌شود (نیکولای، پررا و ویتور، ۲۰۱۶). همچنین این تنش سبب افزایش متابولیت‌های‌ثانویه در محصولات کشاورزی نظیر کاهو، توت‌فرنگی، بادام‌زمینی، گوجه‌فرنگی و جوانه گندم شده است (دینگ، دونگ و شانگ،۲۰۱۸؛ دینگ، هوو نمزر، ۲۰۱۸؛ یو، انگزت و فنگ، ۲۰۱۶؛ سایلس و رسورکسیون،۲۰۱۰؛ لو، دینگ و پارک، ۲۰۲۰). محققان در تحقیقات مختلفی ثابت کرده‌اند که تنش فراصوت، باعث القاء سیستم آنتی‌اکسیدانی در گیاهان می‌شوند (دوبراسکی، آسبوت و هوموکی، ۲۰۱۷؛ میشرا، گوش و بی، ۲۰۱۶). مطالعات گوناگونی در حال انجام است تا ارزیابی کند آیا محرک صدا می‌تواند به‌عنوان محرک رشد و یا به‌عنوان یک عامل تنش‌زا در گیاهان عمل کند و یا بسته به موع گونه گیاهی متفاوت است (وانگ، ژو و وانگ،۲۰۰۶). اگر هدف از کشت بافت گیاهی، تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای باشد، فراصوت می‌تواند باعث رهاشدن ترکیبات‌درون‌سلولی شده و در کشت سلول‌های گیاهی برای برداشت مداوم متابولیت‌های ثانویه مفید واقع شود. گزارش‌های مختلفی مبنی بر افزایش مقدار فنل‌کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های تیمار شده با امواج فراصوت وجود دارد (ردولف و رسوکسیون، ۲۰۰۵؛ رومینا، لنز و ویرکوتیت، ۲۰۰۹؛ سایلس و رسورکسیون، ۲۰۱۰).

با توجه به اثرات مثبت به‌کارگیری امواج فراصوت در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار ترکیبات فنلی، تاکنون مطالعه‌ای در مورد تغییرات خاصیت آنتی‌اکسیدانی توسط تنش فراصوت در گیاه عدس‌الملک و کالوس‌های حاصل از آن انجام نشده است. لذا در این مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار فنل‌کل بر روی عصاره آبی–الکلی گیاه اصلی و کالوس‌های تنش داده شده (فراصوت) گیاه *S. securidaca* اندازه‌گیری و مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

استانداردها و مواد شیمیایی

۲،۲–دی فنیل–۱–پیکریلیدرازیل رادیکال (DPPH)، فسفات سدیم، اسید گالیک و Folin-Ciocalteu از برند سیگما–آلدریچ تهیه شدند. کربنات سدیم پتاسیم (Na_2CO_3)، 6–بنزیل آمینو پورین (BAP) و اسید استیک α–نفتالین (NAA) از برند Merck استفاده شد. سایر مواد شیمیایی و حلال‌های استفاده شده دارای درجه آنالیتیکی بودند.

آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی

به‌منظور اندازه‌گیری ترکیبات فنلی و خواص آنتی‌اکسیدانی، بذر گیاه *S. securidaca* از هرباریوم دانشگاه حکیم سبزواری تهیه شد. بذرها در گلدان‌های بزرگ کاشته و به‌مدت ۶ هفته در گلخانه رشد کردند. در طول دوره رشد، گیاهان هر روز به‌طور منظم آبیاری شدند تا رطوبت مطلوب خاک حفظ شود. تنش فراصوت

طی ۱۵ روز با سیکل ۰/۹ و دامنه ۹۰٪ به‌مدت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه اعمال شد. سپس، نمونه‌ها (سه تکرار) در روزهای اول، پنجم، دهم و پانزدهم برداشت شدند. نمونه‌ها در اون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و تا زمان انجام آزمون‌های بیوشیمیایی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آماده‌سازی نمونه‌های کالوس

