

## «مقاله پژوهشی»

تأثیر تنش فراصوت بر مقدار فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی در برگ و کالوس گیاه  
*Securigera securidaca* L.منا فراجی هریس<sup>۱</sup>، محمدرضا واعظی کاخکی<sup>۲\*</sup>، نسرین ملانیا<sup>۳</sup>، محمد آرمین<sup>۴</sup>

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.

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۸)

The effect of ultrasonic stress on the amount of total phenolic content and antioxidant activity in the *Securigera Securidaca* L. leaves and callusMona Faraji Heriss<sup>1</sup>, Mohammad Reza Vaezi<sup>2\*</sup>, Nasrin Mollania<sup>3</sup>, Mohammad Armin<sup>4</sup>

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  $\alpha$ -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 فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی 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 اسید و ۸/۸ میلی‌گرم از ۶-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 فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی نسبت به نمونه شاهد کاهش یافته بود. بیشترین مقدار فنل کل در کالوس‌های در تیمار تنش فراصوت، در روز پانزدهم مشاهده شد. فعالیت آنتی اکسیدانی 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 فنل کل شد اما بر فعالیت آنتی اکسیدانی تأثیری نداشت. همچنین کالوس‌زایی و تنش فراصوت به‌طور هم‌زمان سبب افزایش مقدار فنل کل می‌گردد.

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

## مقدمه

مصرف طولانی مدت داروهای شیمیایی ضد دیابتی اثرهای جانبی و مضر را بر بیماران می گذارد. بنابراین استفاده از گیاهان دارویی می تواند 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 متابولیت های ثانویه آن ها قرار دارد. بنابراین برای تولید صنعتی این مولکول های فیتوشیمیایی ارزشمند می توان از تکنیک هایی نظیر کشت بافت گیاهی و تنش های غیر زیستی کمک گرفت. هدف از انجام این آزمایش، افزایش متابولیت های ثانویه در گیاه دارویی عدس الملک به وسیله تنش فراصوت به عنوان یک تنش غیر زیستی و کالوس زایی به عنوان یک تکنیک کشت بافتی بود.

یکی از گیاهان مؤثر در درمان دیابت، گیاه عدس الملک یا گنده تلخه با نام علمی *Securigera securidaca* از خانواده *Fabaceae* می باشد. این گیاه به عنوان گیاه علفی یک ساله بومی آسیای غربی، اروپا، استرالیا و ایران به ویژه در استان های تهران و خوزستان معرفی می شود (افضل، ایمتیاز و الیامین، ۲۰۱۹). مطالعات نشان می دهد 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 می شود (جمشیدزاده، پاسداران و حیدری، ۲۰۱۸؛ توفیقی، سبزواری و رضایی طالقانی، ۲۰۱۶؛ گراتائو، مونتریو و تروتو، ۲۰۱۵).

ترکیبات مؤثر دارویی گیاهان، در متابولیت های ثانویه آنان قرار دارد. متابولیت های ثانویه ترکیبات آلی هستند که توسط قارچ ها، باکتری ها و گیاهان تولید می شوند. این ترکیبات برای رشد و نمو گیاه ضروری نیستند اما در مکانیسم های دفاعی گیاه و فرآیندهای سیگنالینگ آن در شرایط تنش های زنده و غیر زنده نقش مهمی را ایفا می کنند (ایسبیلیر و

ساگیروکلو، ۲۰۱۳). تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان بسیار کم است. معمولاً استخراج این مواد از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست؛ بنابراین تولید تجاری متابولیت های ثانویه به وسیله کشاورزی سنتی کافی نمی باشد (کابرا، سمانا و هیی، ۲۰۱۴). برای غلبه بر این محدودیت ها می توان از روش های آزمایشگاهی و بیوتکنولوژی مختلفی استفاده کرد. برای تولید صنعتی این مولکول های فیتوشیمیایی می توان از تکنیک هایی نظیر کشت بافت گیاهی و تنش های غیر زیستی کمک گرفت (رائو و راتود، ۲۰۱۵؛ یو، مینگ و لین، ۲۰۱۶). یکی از مزیت های روش کشت سلولی، مستقل بودن از تغییرات جغرافیایی و عوامل محیطی و در عین حال سرعت بالای رشد آن می باشد. در این روش ممکن است ترکیبات جدیدی تولید شود که در شرایط طبیعی در گیاه مادری وجود ندارد. محققین سعی می کنند با استفاده از این روش ها تولید این متابولیت های ثانویه با ارزش گیاهی را افزایش دهند (کارتال، کونولوگیل و ایندراپانتو، ۲۰۰۴). به عنوان مثال تشکیل کالوس در گیاه *Teucrium polium* باعث افزایش محتوای فنل کل و ظرفیت آنتی اکسیدانی شده است (نامدئو، ۲۰۰۷).

