

Optimization of ultrasound waves effects on the production of ganoderic acid of *Ganoderma adspersum* (Schulz.) Donk by response surface method

Mansooreh Aghasizadeh Shaarbaf¹, Vahide Payamnoor^{*2},
Mohammadreza Kavosi³, Javad Asili⁴

1. Ph.D. Student in Silviculture and Forest Ecology, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mansooreh.aghasi@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: payamnoor@gau.ac.ir
3. Associate Prof., Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: kavousi@gau.ac.ir
4. Professor, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. E-mail: javadasili@gmail.com

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 04.14.2023

Revised: 06.07.2023

Accepted: 06.07.2023

Keywords:

DNA investigation,
Ganoderic acid,
Ganoderma adspersum,
Secondary metabolite,
Ultrasonic waves

ABSTRACT

Background and Objectives: Ganoderic acid (GA) is a type of triterpenoid compound produced by different species of *Ganoderma*. This secondary metabolite has garnered significant interest in recent years due to its remarkable medicinal properties. While *Ganoderma lucidum* is renowned for containing this compound, other species are also considered viable alternatives. Among these species, *Ganoderma adspersum* holds great importance. It can be found as a parasite or saprophyte on living trees, and sometimes on tree stumps. Its basidiocarp bears a striking resemblance to *G. applanatum*, often leading to confusion between the two. This species has been attributed with various medicinal properties, including but not limited to reducing blood pressure and blood sugar, strengthening the immune system, and possessing antiviral, antibacterial, and anti-inflammatory properties. Moreover, it serves as a primary source for the production of ganoderic acid. In this study, molecular identification of the fungus was conducted to confirm the species and ultrasound waves were employed as an elicitor to enhance ganoderic acid production in vitro conditions. The results were analyzed for both intracellular and extracellular conditions.

Materials and Methods: Mushrooms were collected in three different sizes: small, medium, and large. Following purification, they underwent morphological and molecular identification. The samples were then cultured in a PDA medium, and after 14 days, they were transferred to a suspension culture medium (PDB). Subsequently, the samples were subjected to ultrasound stimulation, with varying parameters including the number of times exposed to sound (ranging from 1 to 3 times), duration of exposure (60, 180, and 300 seconds), and sound temperature (30, 40, and 50 °C). Subsequently, extracts were obtained from both mycelium and mushroom culture medium in the suspension culture, and the levels of intracellular and extracellular ganoderic acid were measured. To accomplish this, the RSM (Response Surface Method) and Box-Behnken design were employed. In total, 17 experiments were designed using

Design Expert 7 software, and the software aided in determining the optimal variable values for achieving maximum ganoderic acid production.

Results: According to morphological and molecular identification, the selected species of *Ganoderma* is called *adpersum*. The presence of ganoderic acid in this mushroom was proved. It was found that among the three sizes of mushrooms selected, the larger size (21 × 16 cm) had more ganoderic acid than the other two sizes, and this size was used for sampling and elicitor induction. The highest amount of total ganoderic acid was related to sonication twice for 282 seconds and a temperature of 30 degrees Celsius (79.21 mg/g), which increased the amount of total ganoderic acid by 1.6 times compared to the control, while this amount It was 25.48 mg/g in natural mushroom.

Conclusion: Cultivating mushrooms in invitro rather than relying on forest harvesting presents a sustainable approach for extracting plant secondary metabolites. Among the valuable metabolites found in *Ganoderma* mushroom species, ganoderic acid stands out as a key compound with anti-inflammatory and antiviral properties. Given the challenges associated with extensive forest harvesting and the limited accessibility to forest resources, it becomes imperative to adopt novel methods of mushroom cultivation under controlled laboratory conditions as a viable alternative to forest collection. In line with the objective of enhancing ganoderic acid production, the current study represents the first investigation conducted on *Ganoderma adpersum*. Notably, this fungus is being reported for the first time on *Carpinus betulus*. Given the remarkable increase of over 1.5 times in total ganoderic acid levels following ultrasound treatment compared to the natural mushroom sample, it is recommended to conduct further research to achieve more comprehensive identification and characterization of ganoderic acid types.

Cite this article: Aghasizadeh Shaarbaf, Mansooreh, Payamnoor, Vahide, Kavosi, Mohammadreza, Asili, Javad. 2023. Optimization of ultrasound waves effects on the production of ganoderic acid of *Ganoderma adpersum* (Schulz.) Donk by response surface method. *Journal of Wood and Forest Science and Technology*, 30 (2), 15-37.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/JWFST.2023.21245.2016

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بهینه‌سازی اثر امواج فراصوت بر تولید گانودریک اسید در *Ganoderma adspersum* (Schulz.) Donk با روش سطح پاسخ

منصوره آقاسی زاده شعرباف^۱، وحیده پیام‌نور^{۲*}، محمدرضا کاوسی^۳، جواد اصیلی^۴

۱. دانشجوی دکتری جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: mansooreh.aghasi@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، دانشیار دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: payamnoor@gu.ac.ir
۳. دانشیار دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: kavousi@gu.ac.ir
۴. استاد دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: javadasili@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: گانودریک اسید (GA) نوعی از تری‌ترپنوئیدها است که توسط گونه‌های مختلف گانودرما تولید می‌شود. این متابولیت ثانویه به دلیل عملکردهای دارویی فوق‌العاده در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود معطوف نموده و با وجود این‌که <i>Ganoderma lucidum</i> معروفیت زیادی به خاطر داشتن این ترکیب دارد اما گونه‌های دیگر نیز به‌عنوان جایگزین مورد توجه هستند. یکی از مهم‌ترین گونه‌های گانودرما قارچ <i>Ganoderma adspersum</i> است که به‌صورت پارازیت یا ساپروفیت روی درختان زنده یا برخی اوقات روی کنده‌های درختان یافت می‌شود و بازیدیوکارپ آن بسیار شباهت به گونه <i>G. applanatum</i> دارد و اغلب اشتباه گرفته می‌شود. خواص دارویی مختلفی چون کاهش فشار و قند خون، تقویت سیستم ایمنی، خاصیت ضدویروسی و ضد باکتریایی و ضد التهابی را برای این گونه ذکر کرده‌اند و از منابع اصلی تولید گانودریک اسید است. در پژوهش حاضر ضمن شناسایی مولکولی قارچ و حصول اطمینان از گونه، از امواج فراصوت به‌عنوان محرک و با هدف افزایش گانودریک اسید کل در شرایط آزمایشگاهی استفاده و در دو حالت درون‌سلولی و برون‌سلولی نتایج بررسی شد.
واژه‌های کلیدی: امواج فراصوت، بررسی DNA، گانودریک اسید، متابولیت ثانویه، <i>Ganoderma adspersum</i>	تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۵ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۷
مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری از قارچ در سه سایز کوچک، متوسط و بزرگ انجام و پس از خالص‌سازی، مورد شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی قرار گرفت. نمونه‌ها در محیط PDA کشت شد و پس از ۱۴ روز در محیط کشت مایع (PDB)، در معرض محرک امواج فراصوت با متغیرهای تعداد (۱ تا ۳ بار صوت‌دهی)، زمان (۶۰، ۱۸۰ و ۳۰۰ ثانیه) و دمای صوت‌دهی	

(۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس) قرار گرفتند. سپس از میسلوم و محیط کشت قارچ موجود در کشت سوسپانسیون عصاره‌گیری و گانودریک اسید درون سلولی و برون سلولی اندازه‌گیری شد. جهت انجام کار از روش سطح پاسخ RSM و طرح باکس بنکن استفاده و ۱۷ آزمایش توسط نرم‌افزار Design expert 7 طراحی گردید و مقدار بهینه متغیرها برای حداکثر تولید گانودریک اسید، به کمک نرم‌افزار تعیین شد.

یافته‌ها: طبق شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی گونه انتخابی *Ganoderma adspersum* Donk (Schulz.) نام دارد. وجود گانودریک اسید در این قارچ به اثبات رسید مشخص شد در بین سه سایز انتخاب شده قارچ، سایز بزرگ‌تر (۲۱ × ۱۶ سانتی‌متر) گانودریک اسید بیش‌تری نسبت به دو سایز دیگر داشت و از همین سایز برای نمونه‌گیری و القا محرک استفاده شد. بیش‌ترین میزان گانودریک اسید کل مربوط به دومرتبه صوت‌دهی به مدت ۲۸۲ ثانیه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس بود (۷۹/۲۱ میلی‌گرم بر گرم) که باعث افزایش ۱/۶ برابری گانودریک اسید کل نسبت به شاهد گردید و این در حالی است که این میزان در قارچ طبیعی ۲۵/۴۸ میلی‌گرم بر گرم بوده است.

نتیجه‌گیری: کشت در محیط آزمایشگاهی به‌جای برداشت از جنگل یک روش پایدار برای استخراج متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. گانودریک اسید یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ضدالتهاب و ضدویروس است که در گونه‌های قارچ گانودرما وجود دارد. با توجه به نیاز به برداشت وسیع از جنگل و عدم امکان دسترسی مداوم به جنگل، جایگزین نمودن روش‌های نوین کشت قارچ در شرایط آزمایشگاهی به‌جای جمع‌آوری از جنگل امری ضروری است. پژوهش حاضر در همین راستا و باهدف افزایش مقدار گانودریک اسید برای اولین بار بر روی *Ganoderma adspersum* صورت گرفت. با توجه به افزایش بیش از ۱/۵ برابری گانودریک اسید کل بعد از اعمال تیمار صوت‌دهی نسبت به نمونه قارچ طبیعی، انجام پژوهش‌های تکمیلی برای شناسایی جزئی‌تر و نوع گانودریک‌ها پیشنهاد می‌شود.

استناد: آقاسی‌زاده شعرباف، منصوره، پیام‌نور، وحیده، کاوسی، محمدرضا، اصیلی، جواد (۱۴۰۲). بهینه‌سازی اثر امواج فراصوت بر تولید گانودریک اسید در *Ganoderma adspersum* (Schulz.) Donk با روش سطح پاسخ. نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل، ۳۰ (۲)، ۳۷-۱۵.