بذر گیاه عدس‌الملک از بازار محلی سبزوار خریداری شد. برای به‌دست آوردن نهال‌های استریل، بذرها با الکل ۷۰٪ به‌مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم (۵ درصد) به‌مدت ۸ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل شستشو شدند. بذرها به محیط کشت MS حاوی ۳٪ ساکارز به‌عنوان منبع کربن و آگار ۸٪ (وزنی / حجمی) انتقال یافتند. به‌منظور جوانه‌زنی به اتاق کشت با دمای ۲۳±۲ ^{o}C و ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. جوانه‌زنی بذر ۷ روز پس از کاشت آغاز شد و پس از رسیدن به جوانه‌ها به ارتفاع حدود ۴-۳ سانتی‌متر، ریزنمونه‌ها انتخاب شدند. به‌منظور کالوس‌زایی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد ۲/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۸/۸ میلی‌گرم بر لیتر BAP منتقل شدند. بعد از چهار هفته کالوس‌ها تشکیل شدند. تنش فراصوت با سیکل ۰/۹ و دامنه ۹۰٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه، در طی ۱۵ روز اعمال شد. سپس نمونه‌ها (سه تکرار) در روزهای اول، پنجم، دهم و پانزدهم برداشت شدند. نمونه‌ها در اون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و تا زمان انجام آزمون‌های بیوشیمیایی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج عصاره‌ها

روش استخراج عصاره الکلی بر پایه تحقیقات قبلی انجام شد (ورونا، بلاستو و بسریل،۲۰۱۹). نمونه‌های خشک شده خرد شدند و پودر گرانولی شکلی به‌دست آمد. ۰/۱ گرم پودر در یک میلی‌لیتر ویال قرار داده شد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪، به‌مدت ۱۵ دقیقه به روش فراصوت استخراج شد. محلول‌های به‌دست آمده به‌مدت ۲۰ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند.

اندازه‌گیری مقدار فنل‌کل

جهت اندازه‌گیری مقدار فنل‌کل از معرف فولین‌سیوکالتو استفاده شد (سینگلتون، اورتوفر و لاموئلا،۱۹۹۹). ۲/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین‌سیوکالتو با ۲ میلی‌لیتر از محلول Na_2CO_3 یک مولار مخلوط گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول هر عصاره گیاهی یا اسید گالیک به مخلوط اضافه شد. مخلوط‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از این مدت میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها در سه تکرار بررسی و منحنی استاندارد از محلول اسید گالیک تهیه گردید. مقدار فنل‌کل معادل میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک محاسبه شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

در این پژوهش تعیین فعالیت آنتی‌رادیکال (DPPH) بر اساس روش ویلیام و همکاران انجام گرفت (ویلیامز، کولیر و برست،۱۹۹۵). ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره با ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ مولار DPPH مخلوط گردید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط تاریکی قرار داده شد. پس از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان درصد فعالیت آنتی‌رادیکالی (RSA) از رابطه (۱) محاسبه گردید:

$$IP(\%) = \left(\frac{A0-AS}{A0}\right) * 100$$ رابطه (۱)

As:DPPH: جذب نمونه تیمار، حاوی محلول عصاره، A0: Blank: جذب نمونه.

طرح آزمایش

این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و گلخانه

پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار انجام شد. این بررسی به‌صورت دو آزمایش مجزا انجام شده که در آزمایش اول بر روی گیاه اصلی بود، طرح مورد استفاده فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی مدت تنش فراصوت (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه به همراه تیمار کنترل) و زمان اندازه‌گیری صفات مورد بررسی (روز اول، پنجم، دهم و پانزدهم) بودند و در مورد کالوس نیز طرح مورد استفاده فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی بود که در آن فاکتورهای مورد بررسی مدت تنش فراصوت (۱۰ دقیقه و تیمار کنترل) و زمان اندازه‌گیری صفات مورد بررسی (روز اول، پنجم، دهم و پانزدهم) بودند. پس از جمع‌آوری کلیه داده‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS ver 9.1 انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح آماری ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر تنش فراصوت بر شاخص خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه عدس‌الملک

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که مدت فراصوت، زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل مدت فراصوت و زمان نمونه‌برداری بر مقدار فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه عدس‌الملک اثر معنی‌داری دارند (جدول ۱).

