



Evaluation of the effects of various growth hormones and yeast extract as an elicitor on biochemical, morphophysiological, and metabolic characteristics of *Chrysanthemum morifolium* L. in in vitro callus culture

Younes Mahmoudi¹, Mojgan Soleimanizadeh^{2*} and Alireza Yavari³

1- M.S. Student, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

2*- Corresponding author, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran, E-mail: m.soleimanizadeh@hormozgan.ac.ir

3- Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

Received: 16/05/2025

Revised: 13/02/2026

Accepted: 17/02/2026

Abstract

Background and Objective: In plant tissue culture, improving callus induction and enhancing physiological, biochemical, and metabolic traits is highly important. Using natural elicitors such as yeast extract combined with plant growth regulators can effectively boost bioactive compound production and improve callus quality. *Chrysanthemum morifolium* L., a valuable ornamental and medicinal plant, requires optimized in vitro culture conditions to increase beneficial metabolite production. This study investigated the effects of various growth hormones and yeast extract as an elicitor on the biochemical, morpho-physiological, and metabolic characteristics of *Chrysanthemum morifolium* L. callus under in vitro conditions.

Materials and Methods: In this study, we prepared MS culture medium for *Chrysanthemum morifolium* L. cell cultivation and added various hormonal combinations, including NAA, BAP, and 2,4-D, to optimize callus induction. We disinfected seeds using benomyl fungicide, ethanol, and sodium hypochlorite. We then collected leaf and stem explants from young plants and cultured them in the prepared media. We conducted the experiments in a completely randomized design with five hormonal levels, two explant types, and two light conditions. We also added yeast extract (0, 1000, 1200, and 1400 mg/L) to the culture medium and evaluated its effect on callus characteristics. Finally, we measured various callus traits, including fresh and dry weight, chlorophyll, carotenoids, phenolics, flavonoids, antioxidant activity, and others. We performed statistical analysis using SAS software and Duncan's multiple range test.

Results: The highest callus induction percentage (96.66%), shortest callus initiation time, and greatest fresh weight, dry weight, and callus volume occurred in treatment E1H5L (leaf explant, 2 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D under light conditions). Yeast extract at 1000 mg/L showed the best performance in enhancing fresh weight (2.09 g), dry weight (1.128 g), and callus volume (1.35 mm³). Treatments with 1200 and 1400 mg/L yeast extract also had positive effects but were less effective. In the control treatment, chlorophyll a had the lowest content (11.51 mg/g FW), while the 1000 mg/L yeast extract treatment had the highest level (24.33 mg/g FW). For chlorophyll b, the 1000 mg/L treatment also performed best (16.39 mg/g FW).



Carotenoids, phenolics, flavonoids, antioxidant capacity, anthocyanins, and proline increased with higher yeast extract concentrations, especially at 1400 mg/L. Malondialdehyde content decreased, while catalase and peroxidase enzyme activities significantly increased across all treatments.

Conclusion: The optimal yeast extract concentration for improving biochemical, morphophysiological, metabolic, and antioxidant traits was 1000 mg/L. These results highlight yeast extract's potential as an effective tool in plant tissue culture to enhance callus characteristics, supporting its future use in medicinal plant research and agricultural development.

Keywords: Bioelicitors, yeast extract, callus formation, antioxidant activity, Invitro culture.

بررسی اثر هورمون‌های رشدی مختلف و عصاره مخمر به‌عنوان الیستور بر ویژگی‌های بیوشیمیایی، مورفوفیزیولوژیکی و متابولیتی گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium* L.) در کشت کالوس درون‌شیشه‌ای

یونس محمودی^۱، مژگان سلیمانی‌زاده^{۲*} و علیرضا یآوری^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