DOI: 10.22069/JWFST.2023.21245.2016



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

گانودریک اسیدها^۱ (GAs)، نوعی تری‌ترپنوئید تتراسایکلیک^۲ (۱) و یکی از اجزای اصلی جنس گانودرما هستند و دارای فعالیت‌های دارویی متنوعی از جمله ضد تومور، ضد متاستاز، ضد HIV، ضد ویروسی، محافظت از کبد، اثرات آنتی‌اکسیدانی و هیپوکلسترولمیک (کاهش‌دهنده کلسترول خون) و ضد پیری هستند (۲). گانودریک اسید اثرات ضد سرطانی، ضد التهابی و ضد دیابتی را از طریق وقفه چرخه سلولی و مهار فعالیت β catenin یا پروتئین کیناز C و اثرات التهابی را از طریق کاهش تولید سیتوکین‌های التهابی نشان می‌دهند (۳). با این‌که بیش‌تر پژوهش‌های انجام‌شده در سطح جهانی بر روی *G. lucidum* بوده است (۴) ولی سایر گونه‌ها نیز ارزش دارویی فراوانی دارند. برخی گونه‌های این سرده پارازیت‌های درختان سرپا هستند و برخی نیز ساپروفیت بوده و بر روی چوب‌های افتاده زندگی می‌کنند. برخی گونه‌ها میزبان‌های تخصصی دارند و بسیاری نیز دارای طیف وسیعی از میزبان‌ها هستند. استفاده از عصاره‌های درون‌سلولی و برون‌سلولی تولید شده در شرایط آزمایشگاهی^۳ می‌تواند به‌عنوان بک راه‌حل جایگزین مناسب با امکان بهره‌برداری در تمام طول سال، بدون آسیب و دست‌خوردگی به بوم‌سازگان جنگل مطرح شود که مطالعه حاضر با همین رویکرد انجام شد. در اغلب مواقع، تولید متابولیت‌های ثانویه در مقیاس تجاری با استفاده از تکنیک‌های درون‌شیشه‌ای به‌تنهایی قابل توجیه نیست، بنابراین استفاده از محرک‌ها^۴ با هدف افزایش میزان کمی ترکیبات ثانویه مطرح هستند. محرک‌ها باعث تحریک پاسخ دفاعی در گیاهان شده (۵ و ۶) و با توجه به منشأ تولیدشان، در دو گروه زنده (مواد با منشأ بیولوژیکی) و غیرزنده (عوامل فیزیکی، شیمیایی

و هورمونی) طبقه‌بندی می‌گردند (۷). گیاهان پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی مختلفی نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی نشان می‌دهند (۸). روش‌های مختلفی با هدف افزایش تولید گانودریک اسید گزارش شده است (۹). به‌عنوان مثال اسماعیل‌زاده و همکاران (۲۰۱۹) امکان افزایش گانودریک اسید کل را پس از استفاده از محرک‌های کربن، گلوکز، چای، تراشه بلوط، عصاره مالت، سبوس گندم در کشت مایع و نیمه جامد *G. lucidum* بررسی کردند. مشخص شد کشت نیمه جامد غنی‌شده با گلوکز و ذرات جامد تراشه چوب بلوط بهترین تیمار برای افزایش گانودریک اسید و آگروساکاریدها در شرایط آزمایشگاهی است (۱۰).

افزودن سلولز میکرو کریستالی با غلظت ۱/۵ درصد و دی‌گالاکتوز با غلظت ۰/۵ درصد به‌عنوان محرک به ترتیب باعث افزایش ۸۶ و ۶۴ درصدی تولید گانودریک اسید می‌شود (۱۱). افزودن محرک ساکارز تا حد زیادی تجمع پلی‌ساکارید و فعالیت آنزیم‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز پلی‌ساکارید در کشت مایع *G. lucidum* را افزایش می‌دهد (۱۲). هیو و همکاران (۲۰۱۸) در بهینه‌سازی محیط کشت مایع برای تولید گانودریک اسید از *G. lucidum*، اثرات نیتروژن و غلظت گلوکز را بررسی کردند و نتایج آن‌ها نشان داد که نیتروژن مناسب، تجمع گانودریک اسید را در بیوراکتور افزایش می‌دهد و حداکثر بازده تولید گانودریک اسید ۴۰ گرم در لیتر گلوکز است (۱۳).

محرک‌های فیزیکی مانند امواج فراصوت بدون دست‌کاری ژنتیکی، رشد و فرآیندهای متابولیکی را تحریک می‌نمایند (۱۴). بازده استخراج ماده مؤثره با امواج فراصوت در بسیاری مواقع بیش‌تر از استخراج با حلال سنتی است این امر در مورد استخراج کل دو ترکیب Ganoderic acid A and D در *G. lucidum* ۳۶/۲۱ درصد بیش‌تر از روش معمول

- 1- Ganoderic acid (GA)
- 2- Triterpene tetracyclic
- 3- In vitro
- 4- Elicitors

به‌سزایی است که به ما در شناخت بهتر ویژگی‌های گونه‌ها و اکوسیستم‌های جنگل‌های شمال کمک می‌کند. هم‌چنین شناسایی این قارچ‌ها بینش دقیق‌تر از شناخت اکوسیستم جنگل‌های طبیعی و انتخاب روش‌های مناسب برای بهره‌برداری سازگار با طبیعت هم‌زمان با کاهش خسارت می‌دهد (۲۱).

بنابراین در مطالعه حاضر اثر امواج فراصوت با هدف افزایش گانودریک اسید درون و برون‌سلولی در شرایط درون‌شیشه‌ای برای نمونه‌ای چوبی به میزبانی ممرز و با پیش‌فرض اولیه *G. applanatum* یا *G. adpersum* بررسی شد. به دلیل شباهت زیاد این دو گونه، شناسایی مورفولوژی و مولکولی مدنظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و شناسایی مورفولوژیکی: نمونه‌های قارچ در سه سایز کوچک (10×6 سانتی‌متر)، متوسط (15×11 سانتی‌متر) و بزرگ (21×16 سانتی‌متر) از جنگل‌های شصت کلاته - غرب استان گلستان - ایران (طول: $266777,7$ ، عرض: $4071411,32$ و ارتفاع: $396,36$) در طول تابستان جمع‌آوری شد.

شناسایی مورفولوژیکی: ویژگی‌های مربوط به قارچ شامل: شکل و اندازه بازیدیوکارب، منافذ، ساختار ریشه، شکل و اندازه بازیدیواسپور بررسی و شناسایی نمونه‌ها با استفاده از منابع استاندارد انجام شد (۲۲ و ۲۳).

استخراج DNA ژنومی و تکثیر PCR: DNA ژنومی قارچ با استفاده از کیت جداسازی DNA قارچ DenaZist Asia مطابق دستورالعمل سازنده استخراج شد. ناحیه rDNA-ITS با استفاده از پرایمرهای ITS5 و ITS4 تکثیر شد (۲۴). تکثیر PCR طبق روش آقاجانی و همکاران (۲۰۱۸) انجام شد (۲۵) و محصولات PCR در الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد با بافر ۱ x Tris-Boric acid-EDTA (TBE)

بوده است (۱۵). از امواج فراصوت به‌عنوان یک محرک موفق در مطالعات مختلفی استفاده شده است، امواج فراصوت به‌عنوان یک محرک غیرزیستی، ممکن است مکانیسم‌های دفاعی را در گیاهان القا کند که منجر به سنتز متابولیت‌های ثانویه آن‌ها می‌شود (۱۶). تولید تری‌ترپنوئیدهای میسلیم قارچ *G. lucidum* پس از الیسیته کردن با امواج فراصوت $34/96$ درصد بیش‌تر از نمونه شاهد بوده است (۱۷). هم‌چنین آن‌ها افزایش محتوای پلی‌ساکاریدهای داخل و خارج سلولی و فلاونوئیدها در اثر اعمال امواج فراصوت با شدت کم در کشت مایع *G. lucidum* را گزارش نموده‌اند (۱۷).

هفت گونه گانودرما در جنگل‌های هیرکانی شمال ایران گزارش شده است. دو گونه (*non-laccate*) غیرصیقلی) متعلق به زیرجنس Imazeki (P. Karst.) *Elfvigia* (*G. applanatum*, *G. adpersum*) و چهار گونه (صیقلی *laccate*) متعلق به زیرجنس *Ganoderma* (*G. lucidum*, *G. resinaceum*, *G. tsugae*, *G. manoutchehrii*) و یک گونه، *G. colossus* که به زیرجنس‌های فوق تعلق ندارد (۱۸). درخت ممرز (*betulus Carpinus L.*) از اروپا تا قفقاز و در ایران در نقاط مختلف جنگل‌های شمال البرز، از جلگه تا ارتفاعات متوسط میان‌بند، از آستارا تا گلیداغی انتشار دارد (۱۹). آقاجانی و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای که روی قارچ‌های ماکروسکوپی درختان ممرز جنگل خیرودکنار نوشهر انجام دادند وجود گونه *G. lucidum* و هم‌چنین گونه *G. applanatum* را برای اولین بار در ایران به میزبانی این درخت گزارش دادند (۲۰). درخت ممرز جزو درختان مهم جنگل‌های شمال کشور محسوب می‌شود، بررسی و شناخت قارچ‌های ماکروسکوپی چوبی، شرایط رویشگاهی درختان قارچ‌زده، پراکنش آن‌ها روی تنه و سایر فعالیت‌هایشان روی درختان از نظر جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل دارای اهمیت

Pycnoporus megacotyle به‌عنوان گروه برون، برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک انتخاب شدند. سویه‌ها و شماره‌های الحاقی GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) آن‌ها در جدول ۱ فهرست شده است. توالی‌های ITS در نرم‌افزار MEGA6 با استفاده از Neighbor-Joining (NJ) تجزیه و تحلیل شدند و فواصل تکاملی با استفاده از روش ۳ پارامتری Tamura با ۵۰۰ تکرار بوت استرپ^۱ محاسبه شد (۲۶).

آنالیز شدند. سپس جهت تعیین توالی به شرکت پیشگام بیوتک ایران ارسال گردید. توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از الگوریتم (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) و BLAST توالی‌های مشابه به‌دست‌آمده از پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیولوژیکی (NCBI) تجزیه و تحلیل شدند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک: سی‌وشش سویه مرجع از گونه‌های گانودرما از جمله جدایه ما و

جدول ۱- تعداد کشت، اعداد ورود برای منطقه ITS5 و ITS4 و نام گونه گانودرما مورد استفاده (در این مطالعه، سویه ما با پررنگ مشخص شده است).

Table 1. Culture number, accession numbers for ITS region, and the name of *Ganoderma* species used in this study. Our strain is highlighted in bold.