جدول ۱. منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات مقدار فنل‌کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه اصلی

منابع تغییر	درجه آزادی	مقدار فنل‌کل	فعالیت آنتی‌اکسیدانی
مدت فراصوت (A)	۳	۱۱۴۸**	۶۱۲۰**
زمان نمونه‌برداری (B)	۳	۵۰۲۲**	۹۶۱۰**
A*B	۹	۹۱۵**	۱۸۲۴**
خطا	۳۲	۲۰/۳	۲/۵۷
ضریب تغییرات (٪)		۱۲/۹	۳/۰۱

*، ** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد و غیر معنی‌دار.

تأثیر تنش فراصوت بر مقدار فنل‌کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه عدس‌الملک

تغییرات مقدار فنل‌کل در گیاه عدس‌الملک در تنش فراصوت، در جدول ۱ نشان داده شده است. با افزایش مدت زمان تنش فراصوت در روز اول، افزایش معنی‌داری در مقدار فنل‌کل مشاهده شد. درباره اثرات بیوسنتزی امواج فراصوت در سلول گزارش‌هایی وجود دارد. تحقیقات مشابهی نیز افزایش متابولیت‌های ثانویه در محصولات کشاورزی‌ای نظیر کاهو، توت‌فرنگی، بادام‌زمینی، گوجه‌فرنگی و جوانه گندم را نشان می‌دهد (دینگ، هوو دونگ، ۲۰۱۸؛ دینگ، هوو نمزر، ۲۰۱۸؛ گانی، بابا و احمد، ۲۰۱۶؛ دینگ، پارک و فنگ،۲۰۲۰؛ سایلس و رسورکسیون،۲۰۱۰؛ یو، انگزت و فنگ،۲۰۱۶) که بیان‌کننده تأثیر مثبت این تنش است. تأثیر تنش فراصوت بر روی دانه‌های لوبیا و جوانه‌های حاصل از آن‌ها نشان‌داد که تنش فراصوت یک روش سبز و بی‌خطر برای تولید جوانه لوبیا غنی‌شده با ترکیبات فنلی است (آمپوفو و تگادی، ۲۰۲۰). همچنین این تنش سبب افزایش ترکیبات فنلی و خواص آنتی‌اکسیدانی در آناناس‌های انبار شده در سردخانه شد (ایوو عسگر، ۲۰۱۷). اما با افزایش روزهای تیمار، مقدار فنل‌کل روند نزولی پیدا کرد. از روز پنجم به بعد گیاهان در تنش، مقاومت خود را از دست دادند و خشک شدند. به‌طوری‌که در روز پانزدهم تنها نمونه شاهد باقی‌مانده بود. احتمالاً عامل آن مدت زمانی است که گیاه در معرض تنش فراصوت قرار گرفته است؛ زیرا امواج فراصوت با توجه به‌مدت زمان و شدت آن می‌توانند تأثیرات متفاوتی را ایجاد کنند. تنش فراصوت در شدت بالا و مدت زمان طولانی منجر به مرگ سلول می‌شوند. بنابراین گیاه نتوانسته مقاومت کند. پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات بعدی زمان تیمار و مقدار تابش تنش فراصوت کاهش یابد. همان‌طور که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود بیشترین مقدار فنل‌کل در روز اول و در تیمار ۳۰ دقیقه بود. در تحقیق مشابهی در گیاه رزماری، تنش فراصوت سبب افزایش قابل توجه مقدار