همه تنش های غیر زنده مستقر در گیاه، ضرورتاً مضر نیستند. در برخی موارد در تعدادی از گونه های گیاهی، وقتی گیاهان در شرایط کنترل شده و در شرایط آزمایشگاهی رشد می کنند، این تنش ها می توانند مفید نیز واقع شوند. حتی می توان از الیستورهای غیر زیستی مکانیکی مانند، تنش فراصوت برای تحریک رشد و نمو نیز استفاده کرد (داسیلوا و دوبراسکی، ۲۰۱۴). به طور کلی استفاده از الیستورهای در مطالعات مربوط به زیست فناوری متابولیت های گیاهی، دو هدف اصلی را دنبال می کنند: ۱- بدست آوردن اطلاعات در زمینه مسیرهای بیوسنتزی که منجر به تشکیل و تنظیم متابولیت های ثانویه می شود ۲- افزایش تولید

فراصوت می‌تواند باعث رهاشدن ترکیبات درون سلولی شده و در کشت سلول‌های گیاهی برای برداشت مداوم متابولیت‌های ثانویه مفید واقع شود. گزارش‌های مختلفی مبنی بر افزایش مقدار فنل کل و ظرفیت آنتی اکسیدانی در نمونه‌های تیمار شده با امواج فراصوت وجود دارد (ردولف و رسوکسیون، ۲۰۰۵؛ رومینا، لنز و ویرکوتیت، ۲۰۰۹؛ سالیس و رسوکسیون، ۲۰۱۰).

با توجه به اثرات مثبت به کارگیری امواج فراصوت در افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و مقدار ترکیبات فنلی، تاکنون مطالعه‌ای در مورد تغییرات خاصیت آنتی اکسیدانی توسط تنش فراصوت در گیاه عدس‌الملک و کالوس‌های حاصل از آن انجام نشده است. لذا در این مطالعه، فعالیت آنتی اکسیدانی و مقدار فنل کل 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-آلدریج تهیه شدند. کربنات سدیم پتاسیم ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )، 6-بنزیل آمینو پورین (BAP) و اسید استیک  $\alpha$ -نفتالین (NAA) از برند Merck استفاده شد. سایر مواد شیمیایی و حلال‌های استفاده شده دارای درجه آنالیتیکی بودند.

### آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی

به منظور اندازه‌گیری ترکیبات فنلی و خواص آنتی اکسیدانی، بذر گیاه *S. securidaca* از هر بارיום دانشگاه حکیم سبزواری تهیه شد. بذرها در گلدان‌های بزرگ کاشته و به مدت ۶ هفته در گلخانه رشد کردند. در طول دوره رشد، گیاهان هر روز به طور منظم آبیاری شدند تا رطوبت مطلوب خاک حفظ شود. تنش فراصوت

متابولیت‌های ثانویه برای کاربرد تجاری (رابرتز و شولر، ۱۹۹۷). امواج صوتی که چه از محیط اطراف گیاه و چه به صورت طبیعی و یا به طور مصنوعی به گیاه اعمال می‌شوند، می‌توانند بر فرآیندهای مختلفی مانند جوانه‌زنی بذر، القای احتمالی سیستم آنتی اکسیدانی، تغییرات القا شده در پروتئین‌های محلول، محتوای قندی بافت‌های گیاهی، فعالیت ATPases پلاسما، افزایش تعداد سلول‌ها در مرحله S و تغییر پیشرفت چرخه سلولی و تغییرات رشد در شرایط آزمایشگاهی تأثیرگذار 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 آنتی اکسیدانی می‌شود (نیکولای، پرا و ویتور، ۲۰۱۶). همچنین این تنش سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه 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؛ سالیس و رسوکسیون، ۲۰۱۰؛ لو، دینگ و پارک، ۲۰۲۰). محققان در تحقیقات مختلفی ثابت کرده‌اند که تنش فراصوت، باعث القاء سیستم آنتی اکسیدانی در گیاهان می‌شوند (دوبراسکی، آسبوت و هوموکی، ۲۰۱۷؛ میشر، گوش و بی، ۲۰۱۶). مطالعات گوناگونی در حال انجام است تا ارزیابی کند آیا محرک صدا می‌تواند به عنوان محرک رشد و یا به عنوان 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،