گونه‌های گانودرما <i>Ganoderma</i> species	شماره کشت Culture number	شماره‌های دسترسی بانک ژن برای منطقه rDNA-ITS GenBank accession numbers for rDNA-ITS region
<i>Ganoderma adspersum</i>	IRAN HSBU200882	KT343311
<i>Ganoderma adspersum</i>	IRAN HSBU200894	KT343313
<i>Ganoderma applanatum</i>	voucher LE 287671	MN435140
<i>Ganoderma applanatum</i>	voucher LE 287658	MN435132
<i>Ganoderma australe</i>	voucher HMAS86595	AY884184
<i>Ganoderma carnosum</i>	voucher K(M)109415	AY884175
<i>Ganoderma chocoense</i>	QCAM 3123	NR163763
<i>Ganoderma cupreum</i>	isolate SUT H1	AY569450
<i>Ganoderma curtisii</i>	CBS 100131	JQ781848
<i>Ganoderma destructans</i>	CBS 139793	NR132919
<i>Ganoderma eickeri</i>	CMW 49692	NR165524
<i>Ganoderma enigmaticum</i>	CBS 139792	NR132918
<i>Ganoderma flexipes</i>	voucher Wei5491	JQ781850
<i>Ganoderma fornicatum</i>	AS5.539 type 2	AY593860
<i>Ganoderma gibbosum</i>	AS5.624 type 4	AY593857
<i>Ganoderma japonicum</i>	AS5.69 type 1	AY593864
<i>Ganoderma leucocontextum</i>	GDGM 40200	NR154902
<i>Ganoderma lingzhi</i>	voucher Wu1006-38	JQ781858
<i>Ganoderma lipsiense</i>	isolate FIN 251R90	EF060006
<i>Ganoderma lucidum</i>	IRAN HSBU200898	KT343316
<i>Ganoderma mastoporum</i>	FRIM 98	AJ627585
<i>Ganoderma mbrekobenum</i>	MIN 850481	NR147647
<i>Ganoderma meridithae</i>	CBS 271.88	NR164435
<i>Ganoderma multipileum</i>	voucher Dai9521	JQ781874
<i>Ganoderma neojaponicum</i>	AS5.541 type 2	AY593867
<i>Ganoderma oregonense</i>	CBS 265.88	JQ781875
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	voucher K(M)120818	AY884185
<i>Ganoderma philippii</i>	voucher E7425	AJ608713
<i>Ganoderma resinaceum</i>	IRAN HSBU2008100	KT343317
<i>Ganoderma sanduense</i>	GACP 18012501	NR164049
<i>Ganoderma shanxiense</i>	BJTC FM423	NR172766
<i>Ganoderma sichuanense</i>	voucher HMAS42798	JQ781877
<i>Ganoderma tsugae</i>	voucher CLZhao 129	MG231528
<i>Ganoderma tropicum</i>	voucher Dai9724	JQ781879
<i>Ganoderma weberianum</i>	isolate SUT H2	AY569451
<i>Ganoderma wiiroense</i>	MIN 938704	NR158480
<i>Ganoderma adpersum</i>	GA1	ON259614
<i>Pycnoporus megacotyle</i>		KJ920285

1- Bootstrap

فرکانس امواج ۵۰ کیلوهرتز بود (۲۷). آزمایش سطح پاسخ RSM با سه متغیر شدت، زمان و دمای صوت‌دهی در سه سطح به روش ^۲BBC به‌وسیله نرم‌افزار Design expert 7 طراحی شد (جدول ۲). این نرم‌افزار سه متغیر تعداد صوت‌دهی (۱، ۲ و ۳ بار صوت‌دهی)، مدت‌زمان صوت‌دهی (۶۰، ۱۸۰ و ۳۰۰ ثانیه) و دما (۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد) را ارائه داد (۲۸). ۱۷ آزمون با سه بار تکرار مستقل انجام شد. معنادار بودن آماری عبارت‌ها در معادله رگرسیونی در سطح اطمینان ۹۵ درصدی ($P < 0/05$) مورد بررسی قرار گرفت. مقدار بهینه متغیرها برای حداکثر تولید گانودریک اسید، به کمک نرم‌افزار تعیین شد.

تولید میسلیم: قارچ‌های جمع‌آوری‌شده پس از ضدعفونی شدن به قطعات کوچک‌تری تقسیم و بر روی محیط کشت PDA^۱ در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سلسیوس کشت و جداسازی شدند.

تهیه محیط کشت مایع برای قارچ‌ها: قارچ‌های خالص‌شده در اندازه ۱×۱ سانتی‌متر در ارلن‌های ۱۰۰ سی‌سی حاوی محیط کشت PDB^۲ مایع با هدف رشد ریشه قارچ‌ها کشت داده شد و درون شیکر در شرایط تاریکی، دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور rpm ۱۵۰ برای مدت‌زمان ۱۴ روز نگهداری شد.

القا محرک و طراحی آزمایش: از حمام فراصوت (ساخت ایران، مدل PARSONIC 2600s) به‌عنوان محرک استفاده گردید. توان خروجی دستگاه ثابت و

جدول ۲- مقدار سطوح مدنظر در آزمایش RSM بر اساس BBD

Table 2. The amount of levels considered in the RSM test based on BBD.

سطح (۱) Level (1)	سطح (۰) Level (0)	سطح (-۱) Level (-1)	منبع تغییرات S.O.V
3	2	1	تعداد صوت‌دهی Number of sound
300	180	60	مدت‌زمان صوت‌دهی Time of sound
50	40	30	دمای صوت‌دهی Temperature of sound

میسلیم به نسبت ۹:۱:۱ کلروفوم، متانول، محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت با دور rpm ۱۵۰ سانتریفیوژ شده و سپس فاز آلی به‌وسیله قیف دکانتور جدا شد (۲۹).

اندازه‌گیری گانودریک اسید درون‌سلولی: ۱۰۰ میلی‌گرم از میسلیم خشک‌شده توسط اتانول ۵۰ درصد (v/v)

مراحل عصاره‌گیری: میسلیم‌ها با ۳ بار غربال از قسمت مایع کشت‌های سوسپانسیونی جدا و بعد از شستشو با آب مقطر خشک شدند. جهت عصاره‌گیری درون‌سلولی، میسلیم‌ها بعد از ۲۴ ساعت سانتریفیوژ با دور rpm ۱۵۰ در حلال متانول با کاغذ واتمن جدا شدند. به‌منظور حذف حلال، از دستگاه تبخیر روتاری^۴ در شرایط خلأ و دمای ۴۰ درجه استفاده و عصاره‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت عصاره‌گیری برون‌سلولی، محیط کشت بدون

- 1- Potato dextrose agar
- 2- Potato dextrose broth
- 3- Box behnken desing
- 4- Rotayt

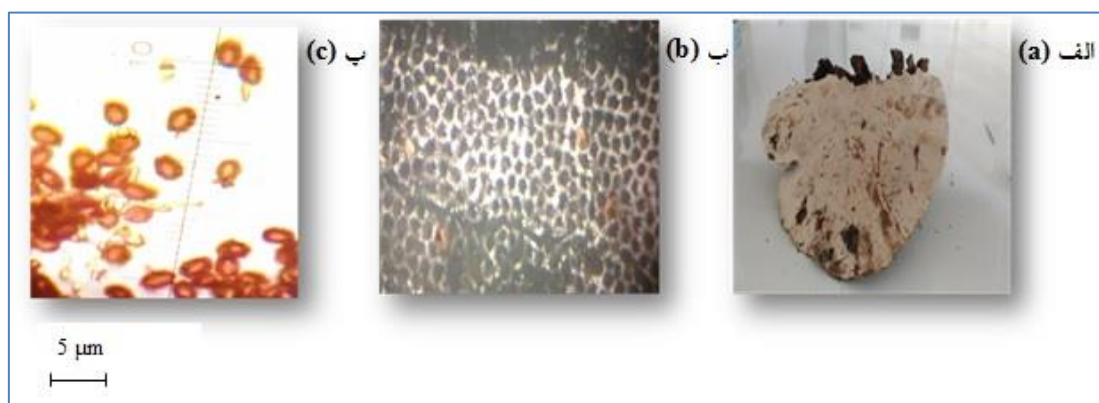
نتایج و بحث

شناسایی مورفولوژیکی: با توجه به شکل و اندازه بازیدیوکارب، منافذ، ساختار ریشه، شکل و اندازه بازیدیواسپور (شکل‌های ۱ و ۲) گونه موردنظر گونه *Ganoderma adspersum* (Schulz.) Donk است (۲۲ و ۲۳).

بازیدیوکارب: چندساله، چوبی، بی‌پایه، نیم‌دایره تا ۱۷×۱۶×۶ سانتی‌متر، کلاهِک قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره، در حالت خشک بسیار سخت؛ تقسیم‌بندی شده با حلقه‌های شیاردار متحدالمرکز، زمانی که خشک می‌شود تا حدودی ترک بر می‌داشت، سطح پوسته سخت. بافت نسبتاً نازک تا ۴ سانتی‌متر ضخامت، قهوه‌ای تیره، چوب‌پنبه‌ای. منافذ: ۴-۵ در میلی‌متر، سطح منافذ خاکستری مایل به سفید تا قهوه‌ای روشن، رنگ منافذ معمولاً همگن با قرمز مایل به نارنجی تا قهوه‌ای، وقتی خشک می‌شود به رنگ زرد کم‌رنگ می‌شود. ساختار ریشه: سیستم ریشه دو تریمیتیک، با اتصالات میله‌ای، نارنجی، زرد مایل به قهوه‌ای. بازیدیوسپورها عمدتاً بیضوی تا بیضوی گسترده، گاهی اوقات تخم‌مرغی شکل، با دیواره‌های دوتایی، با محدوده اندازه ۵/۷-۶/۷-۷/۶ × ۸/۶-۹/۶-۱۰/۵ μm .

به مدت یک هفته استخراج شد. محلول حاصل تحت خلأ و ۵۰ درجه سلسیوس خشک‌شده سپس رسوب باقی‌مانده در ۵ میلی‌لیتر آب حل شد و توسط ۵ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج گردید. گانودریک اسید موجود در کلروفرم توسط NaHCO_3 ۵ درصد (w/v) جدا شد. با استفاده از HCl ، pH محلول به کم‌تر از ۳ رسانده شد. گانودریک اسید موجود در لایه NaHCO_3 توسط کلروفرم استخراج و کلروفرم باقی‌مانده توسط تبخیر در ۴۰ درجه سلسیوس جداسازی شد. رسوب گانودریک اسید به‌جامانده در اتانول به‌طور کامل حل و میزان جذب آن در ۲۴۵ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. با استفاده از نمودار استاندارد تیمول مقدار گانودریک اسید در هر نمونه تعیین گردید (۳۰).