فنل‌کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های رزماری شد. جدول ۳ فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه عدس‌الملک در تنش فراصوت را نشان می‌دهد. برخلاف افزایش در مقدار فنل‌کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هر سه تیمار کاهش معنی‌داری را نشان داد. در روز پنجم گیاه در تیمار ۱۰ دقیقه بر تنش مقاومت کرده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی خودش را به شرایط عادی و مانند نمونه کنترل رساند. همان‌طور که در جدول ۲ دیده می‌شود مقدار فنل‌کل نیز در روز پنجم افزایش داشته است که نشان‌دهنده پاسخ مثبت گیاه به تنش است. نتایج مشابهی نیز در گوجه‌فرنگی صورت‌گرفت که نشان می‌داد میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به زمان می‌باشد (لو، دینگ و پارک، ۲۰۲۰). یعنی گیاه به زمان نیاز دارد تا بتواند ژن‌های مرتبط به تنش را بیان و پروتئین‌های مربوطه را برای مقابله با تنش تولید کند. همان‌طور که اشاره شد از روز پنج به بعد گیاهان در تنش مقاومت خود را از دست دادند و شروع به خشک شدن کردند. احتمالاً بازه طولانی تنش، عدم تحمل گیاه به این مقدار تنش و ایجاد حفره در دیواره سلولی و در نتیجه آسیب‌دیدگی دیواره سبب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده است. پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات بعدی از تنش‌های زیر ۱۰ دقیقه و با فرکانس‌های کمتر استفاده شود. همچنین از این روش می‌توان به‌صورت تلفیقی و مکمل به‌صورت هم‌زمان با تنش‌های دیگر نیز استفاده کرد.

جدول ۲. اندازه‌گیری مقدار فنل‌کل در گیاه عدس‌الملک در تنش فراصوت برحسب ppm

مدت فراصوت (دقیقه)	روز اول	روز پنجم	روز دهم	روز پانزدهم
گروه کنترل ۰	۵۰/۷۱^{bc}	۴۶/۷۰^{bc}	۴۶/۴۲^{bc}	۴۴/۳۸^{c}
۱۰	۵۲/۱۸^{ab}	۴۹/۳۳^{bc}	۵۰/۵۷^{bc}	۰^{d}
۲۰	۵۲/۹۵^{ab}	۵۱/۵۲^{abc}	۰^{d}	۰^{d}
۳۰	۵۸/۸۵^{a}	۵۱/۸۰^{abc}	۰^{d}	۰^{d}

جدول ۳. اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه عدس‌الملک در تنش فراصوت برحسب IP%

مدت فراصوت	روز اول	روز	روز	روز
(دقیقه)		پنجم	دهم	پانزدهم
گروه کنترل ۰	۸۷/۴۲^{a}	۸۴/۲۶^{b}	۸۱/۵۹^{c}	۷۵/۸۹^{d}
۱۰	۷۶/۲۶^{d}	۸۲/۸۵^{bc}	۸۴/۳^{b}	۰^{d}
۲۰	۷۰/۶۹^{e}	۷۵/۷۳^{d}	۰^{d}	۰^{d}
۳۰	۷۰/۸۵^{e}	۶۶/۴۲^{f}	۰^{d}	۰^{d}

تأثیر تنش فراصوت بر شاخص خواص آنتی‌اکسیدانی در کالوس گیاه عدس‌الملک

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که مدت فراصوت، زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل مدت فراصوت و زمان نمونه‌برداری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کالوس گیاه عدس‌الملک اثر معنی‌داری دارند در حالی‌که مقدار فنل‌کل تنها تحت تأثیر زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل مدت فراصوت و زمان نمونه‌برداری قرار گرفت (جدول ۴).

جدول ۴. منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات مقدار فنل‌کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کالوس گیاه عدس‌الملک

منابع تغییر	درجه آزادی	مقدار فنل‌کل	فعالیت آنتی‌اکسیدانی
مدت فراصوت (A)	۱	۱/۵۷ns	۴۰/۹**
زمان نمونه‌برداری (B)	۳	۴۷۱**	۳۰/۲**
A*B	۳	۶۷۵**	۳۲/۶**
خطا	۱۶	۱/۲۹	۱/۱۵
ضریب تغییرات (٪)		۳/۴۰	۱/۶۸

*، ** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد و غیر معنی‌دار.