طی ۱۵ روز با سیکل ۰/۹ و دامنه ۹۰٪ به مدت 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٪ به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم (۵ درصد) به مدت ۸ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل شستشو شدند. بذرها به محیط کشت MS حاوی ۳٪ ساکارز به عنوان منبع کربن و آگار ۸٪ (وزنی / حجمی) انتقال یافتند. به منظور جوانه‌زنی به اتاق کشت با دمای  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  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 ۳-۴ سانتی‌متر، ریزنمونه‌ها انتخاب شدند. به منظور 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٪ به مدت 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 به مدت ۱۵ دقیقه با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪، به مدت ۱۵ دقیقه به روش فراصوت استخراج شد. محلول‌های به‌دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند.

#### اندازه‌گیری مقدار فنل کل

جهت اندازه‌گیری مقدار فنل کل از معرف فولین‌سیوکالتو استفاده شد (سینگلتون، اورتوفر و لاموتلا، ۱۹۹۹). ۲/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین‌سیوکالتو با ۲ میلی‌لیتر از محلول  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  یک مولار مخلوط گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول هر عصاره گیاهی یا اسید گالیک به مخلوط اضافه شد. مخلوط‌ها به مدت 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 فنل کل 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٪ DPPH مخلوط گردید و به مدت 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:

$$IP(\%) = \left( \frac{A_0 - A_S}{A_0} \right) * 100 \quad (\text{رابطه ۱})$$

As:DPPH: جذب نمونه تیمار، حاوی محلول

عصاره، A0: Blank: جذب نمونه.

#### طرح آزمایش

این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و گلخانه

تغییرات مقدار فنل کل در گیاه عدس الملک در تنش فراصوت، در جدول ۱ نشان داده شده است. با افزایش مدت زمان تنش فراصوت در روز اول، افزایش معنی داری در مقدار فنل کل 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 نمز، ۲۰۱۸؛ گانی، بابا و احمد، ۲۰۱۶؛ دینگ، پارک و فنگ، ۲۰۲۰؛ سایلِس 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 نشان داد 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 آنتی اکسیدانی در آناناس‌های انبار شده در سردخانه شد (ایوو عسگر، ۲۰۱۷). اما با افزایش روزهای تیمار، مقدار فنل کل 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 به مدت 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 فنل کل در روز اول و در تیمار ۳۰ دقیقه بود. در تحقیق مشابهی در گیاه رزماری، تنش فراصوت سبب افزایش قابل توجه مقدار

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 آنتی اکسیدانی گیاه عدس الملک**

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

جدول ۱. منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات مقدار فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی در گیاه اصلی

| فعالیت آنتی اکسیدانی | مقدار فنل کل | درجه آزادی | منابع تغییر           |
|----------------------|--------------|------------|-----------------------|
| ۶۱۲۰**               | ۱۱۴۸**       | ۳          | مدت فراصوت (A)        |
| ۹۶۱۰**               | ۵۰۲۳**       | ۳          | زمان نمونه‌برداری (B) |
| ۱۸۲۴**               | ۹۱۵**        | ۹          | A*B                   |
| ۲/۵۷                 | ۲۰/۳         | ۳۲         | خطا                   |
| ۳/۰۱                 | ۱۲/۹         |            | ضریب تغییرات (%)      |

\*\*\* و \*\* و NS به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد و غیر معنی‌دار.