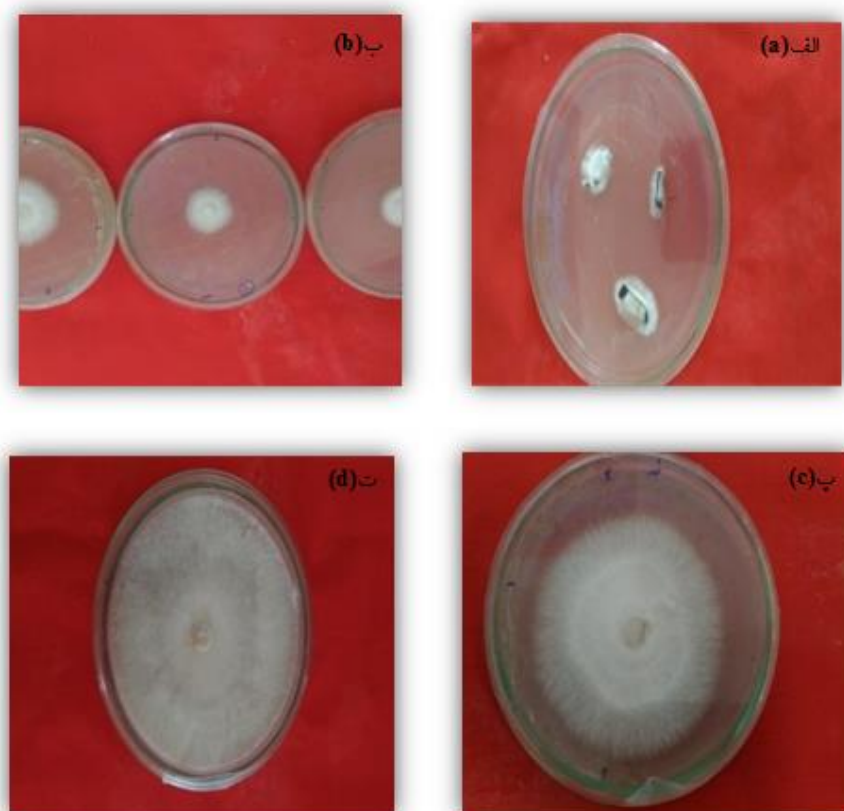
اندازه‌گیری گانودریک اسید خارج سلولی: گانودریک اسید خارج سلولی از محیط سوپرناتانت استخراج گردید، محیط کشت جداشده از میسلیم به نسبت ۴:۱ با اتانول ۹۶ درصد مخلوط شد و سپس توسط حلال کلروفرم استخراج گردید. سایر مراحل استخراج مشابه گانودریک اسید درون سلولی انجام شد (۳۱).



شکل ۱- ویژگی‌های ماکرو و میکرو مورفولوژیکی قارچ *G. adspersum*.

الف: بازیدیوکارب، ب: منافذ (بزرگنمایی ۴۰X)، پ: بازیدیوسپورها (بزرگنمایی ۴۰X).

Figure 1. Macro and micromorphological characteristics of *G. adspersum*. a: Basidiocarp; b: Pores (zoom 40X); c: Basidiospores (zoom 40X).

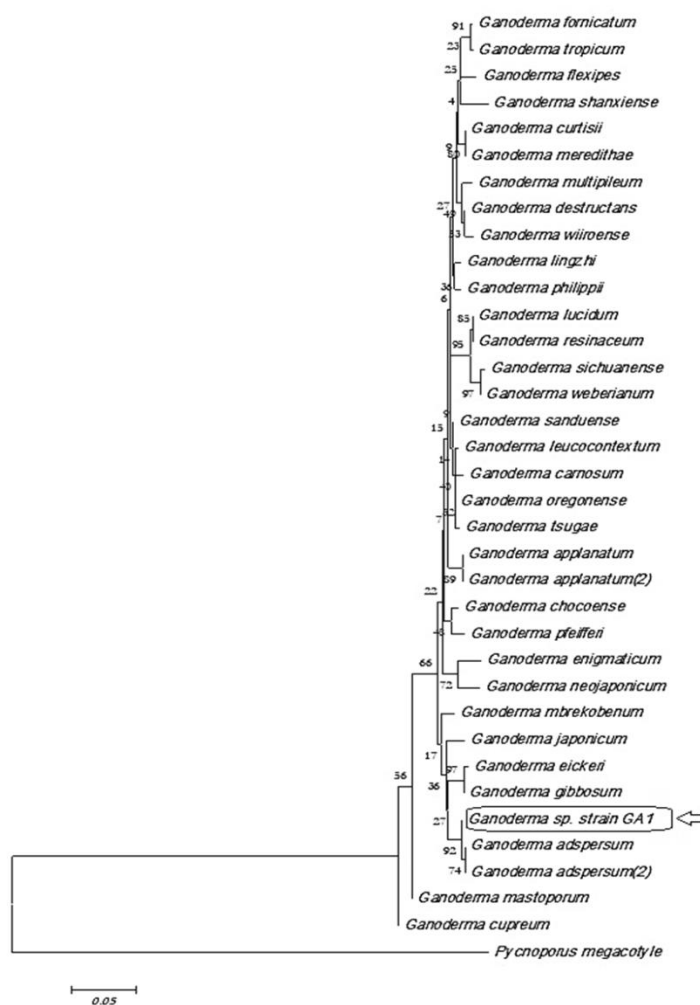


شکل ۲- الف: رشد میسلیم اولیه از *G. adspersum* (در ۵ روز)، ب: رشد پرگنه در محیط کشت PDA در ۳ روز و دمای ۲۵ °C، پ: در ۶ روز، ت: در ۸ روز.

Figure 2. a: Early mycelium growth from *Ganoderma adspersum* (for 5 days); b: Mycelial colonies of *G. adspersum*: grown on PDA for 3 days and 25 °C; c: for 6 days, d: for 8 days.

(شکل ۳). با توجه به فیلوگرام که بین گونه‌های مختلف *Ganoderma* کشیده شده است جایگاه فیلوژنتیکی قارچ ما نشان می‌دهد که دقیقاً کنار *G. adspersum* در یک شاخه قرار می‌گیرد.

شناسایی مولکولی: بر اساس آنالیز BLASTn، توالی ITS ما ۹۹/۴۷ درصد شبیه به سویه *G. adspersum* IRAN HSBU200894 بود. توالی به‌دست آمده در بانک ژن (NCBI) ثبت شد و شماره دسترسی ON259614 برای آن دریافت شد.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیک با روش Neighbor-Joining با استفاده از توالی‌های ITS4 و ITS5 برخی از گونه‌های گانودرما به منظور نشان دادن موقعیت فیلوژنتیک جدایه ما.

Figure 3. Phylogenetic tree constructed with the Neighbor-Joining method using ITS sequences of some *Ganoderma* species to show the phylogenetic position of our isolate.

تفکیک دو گونه از هم بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی کشت‌های بازیدیوم یا میسلیم به‌سختی امکان‌پذیر است و احتمال اشتباه به‌مراتب زیاد است. در چنین مواردی استفاده از روش‌های مولکولی ضرورت دارد. باوجود استفاده از کلید شناسایی شباهت ظاهری زیاد دو گونه باعث شد اطمینان خاطر حاصل نشود ضمن این‌که نمونه‌های پژوهش حاضر از میزبان ممرز برداشت شده بود و هر دو گونه *G. adspersum* و *G. applanatum* روی این میزبان گزارش شده‌اند، بنابراین شبهه بیش‌تری برای

گونه‌های گانودرما یک منبع طبیعی غنی از تری‌ترپنوئیدها با طیف گسترده‌ای از ارزش‌های درمانی هستند، به‌ویژه اسید گانودریک معروفیت بیش‌تری دارد. مطالعات زیادی در خصوص برخی گونه‌ها انجام‌شده ولی درباره برخی دیگر مانند *G. adspersum* اطلاعات زیادی در دسترس نیست (۴). *G. adspersum* در شمال ایران بر روی میزبان‌های لیلکی، کاج، شب‌خسب، ممرز، انجیلی، بلوط و راش گزارش شده است (۳۲). به دلیل شباهت مورفولوژیکی زیاد این‌گونه با *G. applanatum*.

از DNA میسلیم جدا شده از این قارچ، به‌عنوان *G. adspersum* تأیید گردید (۳۳).

ارتباط سایز قارچ طبیعی با میزان گانودریک اسید: گانودریک اسید برای قارچ‌های با سایز کوچک، متوسط، بزرگ اندازه‌گیری شد و نتیجه به‌دست‌آمده نشان داد که بین سه سایز قارچ تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳).

شناسایی به وجود آمد؛ بنابراین شناسایی مولکولی انجام گرفت و گونه *G. adspersum* تأیید شد. در پژوهش حاضر این‌گونه برای اولین بار در جنگل شصت‌کلاته گرگان در جنگل‌های هیرکانی گزارش می‌شود. در ارمنستان نیز، *G. adspersum* ابتدا در سال ۲۰۰۲، بر روی *Fraxinus* sp. در پارک شهر ایروان جمع‌آوری و از نظر مورفولوژیکی به‌عنوان *G. applanatum* شناخته شد و بعداً با استفاده

جدول ۳- مقایسه گانودریک اسید در سایزهای مختلف *G. adspersum* با آزمون ANOVA.

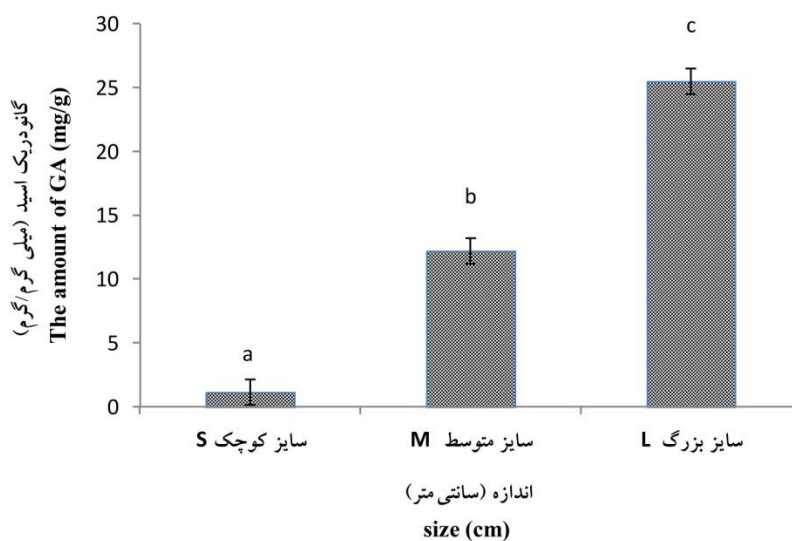
Table 3. Comparison of GA in different sizes of *G. adspersum* with ANOVA test.

Sig.	F	میانگین مربعات Mean Square	درجه آزادی Df	جمع مربعات Sum of Squares	
0.000*	222.574	0.650	2	1.301	بین گروهی Between Groups
		0.003	6	0.018	درون گروهی Within Groups
			8	1.318	کل Total

* معنی‌داری در سطح ۰/۰۵

میزان گانودریک اسید را داراست و این سایز قارچ برای سایر مراحل پژوهش انتخاب شد (شکل ۴).