تأثیر تنش فراصوت بر مقدار فنل‌کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کالوس گیاه عدس الملک

همان‌طور که در جدول ۵ آمده است، گیاهان در تنش فراصوت در تیمار ۲۰ و ۳۰ دقیقه از روز پنجم به بعد مقاومت خود را از دست دادند، بنابراین بهترین تیمار ۱۰ دقیقه در نظر گرفته و بر روی کالوس‌ها اعمال شد. برخلاف گیاه اصلی، با افزایش روز تنش، مقدار فنل‌کل در کالوس‌های در تنش افزایش معناداری را نشان دادند. به‌طوری‌که بیشترین مقدار فنل‌کل در روز پانزدهم بود. می‌دانیم که تنش‌های غیر زیستی تأثیرات مثبتی را بر روی مقدار متابولیت‌های ثانویه

می‌گذارد. به‌عنوان مثال تنش‌های غیر زیستی سبب افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی و فنل‌کل در گیاه خاکستر اروپایی شد (ناوروت، سولکواسکا و اوسمندا، ۲۰۲۲). این تنش نیز مانند تنش‌های غیر زیستی دیگر مانند فلزات سنگین، UV و دما سبب افزایش فنل‌کل شد (پهلیوان کاراکاس، ساهین و تورکن، ۲۰۲۲). متأسفانه تحقیقات جدیدی درباره تأثیر فراصوت به‌عنوان یک تنش غیر زیستی انجام نشده است. بنابراین توصیه می‌گردد در تحقیقات بعد از این تنش سبز بیشتر استفاده شود.

در اغلب تحقیقات جدید از فراصوت به‌عنوان یک روش استخراجی نوین استفاده شده است که سبب استخراج بهتر ترکیبات فنلی و مواد آنتی‌اکسیدانی می‌شود. برای نمونه در گیاهان پالپ *Ziziphus joazeiro* M، کین‌کلیبا و سالویلا، این روش استخراجی سبب افزایش ترکیبات فنلی و خواص آنتی‌اکسیدانی شد (روشا، لیما و سیلوا، ۲۰۲۲؛ زنو، پاشازاده و ابراهیم، ۲۰۲۲؛ ابوالقاضی، باکور و فادیل، ۲۰۲۲). در این پژوهش نیز برای استخراج از این روش استفاده شد. در این در حالی بود که مقدار فنل‌کل در نمونه‌های کنترل روند نزولی را داشت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تیمار فراصوت تأثیر مثبتی را داشته است. دلیل آن این است که این امواج شرایط تنش‌زا را برای سلول‌های گیاهی القا کرده و موجب تقویت سازوکارهای دفاعی شده است. اعمال امواج فراصوت در مدت زمان کم تغییرات زیستی مفید و قابل بازگشتی را در سلول و بافته‌ای گیاهی ایجاد می‌کنند (افخمی، زارع و اصغری، ۲۰۲۰). اعمال امواج فراصوت باعث افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌شود که این فرایند بخشی از پاسخ دفاعی سلول‌ها است (افخمی، زارع و اصغری، ۲۰۲۰).

نتایج مشابهی در تحقیقات گذشته به‌دست آمده است. امواج فراصوت باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی در بادام‌زمینی شد (سایلس و رسورکسیون، ۲۰۱۰). وو و لین در سال ۲۰۰۲ بیان کردند که فراصوت باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی در کشت سلولی گیاه جینسینگ شد. وو و لین نیز بیان کرده بودند که تیمار کوتاه مدت با امواج فراصوت با انرژی کم سبب افزایش بیوسنتز متابولیت‌های‌ثانویه ارزشمند می‌شود (وو و لین، ۲۰۰۲). همچنین رضایی و همکاران در ۲۰۱۱ (رضایی، قناتی و بهمنش، ۲۰۱۱) مشاهده کردند که در کالوس‌های به‌دست آمده از دانه فندق که در معرض امواج فراصوت قرار گرفته بودند، مقدار ترکیبات فنلی افزایش داشت. در جدول شماره ۶ فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داده شده است، فعالیت آنتی‌اکسیدانی طی تنش فراصوت تا روز دهم کاهش یافت. اما در روز پانزدهم فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. بیشترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گروه کنترل روز دهم می‌باشد؛ بنابراین کالوس‌زایی و تنش اعمال شده نتوانسته است فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد. نتایج مشابهی در تحقیقات قبلی وجود دارد. گزارش شده‌است که افزایش مدت زمان تیمار سلول‌های برنج با امواج فراصوت همراه با کاهش رشد و زنده‌مانی سلول‌ها بوده است (وو و لین، ۲۰۰۳).