**تأثیر تنش فراصوت بر مقدار فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه عدس الملک**

| پانزدهم            | دهم                | پنجم                | (دقیقه)                         |
|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------------------|
| ۷۵/۸۹ <sup>d</sup> | ۸۱/۵۹ <sup>c</sup> | ۸۴/۲۶ <sup>b</sup>  | ۸۷/۴۲ <sup>a</sup> گروه کنترل ۰ |
| . <sup>d</sup>     | ۸۴/۳ <sup>b</sup>  | ۸۲/۸۵ <sup>bc</sup> | ۷۶/۲۶ <sup>d</sup> ۱۰           |
| . <sup>d</sup>     | . <sup>d</sup>     | ۷۵/۷۳ <sup>d</sup>  | ۷۰/۶۹ <sup>e</sup> ۲۰           |
| . <sup>d</sup>     | . <sup>d</sup>     | ۶۶/۴۲ <sup>f</sup>  | ۷۰/۸۵ <sup>e</sup> ۳۰           |

**تأثیر تنش فراصوت بر شاخص خواص آنتی اکسیدانی در کالوس گیاه عدس الملک**

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که مدت فراصوت، زمان نمونه برداری و اثر متقابل مدت فراصوت و زمان نمونه برداری بر فعالیت آنتی اکسیدانی در کالوس گیاه عدس الملک اثر معنی داری دارند در حالی که مقدار فنل کل تنها تحت تأثیر زمان نمونه برداری و اثر متقابل مدت فراصوت و زمان نمونه برداری قرار گرفت (جدول ۴).

جدول ۴. منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات مقدار فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی در کالوس گیاه عدس الملک

| فعالیت آنتی اکسیدانی | مقدار فنل کل       | درجه آزادی | منابع تغییر           |
|----------------------|--------------------|------------|-----------------------|
| ۴۰/۹ <sup>**</sup>   | ۱/۵۷ <sup>ns</sup> | ۱          | مدت فراصوت (A)        |
| ۳۰/۲ <sup>**</sup>   | ۴۷۱ <sup>**</sup>  | ۳          | زمان نمونه برداری (B) |
| ۳۲/۶ <sup>**</sup>   | ۶۷۵ <sup>**</sup>  | ۳          | A*B                   |
| ۱/۱۵                 | ۱/۲۹               | ۱۶         | خطا                   |
| ۱/۶۸                 | ۳/۴۰               |            | ضریب تغییرات (%)      |

ns و \*\* به ترتیب معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد و غیر معنی دار.

**تأثیر تنش فراصوت بر مقدار فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی در کالوس گیاه عدس الملک**

همان طور 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 کالوس ها اعمال شد. برخلاف گیاه اصلی، با افزایش روز تنش، مقدار فنل کل در کالوس های در تنش افزایش معناداری را نشان دادند. به طوری که بیشترین مقدار فنل کل در روز پانزدهم بود. می دانیم که تنش های غیر زیستی تأثیرات مثبتی را بر روی مقدار متابولیت های ثانویه

فنل کل و ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره های رزماری شد. جدول ۳ فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه عدس الملک در تنش فراصوت را نشان می دهد. برخلاف افزایش در مقدار فنل کل، فعالیت آنتی اکسیدانی در هر سه تیمار کاهش معنی داری را نشان داد. در روز پنجم گیاه در تیمار ۱۰ دقیقه بر تنش مقاومت کرده و فعالیت آنتی اکسیدانی خودش را به شرایط عادی و مانند نمونه کنترل رساند. همان طور که در جدول ۲ دیده می شود مقدار فنل کل نیز در روز پنجم افزایش داشته است که نشان دهنده پاسخ مثبت گیاه به تنش است. نتایج مشابهی نیز در گوجه فرنگی صورت گرفت که نشان می داد میزان فعالیت آنتی اکسیدانی وابسته به زمان می باشد (لو، دینگ و پارک، ۲۰۲۰). یعنی گیاه به زمان نیاز دارد تا بتواند ژن های مرتبط به تنش را بیان و پروتئین های مربوطه را برای مقابله با تنش تولید کند. همان طور 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 آسیب دیدگی دیواره سبب کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی شده است. پیشنهاد می گردد در تحقیقات بعدی از تنش های زیر ۱۰ دقیقه و با فرکانس های کمتر استفاده شود. همچنین از این روش می توان به صورت تلفیقی و مکمل به صورت هم زمان با تنش های دیگر نیز استفاده کرد.