هم‌چنین مقایسه میانگین سه سایز قارچ نشان داد قارچ با سایز بزرگ (۲۱ × ۱۶ سانتی‌متر) بالاترین



شکل ۴- میانگین گانودریک اسید در سایزهای مختلف *G. adspersum*.

Figure 4. Average GA in different sizes of *G. adspersum*.

با دو روش در قارچ بالغ و به دو روش دیگر در قارچ کوچک بیش‌تر است (۳۴). کور و همکاران (۲۰۱۷) عنوان داشتند که اندام‌های بارده *G. lucidum* دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت مهار آنزیم استیل کولین استراز بالاتری در مقایسه با قارچ نابالغ است. همچنین مقدار فنل کل در اندام‌های بارده قارچ بالغ *G. lucidum* از قارچ نابالغ بیش‌تر است (۳۵). میزان گانودریک اسید کل در قارچ با سایز بزرگ‌تر (۱۶×۲۱ سانتی‌متر) ۲۵/۴۸ mg/g بود. از همین سایز قارچ برای کشت‌های آزمایشگاهی استفاده و با هدف افزایش میزان گانودریک اسید کشت‌های سوسپانسیون تحت‌تأثیر محرک امواج فراصوت قرار گرفتند.

تحلیل داده‌های حاصل از بهینه‌سازی شرایط صوت‌دهی به روش RSM: یک طرح آزمایش مطابق روش باکس بنکن برای سه عامل مهم تعداد صوت‌دهی، زمان صوت‌دهی و دمای لازم برای صوت‌دهی به هر نمونه در قالب ۱۷ آزمایش با پنج نقطه مرکزی طراحی و آزمایش‌ها مطابق آن انجام شد. طراحی انجام‌شده و پاسخ‌های حاصل شامل میزان گانودریک اسید برون‌سلولی و درون‌سلولی و مقدار گانودریک اسید کل در جدول ۴ نشان داده شده است.

ترپنوئیدهای گونه‌های گانودرما از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. گانودریک اسید به‌عنوان یک تری‌ترین از مهم‌ترین ترپنوئیدهای آن محسوب می‌شود. شهرت جهانی *G. lucidum* به‌عنوان منبع اصلی تولید این ماده مؤثره مفید باعث شده بیش‌تر مطالعات بر آن تأکید داشته باشند و از طرفی بهره‌برداری مردمی از جنگل‌ها هم به‌شدت در حال انجام است. به‌این‌ترتیب در صورتی که به دنبال تولید پایدار از این ترکیب مؤثر، بدون آسیب به طبیعت، باشیم بهتر است از گونه‌های دیگر گانودرما به‌عنوان منابع جایگزین استفاده کنیم. کشت آزمایشگاهی گونه *G. adspersum* که خود به‌صورت پارازیت یا ساپروفیت روی درختان زنده یا برخی اوقات روی کنده‌های درختان یافت می‌شود به‌عنوان یک جایگزین نسبتاً مناسب در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج حاصل مشخص شد که هرچه سایز بازیدیوکارپ قارچ بزرگ‌تر باشد میزان گانودریک اسید بیش‌تری را داراست. با افزایش سن بازیدیوکارپ قارچ فرصت بیش‌تری دارد تا گانودریک اسید بیش‌تری تولید یا از درخت میزبان جذب کند. مایو و همکاران (۲۰۰۵) با مقایسه قارچ‌های کوچک و بالغ *G. tsugae* گزارش دادند اسکوربیک اسید، بتاکاروتن، آلفا توکوفرول، گاما توکوفرول در قارچ کوچک نسبت به قارچ بالغ کم‌تر بود. هم‌چنین آن‌ها در اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان به چهار روش عنوان داشتند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی

جدول ۴- چیدمان طراحی آزمایش باکس بنکن و نتایج به دست آمده.

Table 4. Design layout of the Bencken box experiment and the results obtained.

پاسخ‌ها Responses			متغیرها Variables			آزمایش Run No.
گانودریک اسید کل (mg/g) total GA (mg/g)	گانودریک اسید درون سلولی (mg/g) Intracellular GA (mg/g)	گانودریک اسید برون سلولی (mg/g) Extracellular GA (mg/g)	C دمای صوت‌دهی Temperature of sound	B زمان صوت‌دهی Time of sound	A تعداد صوت‌دهی Number of sound	
46.0838	31.2644	14.8194	50	180	1	1
29.0680	19.1021	9.96597	30	180	3	2
32.2565	25.0288	7.22775	40	300	3	3
66.288	42.0445	24.2435	50	300	2	4
75.4974	45.233	30.2644	30	300	2	5
70.1675	44.877	25.2906	40	180	2	6
48.0838	35.8822	12.2016	30	180	1	7
56.8639	35.7618	21.1021	50	60	2	8
68.3822	43.3534	25.0288	40	180	2	9
56.0785	36.2853	19.7932	30	60	2	10
76.6387	44.7565	31.8822	40	180	2	11
70.2408	43.5209	26.7199	40	180	2	12
39.9634	29.5	10.4634	40	300	1	13
22.2617	14.7932	7.46859	40	60	3	14
63.4555	40.7827	22.6728	40	180	2	15
43.5183	26.2906	17.22775	40	60	1	16
21.4031	13.3168	8.08639	50	180	3	17

مورد مطالعه وجود ندارد. این تحلیل هم‌چنین نشان می‌دهد که توان دوم تعداد صوت از عوامل تأثیرگذار بر مدل پیشنهادی می‌باشند.

طبق تحلیل انجام شده توسط نرم‌افزار، تعداد صوت‌دهی و مدت زمان صوت‌دهی به هر نمونه تأثیر معنی‌داری بر میزان تولید گانودریک اسید داشته است (جدول ۵). طبق این تحلیل برهمکنشی بین متغیرهای

جدول ۵- آنالیز واریانس و ضرایب رگرسیون تخمین زده شده تولید گانودریک اسید کل.

Table 5. Analysis of variance and estimated regression coefficients of total GA production.

p-Value	F-Value	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean Squares	جمع مربعات Sum of Squares	مدل Model
< 0.0001	22.93	9	587.74	5289.68	تعداد صوت‌دهی (A) Number of sound
0.0002	25.75	1	659.93	659.93	زمان صوت‌دهی (B) Time of sound
0.0001	6.07	1	155.61	155.61	دمای صوت‌دهی (C) Temperature of sound
0.9779	1.60	1	40.90	40.90	(AB)
0.5128	1.79	1	45.90	45.90	(AC)
0.5880	0.31	1	8.02	8.02	(BC)
0.7259	0.97	1	24.97	24.97	(A ²)
< 0.0001	161.96	1	4151.31	4151.31	(B ²)
0.6274	2.47	1	63.30	63.30	(C ²)
0.4156	0.81	1	20.71	20.71	باقیمانده Residual
		7	25.63	179.42	عدم برازش مدل Lack of Fit
0.3787	1.34	3	30.02	90.06	خطای خالص Pure Error
		4	22.34	89.36	

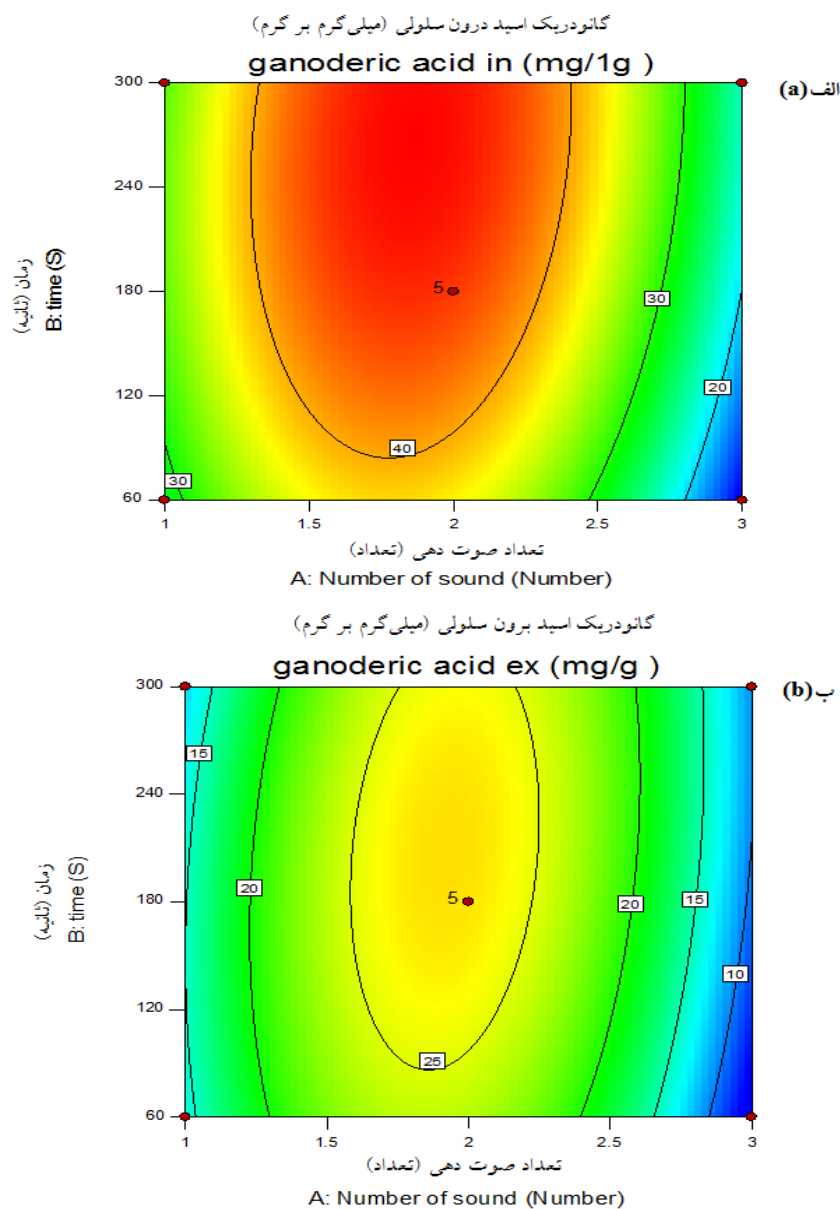
به‌مراتب بیش‌تر از تیمارهای یک و سه بار صوت‌دهی شده است (شکل ۵).