لیو و همکاران (لیو، یوشیکوشی و وانگ، ۲۰۰۳) نیز مشاهده نمودند که تابش فراصوت به سلول‌های گیاه سرخدار (*Taxus yyunanensis*) سبب کاهش چشمگیر درصد زنده‌مانی سلول‌ها شد. دلیل آن به احتمال این می‌باشد که به‌کارگیری فراصوت در کشت‌سلولی سبب ایجاد وقایع هیدرودینامیک پرانرژی نظیر حفره‌زایی آکوستیک و جریانات میکروسکوپی می‌شود که منجر به آسیب‌های مکانیکی و تنش برشی (shear stress) سلول‌ها و تأثیر منفی بر رشد آن‌ها می‌گردد (وو و لین، ۲۰۰۳). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت تأثیرات مثبت یا منفی امواج فراصوت در این پژوهش ممکن است به‌دلیل افزایش نفوذپذیری غشا باشد.

جدول ۵. اندازه‌گیری مقدار فنل‌کل در کالوس‌های در تنش فراصوت برحسب ppm

مدت فراصوت (دقیقه)	روز اول	روز پنجم	روز دهم	روز پانزدهم
گروه کنترل ۰	۵۱/۱۴^{b}	۲۷/۵۵^{e}	۲۰/۶۸^{g}	۳۵/۲۴^{c}
۱۰	۲۱/۹۱^{g}	۲۴/۲۷^{f}	۳۲/۵۷^{d}	۵۳/۸۱^{a}

جدول ۶. اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کالوس‌های در تنش فراصوت برحسب IP%

مدت فراصوت (دقیقه)	روز اول	روز پنجم	روز دهم	روز پانزدهم
گروه ۰	۶۰/۱۶^{cd}	۶۶/۳۱^{a}	۶۷/۵۳^{a}	۶۵/۹۹^{a}
۱۰	۶۳/۵۱^{b}	۶۱/۲۶^{c}	۶۶/۱۱^{a}	۵۸/۶۶^{d}

تنش‌های غیر زیستی مکانیکی مانند امواج فراصوت به‌عنوان یک فناوری نوین غیر حرارتی، محرک فیزیکی بی‌خطر و ارزان قیمتی است که ضمن تحریک سنتز متابولیت‌های ثانویه، تأثیرات نامطلوب الیسیتورهای شیمیایی را ندارد. کالوس‌زایی نیز باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه می‌شود. تنش فراصوت به‌عنوان تنشی غیر زیستی که در نوع و مقدار ترکیبات خاک تأثیر چندانی ندارد می‌تواند به‌عنوان یک تنش غیر زیستی ارزان و سریع برای افزایش مقدار فنل‌کل در شرایط آزمایشگاهی و تولید گیاهان دارویی در شرایط اسپتیک استفاده شود. کالوس‌زایی و اعمال تنش فراصوت بر روی گیاه *S.securidaca* توانست مقدار فنل‌کل را به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات بعدی از تیمارهایی با فرکانس و مدت کمتر استفاده شود. همچنین با توجه به اینکه تحقیقات زیادی در رابطه تیمار با این نوع تنش در کالوس گیاهان دارویی زیاد صورت نگرفته است، بررسی این تنش بر روی گونه‌های دیگر نیز مفید می‌باشد.

REFERENCES

Aboulghazi, A., Bakour, M., Fadil, M., & Lyoussi, B. (2022). Simultaneous Optimization of Extraction Yield, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Moroccan Propolis Extracts: Improvement of Ultrasound-Assisted Technique Using Response Surface Methodology. *Processes*,10(2),297-313.

Afkhami, F., Zare, N., Asghari-Zakaria, R., & Mehdizadeh, M. (2020). The Effects of Ultrasound, Temperature, Light, Chitosan and Plant Growth Regulators on Callus Induction in Saffron (*Crocus sativus* L.). *Saffron Agronomy & Technology*, *8*(3), 361-375. (in Persian)

Afzal, J., Hu, C., Imtiaz, M., Elyamine, A., Rana, M., Imran, M., & Farag, M. (2019). Cadmium tolerance in rice cultivars associated with antioxidant enzymes activities and Fe/Zn concentrations. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *16*(8), 4241-4252.