جدول ۲. اندازه گیری مقدار فنل کل در گیاه عدس الملک در

تنش فراصوت بر حسب ppm

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

جدول ۳. اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی در گیاه

عدس الملک در تنش فراصوت بر حسب IP%

| روز | روز | روز | روز اول | مدت فراصوت |
|-----|-----|-----|---------|------------|
|-----|-----|-----|---------|------------|

(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 بیوستز متابولیت‌های ثانویه 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 آنتی اکسیدانی نشان داده شده است، فعالیت آنتی اکسیدانی طی تنش فراصوت تا روز دهم کاهش یافت. اما در روز پانزدهم فعالیت آنتی اکسیدانی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. بیشترین مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی در گروه کنترل روز دهم می‌باشد؛ بنابراین کالوس‌زایی و تنش اعمال شده نتوانسته است فعالیت آنتی اکسیدانی را افزایش دهد. نتایج مشابهی در تحقیقات قبلی وجود دارد. گزارش شده است 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 yunnanensis*) سبب کاهش چشمگیر درصد زنده‌مانی سلول‌ها شد. دلیل آن به احتمال این می‌باشد که به‌کارگیری فراصوت در کشت سلولی سبب ایجاد وقایع هیدرودینامیک پراثری 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 به دلیل افزایش نفوذپذیری غشا باشد.

می‌گذارد. به عنوان مثال تنش‌های غیر زیستی سبب افزایش خواص آنتی اکسیدانی و فنل کل در گیاه خاکستر اروپایی شد (ناوروت، سولکواسکا و اوسمند، ۲۰۲۲). این تنش نیز مانند تنش‌های غیر زیستی دیگر مانند فلزات سنگین، UV و دما سبب افزایش فنل کل شد (پهلوان کاراکاس، ساهین و تورکن، ۲۰۲۲). متأسفانه تحقیقات جدیدی درباره تأثیر فراصوت به عنوان 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 به عنوان یک روش استخراجی نوین استفاده شده است که سبب استخراج بهتر ترکیبات فنلی و مواد آنتی اکسیدانی می‌شود. برای نمونه در گیاهان پالپ *Ziziphus joazeiro* M، کین کلیا و سالویلا، این روش استخراجی سبب افزایش ترکیبات فنلی و خواص آنتی اکسیدانی شد (روشا، لیما و سیلوا، ۲۰۲۲؛ زنو، پاشازاده و ابراهیم، ۲۰۲۲؛ ابوالقازی، باکور و فادیل، ۲۰۲۲). در این پژوهش نیز برای استخراج از این روش استفاده شد. در این در حالی بود که مقدار فنل کل 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 آنتی اکسیدانی 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،

الیستورهای 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 فنل کل در شرایط آزمایشگاهی و تولید گیاهان دارویی در شرایط اسپتیک استفاده شود. کالوس‌زایی و اعمال تنش فراصوت بر روی گیاه *S.securidaca* توانست مقدار فنل کل 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.

جدول ۵. اندازه‌گیری مقدار فنل کل در کالوس‌های در تنش

| فراصوت برحسب ppm   |                    |                    |                    |                    |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| روز پنزدهم         | روز دهم            | روز پنجم           | روز اول            | مدت فراصوت (دقیقه) |
| ۳۵/۲۳ <sup>c</sup> | ۲۰/۶۸ <sup>g</sup> | ۳۷/۵۵ <sup>e</sup> | ۵۱/۱۴ <sup>b</sup> | گروه کنترل ۰       |
| ۵۳/۸۱ <sup>a</sup> | ۳۲/۵۷ <sup>d</sup> | ۲۴/۲۷ <sup>f</sup> | ۲۱/۹۱ <sup>g</sup> | ۱۰                 |

جدول ۶. اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کالوس‌های در

| تنش فراصوت برحسب IP% |                    |                    |                     |                    |
|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| روز پنزدهم           | روز دهم            | روز پنجم           | روز اول             | مدت فراصوت (دقیقه) |
| ۶۵/۹۹ <sup>a</sup>   | ۶۷/۵۳ <sup>a</sup> | ۶۶/۳۱ <sup>a</sup> | ۶۰/۱۶ <sup>cd</sup> | گروه ۰             |
| ۵۸/۶۶ <sup>d</sup>   | ۶۶/۱۱ <sup>a</sup> | ۶۱/۲۶ <sup>c</sup> | ۶۳/۵۱ <sup>b</sup>  | ۱۰                 |

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



- 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  $\gamma$ -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.
- Graão, 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 ginseng* Cells: 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.