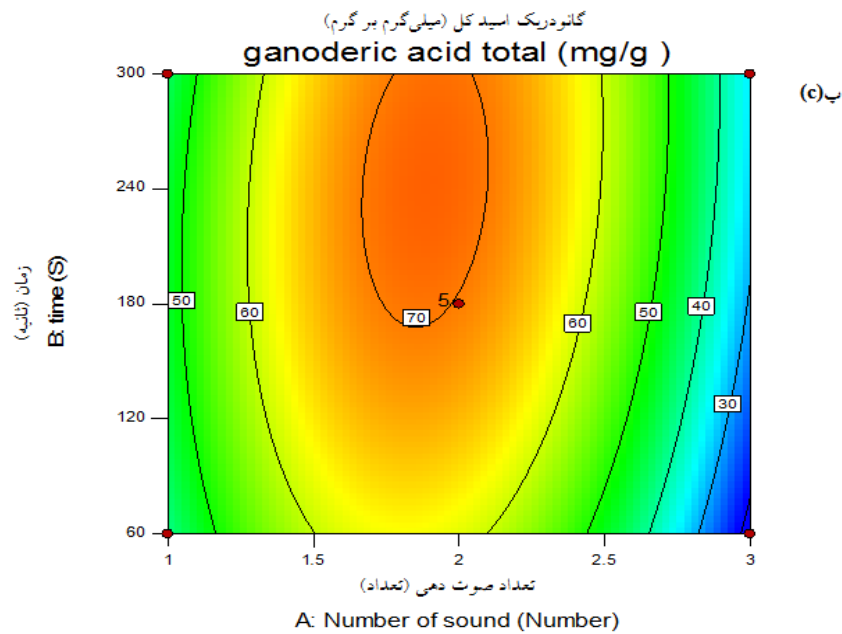
نرم‌افزار Design Expert با استفاده از نتایج ۱۷ آزمایش انجام‌شده و بررسی اثر مدت‌زمان، دما و تعداد صوت‌دهی بر تولید گانودریک اسید نشان داد دوره‌های صوت‌دهی ۲۸۲ ثانیه می‌توانند بیش‌ترین تأثیر را بر افزایش تولید گانودریک اسید داشته باشند. شکل ۶ شرایط بهینه معرفی‌شده توسط نرم‌افزار شامل دو مرتبه صوت‌دهی با دمای ۳۰ درجه و ۲۸۲ ثانیه را نشان می‌دهد.

نرم‌افزار یک مدل رگرسیون غیرخطی برای تولید گانودریک اسید کل بر اساس متغیرهای کد به‌صورت معادله زیر پیشنهاد نمود:

$$\text{Total GAs} = 69.78 - 9.08 A + 4.41 B - 2.26 C + 3.39 AB - 1.42 AC - 2.50 BC - 31.40 A^2 - 3.88 B^2 - 2.22 C^2$$

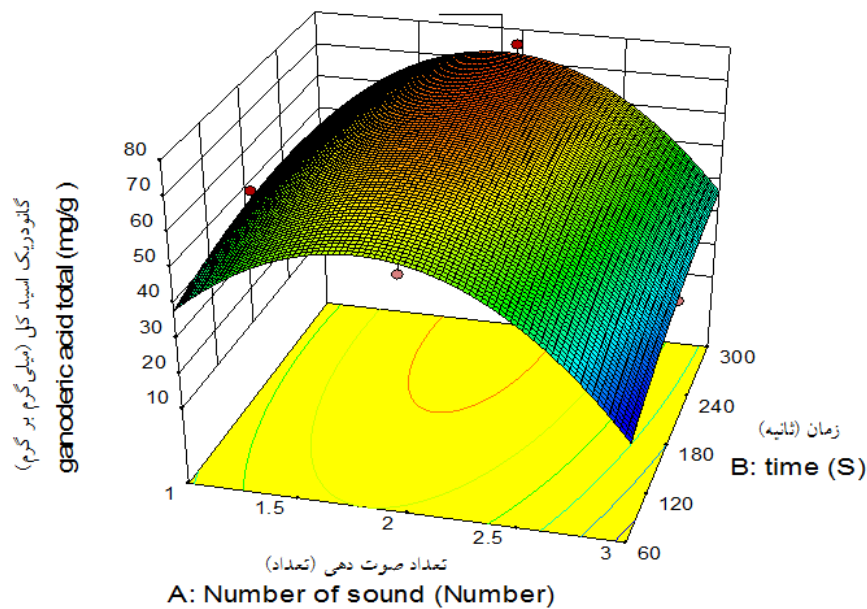
تصاویر دوبعدی به‌دست‌آمده از مقایسه تأثیر عوامل مختلف نشان می‌دهد که اثر تحریک‌کنندگی امواج فراصوت در تیمارهای دو بار صوت‌دهی شده





شکل ۵- نمایش دوبعدی تأثیر تعداد صوت‌دهی، دما و زمان صوت‌دهی بر: الف) گانودریک اسید درون‌سلولی، ب) گانودریک اسید برون‌سلولی، پ) گانودریک کل.

Figure 5. Two-dimensional representation of the effect of sound number, temperature, and sound time on a) intracellular GA, b) extracellular GA, and c) total GA.



شکل ۶- نمایش سه‌بعدی تأثیر تعداد صوت‌دهی، زمان صوت‌دهی و دمای صوت‌دهی، بر گانودریک اسید کل.

Figure 6. Three-dimensional representation of the effect of sound number, sound time, and sound temperature on total GA.

(۲۰۱۴) از طرح باکس بتن برای بهینه‌سازی زمان امواج فراصوت، زمان چرخه کاری و زمان کشت به‌منظور تولید بالای پلی‌ساکاریدهای *Phellinus igniarius* استفاده کردند که ۲۲/۶۴ درصد در مقایسه با نمونه شاهد افزایش داشته است (۴۲). نوجوکی و همکاران (۲۰۱۶) با مقایسه نمونه‌های صوت‌دهی شده با شاهد (فاقد صوت‌دهی) افزایش گانودریک اسید خارج‌سلولی به نسبت گانودریک اسید داخل سلولی را گزارش نمودند (۳۸). در پژوهش حاضر افزایش ۶۰ درصدی گانودریک اسید کل پس از اعمال محرک (۲ بار صوت‌دهی)، نسبت به تیمار شاهد (۷۹/۲۱ میلی‌گرم در هر گرم توده زیستی نسبت به ۴۹/۴۶ میلی‌گرم در هر گرم) را شاهد بودیم. اعمال محرک بهینه امواج فراصوت با فرکانس پایین (۲۰-۵۰ کیلوهرتز) می‌تواند با موفقیت سنتز متابولیت‌های ثانویه مانند ایزوفلاون‌ها (۴۳)، پلی‌ساکاریدها (۴۲) و هم‌چنین فعالیت‌های آنزیمی (۴۴) را تقویت کند.

از سوی دیگر نمونه‌هایی که به تعداد ۲ مرتبه صوت‌دهی شده‌اند دچار تنش شده‌اند و به‌مراتب گانودریک اسید بیش‌تری تولید کرده‌اند، هم‌چنین نمونه‌هایی که به تعداد ۳ مرتبه صوت‌دهی شده‌اند باعث کاهش تولید گانودریک اسید شده‌اند. علاوه بر این، فرکانس بیش‌ازحد امواج فراصوت می‌تواند تا حدودی به میسلیم آسیب برساند (۴۵). برتری دو بار صوت‌دهی با امواج فراصوت در استخراج ترکیبات ثانویه در موارد دیگری نیز گزارش شده است (۴۶، ۴۷ و ۴۸).

بیش از دو بار صوت‌دهی ممکن است به سلول‌های زنده آسیب وارد کرده و از رشد آن‌ها جلوگیری کند به همین دلیل مقدار میسلیم تولیدی بسیار کم‌تر خواهد بود که در بازدهی اثر منفی خواهد داشت. از سوی دیگر مهم‌ترین مزیت استفاده از محرک‌ها علاوه برافزایش تولید دارو، امکان‌پذیری و قیمت تمام‌شده است. تعداد زیاد صوت‌دهی علاوه بر

نتایج نشان داد امواج فراصوت، محرک خوبی بوده و می‌تواند درکشت مایع قارچ *G. adspersum* تولید گانودریک اسید را تغییر دهد. بااین‌که ترکیبات شیمیایی از پرتفردارترین محرک‌ها در کارهای تحقیقاتی این‌چینی هستند (۳۶) و استفاده از محرک‌های شیمیایی همچون فنوباریتال (۳۷) و ریفامپین (۳۸)، سلولاز (۳۹) آسپرین و متیل جاسمونات به‌صورت هم‌افزایی (۴۰) با هدف افزایش گانودریک اسید سابقه داشته و اثرات مثبت آن‌ها گزارش شده است ولی محرک‌های فیزیکی از جمله امواج فراصوت به سهولت و احتمالاً با هزینه کم‌تر قابل‌استفاده هستند. تاکنون بیش از ۵۰ نوع گانودریک اسید شناخته‌شده است که هر کدام خواص و کاربردهای متفاوتی دارند (۴۱). محرک‌های مختلف هر کدام از مسیرهای جداگانه‌ای تولید برخی گانودریک اسیدها را افزایش می‌دهند درعین‌حال ممکن است بر تولید برخی گانودریک اسیدها تأثیر منفی داشته باشند، به همین علت هر محرکی که افزایش‌دهنده گانودریک اسید باشد، ارزش خالص خود را دارد و با محرک‌های دیگر متفاوت است (۴۱). در این پژوهش اثر تحریک‌کنندگی امواج فراصوت، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین محرک‌های مکانیکی شناخته‌شده، به‌منظور افزایش تولید گانودریک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت و با کمک روش سطح پاسخ شرایط بهینه فرآیند صوت‌دهی مشخص شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، امواج فراصوت می‌تواند به‌عنوان یک محرک غیرشیمیایی و ارزان‌قیمت، تولید گانودریک اسید را افزایش دهند. افزایش گانودریک اسید برون‌سلولی نسبت به گانودریک اسید درون‌سلولی نشان می‌دهد احتمالاً شوک مکانیکی حاصل از امواج فراصوت روی دریچه‌های سلولی قارچ تأثیر گذاشته و موجب خروج بیش‌تر این متابولیت از سلول‌های قارچ شده است. این موضوع در آزمایش‌های با شوک ۱۸۰ و ۳۰۰ ثانیه به‌وضوح مشخص است. ژانگ و همکاران

گانودریک اسید کل، درون سلولی و برون سلولی نشان داد که میزان گانودریک اسید با القا محرک امواج فراصوت به طور معنی داری افزایش یافته است.

این که در فرمانتور مشکل ایجاد می‌کند، روش مناسبی به نسبت سایر محرک‌ها نمی‌باشد.