Ampofo, J. O., & Ngadi, M. (2020). Ultrasonic assisted phenolic elicitation and antioxidant potential of common bean (Phaseolus vulgaris) sprouts. *Ultrasonics Sonochemistry*,64, 974-104.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

da Rocha, T. S., de Lima, A., Silva, J. d. N., Sampaio, G.R., Soares Freitas, R. A. M., Danielski, R.,.. . Torres, E.A.F.d.S. (2022). Vitamin C and Phenolic Antioxidants of Jua (*Ziziphus joazeiro* M.) Pulp: A Rich Underexplored Brazilian Source of Ellagic Acid Recovered by Aqueous Ultrasound-Assisted Extraction. *Molecules*, 27(3), 627-637

da Silva, J. A. T., & Dobránszki, J. (2014). Sonication and ultrasound: impact on plant growth and development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 117(2), 131-143.

da Silva, J. A. T., Hidvégi, N., Gulyás, A., Tóth, B., & Dobránszki, J. (2020). Transcriptomic response of in vitro potato (*Solanum tuberosum* L.) to piezoelectric ultrasound. *Plant Molecular Biology Reporter*, 38(3), 404-418.

Ding, J., Hou, G. G., Dong, M., Xiong, S., Zhao, S., & Feng, H. (2018). Physicochemical properties of germinated dehulled rice flour and energy requirement in germination as affected by ultrasound treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*,41, 484-491.

Ding, J., Hou, G. G., Nemzer, B. V., Xiong, S., Dubat, A., & Feng, H. (2018). Effects of controlled germination on selected physicochemical and functional properties of whole-wheat flour and enhanced γ-aminobutyric acid accumulation by ultrasonication. *Food Chemistry*, 243, 214-221.

Dobránszki, J., Asbóth, G., Homoki, D., Bíró-Molnár, P., da Silva, J. A. T., & Remenyik, J. (2017). Ultrasonication of in vitro potato single node explants: activation and recovery of antioxidant defence system and growth responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 121, 153-160.

Gani, A., Baba, W. N., Ahmad, M., Shah, U., Khan, A. A., Wani, I. A.,.. . Gani, A. (2016). Effect of ultrasound treatment on physico-chemical, nutraceutical and microbial quality of strawberry. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 496-502.

Ghori, N.-H., Ghori, T., Hayat, M., Imadi, S., Gul, A., Altay, V., & Ozturk, M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. *International journal of Environmental Science and Technology*, 16(3), 1807-1828.

Gratão, P. L., Monteiro, C. C., Tezotto, T., Carvalho, R. F., Alves, L. R., Peters, L. P., & Azevedo, R. A. (2015). Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. *BioMetals*, 28(5), 803-816.

Hassanien, R. H., Hou, T. Z., Li, Y. F., & Li, B. M. (2014). Advances in effects of sound waves on plants. Journal of Integrative Agriculture, 13(2), 335-348.

Isbilir, S. S., & Sagiroglu, A. (2013). Total phenolic content, antiradical and antioxidant activities of wild and cultivated *Rumex acetosella* L. extracts. *Biological agriculture & horticulture*, 29(4), 219-226.

Jamshidzadeh, A., Pasdaran, A., & Heidari, R. (2018). Pharmacognostic and anti-inflammatory properties of Securigera securidaca seeds and seed oil. *Research Journal of Pharmacognosy*, 5(3), 31-39. (in Persian)

Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J Pharm Pharmacol*, 2, 377-392.

Karakas, F. P., Sahin, G., Turker, A. U., & Verma, S. K. (2022). Impacts of heavy metal, high temperature, and UV radiation exposures on *Bellis perennis* L. (common daisy): Comparison of phenolic constituents and antioxidant potential (enzymatic and non-enzymatic). *South African Journal of Botany*, 147, 370-379.

Kartal, M., Konuklugil, B., Indrayanto, G., & Alfermann, A. (2004). Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin in Linum species. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 35(3), 441-447.

Liu, Y., Yoshikoshi, A., Wang, B., & Sakanishi, A. (2003). Influence of ultrasonic stimulation on the growth and proliferation of *Oryza sativa* Nipponbare callus cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,27(4),287-293.