بین گانودریک اسید کل، درون سلولی و برون سلولی بهینه شده و شاهد اختلاف معنی داری وجود داشت (جدول ۶). مقایسه محرک بهینه شده با نمونه شاهد در

جدول ۶- مقایسه اختلاف معنی داری بین گانودریک اسید بهینه شده و شاهد با آزمون تی تست.

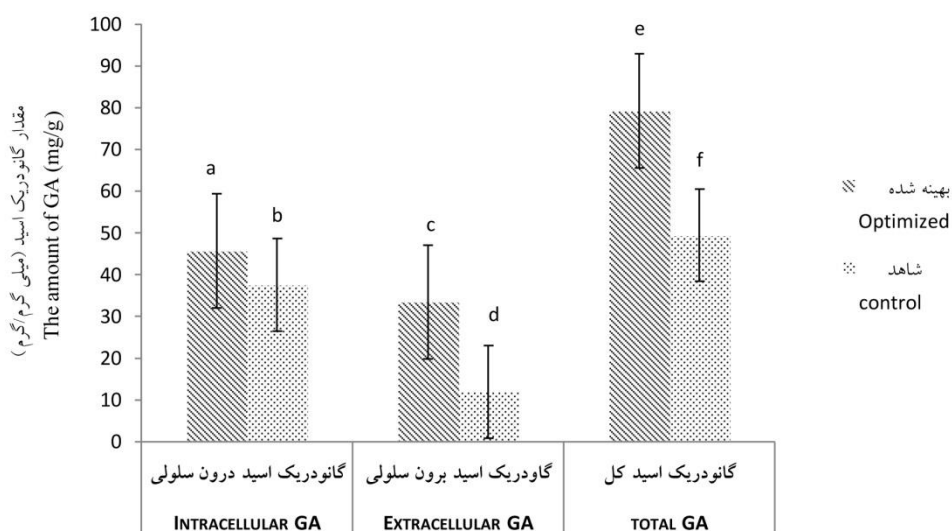
Table 6. Comparison of the significant difference between the optimized GA and control with the T-test.

Sig.	t	درجه آزادی Df	اشتباه معیار Std. Error Difference	گانودریک اسید بهینه شده Optimized GA شاهد Control	گانودریک اسید درون سلولی Intracellular GA
0.000*	22.00	4	0.408	گانودریک اسید بهینه شده Optimized GA شاهد Control	گانودریک اسید برون سلولی Extracellular GA
0.000*	55.98	4	0.278	گانودریک اسید کل total GA	گانودریک اسید کل total GA

* معنی داری در سطح ۰/۰۵

گانودریک اسید برون سلولی نسبت به درون سلولی در معرض امواج فراصوت بیشتر بوده است (شکل ۷).

تأثیر محرک امواج فراصوت در گانودریک اسید برون سلولی بیشتر است به عبارتی میزان افزایش



شکل ۷- میانگین گانودریک اسید بهینه شده و شاهد در *G. adspersum*

Figure 7. The average of optimized ganoderic acid and control in *G. adspersum*.

پلی ساکاریدهای برون سلولی را به ۲۱۸/۷۸ میلی گرم بر گرم برساند که ۲/۵۲ برابر بیش تر از نمونه شاهد بود (۵۱). یا افزایش نفوذپذیری غشاء توسط امواج فراصوت و آسیب غشایی (که عمدتاً به دلیل افزایش ROS و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء ایجاد می شود) آزاد شدن متابولیت های ثانویه از سلول ها حادث می شود (۵۳).

اثرات بیولوژیکی مثبت ناشی از امواج فراصوت با فرکانس پایین منجر به الف: تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی و افزایش سرعت رشد سلولی، ب: تغییر در ترکیب مولکولی و تشدید فرآیندهای واکنش می شود (۵۴). اثرات کاویتاسیون (رشد و فروپاشی میکرو حباب های موجود تحت تأثیر امواج فراصوت در مایعات)، مکانیکی و حرارتی امواج فراصوت همگی منجر به تغییرات مثبت در نفوذپذیری غشای سلولی می شود (۵۵). امواج فراصوت با فرکانس پایین به عنوان یک تکنیک فیزیکی، با مصرف انرژی کم و کاهش زمان پردازش و اثرات حرارتی می تواند نفوذپذیری غشای سلولی را بهبود بخشد، هم چنین این امواج به عنوان یک استرس فیزیکی عمل می کنند که بر فرآیندهای بیولوژیکی، بیوشیمیایی و رشد سلول های گیاهی تأثیر می گذارد (۵۶).

نتیجه گیری کلی

بر اساس نتایج حاصل از روش سطح پاسخ، اثر تحریک کنندگی امواج فراصوت در تیمارهای دو بار صوت دهی شده به مراتب بیشتر از تیمارهای یک و سه بار صوت دهی شده است. دوره های صوت دهی ۲۸۲ ثانیه با دمای ۳۰ درجه می توانند بیش ترین تأثیر را بر افزایش تولید گانودریک اسید داشته باشند. با توجه به نیاز به برداشت وسیع از جنگل و عدم امکان دسترسی مداوم به جنگل، جایگزین نمودن روش های نوین کشت فارچ در شرایط آزمایشگاهی به جای جمع آوری

القائنده ها یا محرک ها با راه اندازی زنجیره انتقال پیام از طریق استرس اکسیداتیو ایجاد شده که همراه با تولید H_2O_2 است، متابولیسم ثانویه را در سلول ها القاء نموده و باعث افزایش تولید متابولیت های ثانویه از جمله گانودریک اسید می شوند (۴۹). با توجه به ارتقای مؤثر در انتقال جرم، فراصوت اثر مفیدی بر تولید متابولیت های فارچی در برخی موارد داشت (۵۰). لو و همکاران (۲۰۲۰) گزارش دادند امواج فراصوت و زمان قرار گرفتن در معرض این محرک می تواند رشد میسلیموم *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc. Chaidam و تجمع پلی ساکاریدهای برون سلولی را افزایش دهد (۵۱). با این حال، پس از طولانی شدن زمان تحریک امواج فراصوت برای ۱۲/۵-۷/۵ دقیقه، تولید پلی ساکاریدهای برون سلولی به طور مداوم افزایش یافت، در حالی که قطعات میسلیموم قابل مشاهده بیش تری وجود داشت که ممکن است مربوط به پارگی جزئی میسلیموم ناشی از محرک بیش از حد امواج فراصوت باشد؛ بنابراین این امواج می تواند ترشح پلی ساکاریدهای برون سلولی را از هر واحد میسلیموم افزایش دهد (۵۱). در مطالعه زارع و همکاران (۲۰۱۴)، ترکیب امواج فراصوت (۱۰ ثانیه) و تغذیه ال تیروزین (۲ میلی مولار) به طور قابل توجهی تولید تبیین را افزایش داد (۵۲).

رضایی و همکاران (۲۰۱۱) محتوای تاکسول برون سلولی و درون سلولی فندق (*Corylus avellana* L.) را در معرض امواج فراصوت قرار دادند، تاکسول برون سلولی و درون سلولی هر دو افزایش یافتند اگرچه افزایش تاکسول برون سلولی بارزتر بود. در مقایسه با سلول های شاهد، یک و دو بار قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت حدود ۲ و ۲/۷ برابر تاکسول برون سلولی و حدود ۱/۲ و ۱/۸ برابر تاکسول درون سلولی افزایش یافت (۵۳). علاوه بر این، شش بار تیمار ۵ دقیقه ای امواج فراصوت می تواند مقدار

اسیدهای موجود در قارچ *G. adspersum* و مسیر اثر آن پرداخته شود.

از جنگل امری ضروری است. پژوهش حاضر به‌عنوان یک مطالعه مقدماتی بوده و نیاز است در مطالعات آینده به ارزیابی اثر امواج فراصوت به انواع گانودریک

منابع

1. Fei, Y., Li, N., Zhang, D. H., & Xu, J. W. (2019). Increased production of ganoderic acids by overexpression of homologous farnesyl diphosphate synthase and kinetic modeling of ganoderic acid production in *Ganoderma lucidum*. *Microbial Cell Factories*. 18, 115. 1-9.
2. Xiao, H., & Zhong, J. J. (2016). Production of useful terpenoids by higher-fungus cell factory and synthetic biology approaches. *Trends Biotechnol.* 34, 242-55.
3. You, B. J., Tien, N., Lee, M. H., Bao, B. Y., Wu, Y. SH., Hu, T. C., & Lee, H. Z. (2017). Induction of apoptosis and ganoderic acid biosynthesis by cAMP signaling in *Ganoderma lucidum*. *Scientific Reports*. 7 (318), 1-13.
4. Tel-Çayan, G., Öztürk, M., Duru, M. E., Rehman, M., Adhikari, A., Türkođlu, A., & Choudhary, M. I. (2015). Phytochemical investigation, antioxidant and anticholinesterase activities of *Ganoderma adspersum*. *Industrial Crops and Products*. 76, 749-754.
5. Omid, M., & Farzin, N. (2012). Biotechnology solutions in increasing the efficiency of medicinal plants. *Modern Genetic J.* 7 (3), 220-209.
6. Abdul Malik, N. A., Kumar, I. S., & Nadarajah, K. (2020). Elicitor and receptor molecules: Orchestrators of plant defense and immunity. *International J. of Molecular Sciences*. 21 (963), 1-34.
7. Naik, P. M., & Al-Khayri, J. M. (2016). Impact of abiotic elicitors on in vitro production of plant secondary metabolites: A Review. *J. of Advanced Research in Biotechnology*. 1 (2), 7p.
8. Rahmatinia, M., Moradi, M., Ghasemi Omran, V., & Hadadinejad, M. (2018). The effect of different magnetic field duration on direct organogenesis of African violets (*Saintpaulia Ionantha*) In tissue culture medium with and without pgrs. *J. of Crop Breeding*. 9 (24), 103-111.
9. Meng, L., Bai, X., Zhang, S., Zhang, M., Zhou, S., Mukhtar, I., Wang, L., Li, Z., & Wang, W. (2019). Enhanced ganoderic acids accumulation and transcriptional responses of biosynthetic genes in *Ganoderma lucidum* Fruiting bodies by elicitation supplementation. *International J. of Molecular Sciences*. 20 (2830), 1-11.
10. Esmailzadeh, M., Kianirad, M., Sheykhejad, A., Khosravi, A., & Sharifzadeh, A. (2019). Ganoderic acid and exopolysaccharide production by *Ganoderma lucidum* from semi-solid-state and submerged fermentation. *Biological J. of Microorganism*. 7 (28), 63-75.
11. Yanru, H., Shakeel, A., Jiawei, L., Biaobiao, L., Zengyan, G., Qiyun, Z., Xiaohua, L., & Xuebo, H. (2017). Improved Ganoderic acids production in *Ganoderma lucidum* by wood-decaying components. *Scientific reports*. 7 (46623), 1-10.
12. Wei, Z. H., Liu, L. L., Guo, X. F., Li, Y. J., Hou, B. C., Fan, Q. L., Wang, K. X., Luo, Y. D., & Zhong, J. J. (2016). Sucrose fed-batch strategy enhanced biomass, polysaccharide, and ganoderic acid production in the fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 39, 37-44.
13. Hu, G., Zhai, M., Niu, R., Xu, X., Liu, Q., & Jia, J. (2018). Optimization of culture condition for ganoderic acid production in *Ganoderma lucidum* liquid static culture and design of a suitable bioreactor. *Molecules*. 23 (2563), 1-12.
14. Vasilevski, G. (2003). Perspectives of the application of biophysical methods in sustainable agriculture. *Bulgarian J. Plant Physiology* (Special Issue). 179-186.

15. Cui, Y., Lu, J., Liu, C., Chen, S., Ma, C., Liu, Z., Wang, J., & Kang, W. (2020). Ionic Liquid-Based Ultrasonic-Assisted Extraction Coupled with HPLC and Artificial Neural Network Analysis for *Ganoderma lucidum*. *Molecules*. 25 (6), 1-16.
16. Maleki, M. (2014). Effect of methyl jasmonate and ultrasonic on secondary metabolite production in cell suspension culture of *Aloe barbadensis* Mill [Dissertation, Thesis on Agronomy and plant breeding]. Tehran: Tehran University.
17. Sun, L., Liu, L. P., Wang, Y. Z., Yang, L., Zhang, C., Yue, M. X., Dabbour, M., Mintah, B. K., & Wang, L. (2022). Effect of ultrasonication on the metabolome and transcriptome profile changes in the fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Microbiological Research*. 254 (126916), 1-9.
18. Moradali, M. F., Hedjaroude, G. A., Mostafavi, H., Abbasi, M., Ghods, S., & Sharifi-Tehrani, A. (2007). The genus *Ganoderma* (Basidiomycota) in Iran. *Mycotaxon*, 99, 251-269.
19. Sabeti, H. A. (2008). Iran's forests, trees, and shrubs. Yazd University Press, fifth edition, 806p.
20. Aghajani, H., Marvie Mohadjer, M. R., Asef, M., & Shirvany, A. (2014). The relationship between wood-decay fungi abundance and some morphological features of hornbeam (Case study: Kheyroud forest, Noshahr). *Forest and range protection research*. 12 (1), 55-65.
21. Aghajani, H. (2012). Study on the oak (*Quercus castaneifolia*) and Hornbeam a (*Carpinus betulus*) decaying macrofungi in mixed Oak-Hornbeam forest community in Kheyroud forest, North of Iran, M.Sc. thesis, Department of Forestry and Forest Economics, Faculty of Natural resources, Tehran University, 95p.
22. Ryvarde, L. (1991). Genera of polypores, nomenclature, and taxonomy, Synopsis Fungorum 5, Fungoflora, Norway, Oslo.
23. Ryvarde, L., & Gilbertson, R. L. (1993). European polypores, Oslo: Fungiflora, 387p.
24. White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. a guide to methods and applications. Pp: 315-322.
25. Aghajani, H., Bari, E., Bahmhani, M., Miha, H., Tajick Ghanbary, M. A., Nicholas, D. D., & Zahedian, E. (2018). Influence of relative humidity and temperature on the cultivation of *Pleurotus* species. *Maderas-Ciencia Tecnologia*. 20 (4), 571-578.
26. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30, 2725-2729.
27. Nojoki, F., Hatamian-Zarmi, A., Ebrahimi Hosseinzadeh, B., Mirderikvand, M., Beygom mokhtari-Hosseini, Z., & Kalantari-Dehaghi, S. (2017). Investigation and optimization effects of ultrasound waves to produce Ganoderic acid, anti-cancer mushrooms metabolite. *Iranian J. of Medical Microbiology*. 11 (1), 58-66.
28. Alzorqi, I., Singh, A., Manickam, S., & F. Al-Qrimli, H. (2017). Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of β -d-glucan polysaccharides from *Ganoderma lucidum* for prospective scale-up. *Resource-Efficient Technologies. Resource - Efficient Technologies*. 3 (1), 46-54.
29. Payamnoor, V., Lazemi, G., Nazari, J., & Alishah, O. (2020). Evaluation of the effect of elicitors on antioxidant properties and mycelial secondary metabolites of *Stereum hirsutum*, *Hyphodontia paradoxa*, and *Arthrinium arundinis* from Golestan province. *Eco-phytochemical J. of Medicinal Plants*. 2 (30), 76-88.
30. Fang, Q., & Zhong, J. (2002). Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology Progress*. 18 (1), 51-4.
31. Qiang, G., Hua-Xi, X., Xiao, H., Wang, X., Zhao, Y., Zhang, Y., & Ren, G. (2011). Stimulated production of triterpenoids of *Ganoderma lucidum*

- by an ether extract from the medicinal insect, catharsis molossus, and identification of the key stimulating active components. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 165 (1), 87-97.
32. Keypour, S., Riahi, H., Asef, M. R., Abdollahzadeh, J., Burhani, A., & Safaie, N. (2020). The true nature of *Ganoderma* in Iran: Taxonomy based on ITS and mtSSU rDNA. *Forest Pathology*. 00:e12605. 1-13.
 33. Badalyan, S. M., Gharibyan, N. G., Iotti, M., & Zambonelli, A. (2012). Morphological and genetic characteristics of different collections of *Ganoderma* P. Karst. species. In: Mushroom Science XVIII, Proceedings of the 18th ISMS Congress.
 34. Mau, J. L., Tsai, S. Y., Tseng, Y. H., & Huang, S. J. (2005). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*. 93, 641-649.
 35. Cör, D., Botić, T., Knez, Z., Gregori, A., & Pohleven, F. (2017). The effects of different solvents on bioactive metabolites and “in vitro” antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of *Ganoderma lucidum* fruiting body and primordia extracts. *Macedonian J. of Chemistry and Chemical Engineering*. 36 (1), 1-13.
 36. Zhu, W., Zhong, J., & Tang, Y. (2008). Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*. 43 (1), 1359-1570.
 37. Liang, C., Li, Y., Xu, J., Wang, J., Miao, X., & Tang, Y. (2010). Enhanced biosynthetic gene expressions and production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under phenobarbital induction. *Applied Microbiology Biotechnology*. 86 (5), 1367-74.
 38. Nojoki, F., Hatamian, A. S., Mirderikvand, M., Ebrahimi, B., Mokhtari, Z. B., & Kalantari, S. (2016). Impact of rifampin induction on the fermentation production of ganoderic acids by Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum*. *Applied Food Biotechnology*. 3 (2), 91-8.
 39. Zhang, J., Zhong, J., & Geng, A. (2014). Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor. *Process Biochemistry*. 49 (10), 1580-1586.
 40. Heydarian, M. S., Hatamian, A. S., Amoabediny, G., & Yazdian, F. (2015). Doryab, A. Synergistic effect of elicitors in the enhancement of ganoderic acid production: optimization and gene expression studies. *Applied Food Biotechnology*. 2 (3), 57-62.
 41. Xu, J. W., Zhao, W., & Zhong, J. J. (2010). Biotechnological production and application of ganoderic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87, 457-466.
 42. Zhang, H., Ma, H., Liu, W., Pei, J., Wang, Z., Zhou, H., & Yan, J. (2014). Ultrasound enhanced the production and antioxidant activity of polysaccharides from the mycelial fermentation of *Phellinus igniarius*. *Carbohydrate Polymers*. 113, 380-387.
 43. Yeo, S. K., & Liong, M. T. (2013). Effect of ultrasound on bioconversion of isoflavones and probiotic properties of parent organisms and subsequent passages of *Lactobacillus*. *LWT - Food Science and Technology*. 51, 289-295.
 44. Avhad, D. N., & Rathod, V. K. (2014). Ultrasound stimulated the production of a fibrinolytic enzyme, *Ultrasonics Sonochemistry*. 21, 182-188.
 45. Wang, F., Ma, A. Z., Guo, C., Zhuang, G. Q., & Liu, C. Z. (2013). Ultrasound-intensified laccase production from *Trametes versicolor*. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20, 118-124.
 46. Taherkhani, T., Asghari Zakaria, R., Omid, M., & Zare, N. (2017). Effect of ultrasonic waves on crocin and safranal content and expression of their controlling genes in suspension culture of saffron (*Crocus sativus* L.), *Natural Product Research*. 10 November 2017, 05:15.

47. Atrashi, M., Tavokoli Dinanie, E., Darzi, M. T., Hashemi, J., Rozbeh, S., & Masumi, A. (2011). Effect of ultrasound on the production of Carvone as a secondary metabolite in callus derived from *Bunium persicum* Boiss. *J. of Herbal Medicine*. 2 (2), 129-135.
48. 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62 (2-3), 151-155.
49. Rezaei, A., Ghanati, F., & Behmanesh, M. (2012). Stimulation of taxol production by magnetic field in cell culture of hazel (*Corylus avellana* L.). *Iranian J. of Biomedical Engineering*. 6, 113-122.
50. Sainz Herrán, N., Casas López, J. L., Sánchez Pérez, J. A., & Chisti, Y. (2008). Effects of ultrasound on the culture of *Aspergillus terreus*. *J. of Chemical Technology and Biotechnology*. 83, 593-600.
51. Lu, P., Lou, H., Wei, T., Liu, Z., Jiao, Y., & Chen, Q. (2020). Ultrasound enhanced the production of mycelia and exopolysaccharide by *Agaricus bitorquis* (Qué.) Sacc. Chaidam. *Ultrasonics Sonochemistry*. 64, 105040.1-12.
52. Zare, N., Farjaminezhad, R., Asghari-Zakaria, R., & Farjaminezhad, M. (2014). Enhanced thebaine production in *Papaver bracteatum* cell suspension culture by the combination of elicitation and precursor feeding. *Natural Product Research*. 28, 711-717
53. 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. *Ultrasonics in Medicine and Biology*. 37 (11), 1938-1947.
54. Li, W., Ma, H., He, R., Ren, X., & Zho, C. (2021). Prospects and application of ultrasound and magnetic fields in the fermentation of rare edible fungi. *Ultrasonics Sonochemistry*. 76 (105613), 1-12.
55. Ojha, K. S., Mason, T. J., O'Donnell, C. P., Kerry, J. P., & Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonics Sonochemistry*. 34, 410-417.
56. Teixeira da Silva, J. A., & Dobranszki, J. (2014). Sonication (ultrasound) affects In Vitro growth of hybrid *Cymbidium*. *Botanica Lithuanica*. 20, 121-130.