Lu, C., Ding, J., Park, H. K., & Feng, H. (2020). High intensity ultrasound as a physical elicitor affects secondary metabolites and antioxidant capacity of tomato fruits. *Food Control*, 113,

107176.

Mishra, R. C., Ghosh, R., & Bae, H. (2016). Plant acoustics: in the search of a sound mechanism for sound signaling in plants. *Journal of experimental botany*, 67(15), 4483-4494.

Namdeo, A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev*, 1(1), 69-79.

Nicolai, M., Pereira, P., Vitor, R. F., Reis, C. P., Roberto, A., & Rijo, P. (2016). Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants. *Measurement*, 89, 328-332.

Rao, P. R., & Rathod, V. K. (2015). Mapping study of an ultrasonic bath for the extraction of andrographolide from Andrographis paniculata using ultrasound. *Industrial Crops and Products*, 66, 312-318.

Rezaei, A., Ghanati, F., Behmanesh, M., & Mokhtari-Dizaji, M. (2011). Ultrasound-potentiated salicylic acid–induced physiological effects and production of taxol in hazelnut (Corylus avellana L.) cell culture. *Ultrasound in medicine & biology*, 37(11), 1938-1947.

Roberts, S. C., & Shuler, M. L. (1997). Large-scale plant cell culture. *Current opinion in Biotechnology*, 8(2),154-159.

Rokhina, E. V., Lens, P., & Virkutyte, J. (2009). Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in biotechnology*, 27(5), 298-306.

Rudolf, J. R., & Resurreccion, A. V. (2005). Elicitation of resveratrol in peanut kernels by application of abiotic stresses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10186-10192.

Sales, J. M., & Resurreccion, A. V. A. (2010). Phenolic profile, antioxidants, and sensory acceptance of bioactive-enhanced peanuts using ultrasound and UV. *Food Chemistry*, 122(3), 795-803.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.

Tofighi, Z., Sabzevari, O., Rezaei Taleqani, Z., & Yassa, N. (2016). Investigation of securigera securidaca seeds extract and different fractions on serum glucose, blood factors and liver morphology in diabetic animals. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 18(1), 37-45. (*in Persian*)

Wang, B., Zhou, J., Wang, Y., Zhu, L., & Teixeira da Silva, J. (2006). Physical stress and plant growth. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*, 2, 68-85.

Wrona, M., Blasco, S., Becerril, R., Nerin, C., Sales, E., & Asensio, E. (2019). Antioxidant and antimicrobial markers by UPLC®–ESI-Q-TOF-MSE of a new multilayer active packaging based on Arctostaphylos uva-ursi. *Talanta*, 196, 498-509.

Wu, J., & Lin, L. (2002). Ultrasound-Induced Stress Responses of Panax ginsengCells: Enzymatic Browning and Phenolics Production. *Biotechnology Progress*, 18(4), 862-866.

Wu, J., & Lin, L. (2003). Enhancement of taxol production and release in Taxus chinensis cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction. *Applied microbiology and biotechnology*, 62(2), 151-155.

Yeoh, W. K., & Ali, A. (2017). Ultrasound treatment on phenolic metabolism and antioxidant capacity of fresh-cut pineapple during cold storage. *Food Chemistry*, 216, 247-253.

Yu, J., Engeseth, N. J., & Feng, H. (2016). High Intensity Ultrasound as an Abiotic Elicitor-Effects on Antioxidant Capacity and Overall Quality of Romaine Lettuce. *Food and Bioprocess Technology*, 9(2), 262-273.

Yue, W., Ming, Q.-l., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C.-J., Han, T., & Qin, L.-p.

(2016). Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 215-232.

Zannou, O., Pashazadeh, H., Ibrahim, S. A., Koca, I., & Galanakis, C. M. (2022). Green and Highly Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity from Kinkeliba (Combretum micranthum G. Don) by Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs) using Maceration, Ultrasound-assisted Extraction and Homogenate-assisted Extraction. *Arabian Journal of Chemistry*, 103752.

Zanon, M., Davis, B. A., Marquer, L., Brewer, S., & Kaplan, J. O. (2018). European forest cover during the past 12,000 years: a palynological reconstruction based on modern analogs and remote sensing. *Frontiers in plant science*, *9*, 253.