پست الکترونیکی: m.soleimanizadeh@hormozgan.ac.ir

۳- دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۲۸

تاریخ اصلاح نهایی: ۱۴۰۴/۱۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۶

چکیده

سابقه و هدف: در کشت‌های بافت گیاهی، بهبود فرایند کالوس‌زایی و ارتقاء ویژگی‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و متابولیتی گیاهان از اهمیت بالایی برخوردار است. استفاده از الیستورهای طبیعی مانند عصاره مخمر به‌همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، می‌تواند به‌عنوان روشی کارآمد برای افزایش تولید ترکیب‌های زیست‌فعال و بهبود کیفیت کالوس مطرح شود. گل داوودی به‌عنوان یکی از گیاهان زینتی و دارویی ارزشمند، نیازمند بهینه‌سازی شرایط کشت درون‌شیشه‌ای برای افزایش متابولیت‌های مفید است. هدف این پژوهش، بررسی تأثیر انواع هورمون‌های رشدی و عصاره مخمر به‌عنوان الیستور بر ویژگی‌های بیوشیمیایی، مورفوفیزیولوژیکی و متابولیتی کالوس گل داوودی در شرایط درون‌شیشه‌ای بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، محیط کشت MS برای کشت سلول‌های داوودی تهیه شد و به‌منظور بهینه‌سازی فرایند کالوس‌زایی، ترکیب‌های هورمونی مختلف از جمله BAP، NAA، 2,4-D به محیط اضافه گردیدند. بذرها برای ضدعفونی با استفاده از قارچ‌کش بنومیل، اتانول و هیپوکلریت سدیم تیمار شدند. سپس ریزنمونه‌های برگ و ساقه از گیاهان جوان برداشت و در محیط کشت قرار گرفتند. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج سطح هورمونی مختلف، دو نوع ریزنمونه و دو شرایط نوری انجام شد. همچنین، عصاره مخمر (۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به محیط کشت اضافه گردید و تأثیر آن بر ویژگی‌های کالوس ارزیابی شد. در نهایت، ویژگی‌های مختلف کالوس از جمله وزن تر، خشک، کلروفیل، کاروتنوئید، فنل، فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و غیره اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS و آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گردید.

یافته‌ها: بالاترین درصد کالوس‌زایی (۹۶/۶۶ درصد)، کمترین زمان شروع کالوس‌دهی، بیشترین وزن تر، خشک و حجم کالوس در تیمار EIH5L (برگ، ۲ میلی‌گرم در لیتر + ۲BAP میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و روشنایی) مشاهده شد. تیمار عصاره مخمر با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بهترین عملکرد را در افزایش وزن تر (۲/۰۹ گرم)، خشک (۱/۱۲۸ گرم) و حجم کالوس (۱/۳۵ میلی‌متر مکعب) داشت. تیمارهای ۱۲۰۰ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز اثر مثبت داشتند اما کارایی کمتری نشان دادند. در تیمار کنترل، کلروفیل *a* کمترین مقدار (۱۱/۵۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را داشت و عصاره مخمر با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بالاترین میزان (۲۴/۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را ثبت کرد. در کلروفیل *b*، عصاره مخمر ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با مقدار ۱۶/۳۹ میلی‌گرم بر گرم بهترین عملکرد را داشت. کاروتنوئید، فنل، فلاونوئید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، آنتوسیانین و پرولین با افزایش غلظت عصاره مخمر، به‌ویژه در ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، افزایش یافتند. میزان مالون دی‌آلدئید کاهش و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در همه تیمارها به‌طور معنی‌دار افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: بهترین غلظت عصاره مخمر برای بهبود ویژگی‌های بیوشیمیایی، مورفوفیزیولوژیکی، متابولیتی و آنتی‌اکسیدانی ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. این نتایج ظرفیت استفاده از عصاره مخمر را به‌عنوان یک ابزار مؤثر در کشت‌های بافت گیاهی و بهبود

ویژگی‌های کالوس برای توسعه کاربردهای آینده در به‌کارگیری گیاهان دارویی و کشاورزی نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: الیسیاتور زیستی، عصاره مخمر، کالوس‌زایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کشت درون شیشه‌ای.

مقدمه

گل داوودی (*Chrysanthemum spp.*) یکی از مهمترین گیاهان زینتی و دارویی در سطح جهان به‌شمار می‌رود که به‌دلیل تنوع بالای رنگ، شکل گل‌ها، ارزش دارویی و ماندگاری طولانی پس از برداشت، جایگاه ویژه‌ای در صنعت گلکاری و داروسازی دارد (Liu et al., 2024). گل داوودی به‌عنوان یکی از گیاهان دارویی و زینتی ارزشمند، منبعی غنی از متابولیت‌های ثانویه مانند فلاونوئیدها، فنولیک اسیدها، تریپنوئیدها، کاروتنوئیدها و اسانس‌های معطر به‌شمار می‌رود؛ این ترکیب‌ها، افزون بر ایجاد رنگ، طعم و عطر مطلوب، نقش کلیدی در تقویت خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدباکتریایی و محافظت از سلول‌های گیاهی در برابر تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند (Jiang et al., 2021; Sharma et al., 2023).

با این حال، تولید و تکثیر این گیاه با چالش‌های متعددی مواجه است. حساسیت به بیماری‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی، محدودیت‌های موجود در تکثیر سنتی از طریق قلمه و بذر، یکنواختی ژنتیکی ناشی از روش‌های مرسوم تکثیر و نیاز به توسعه واریته‌های مقاوم‌تر، از جمله مهمترین مشکلات گل داوودی محسوب می‌شوند. این چالش‌ها ضرورت به‌کارگیری روش‌های پیشرفته‌تر مانند کشت بافت و تولید کالوس را برای حفظ و بهبود ویژگی‌های این گیاه به‌ویژه ویژگی‌های متابولیتی و دارویی دوچندان کرده است (Gupta et al., 2021). کالوس، توده‌ای از سلول‌های تمایز نیافته است که تحت تأثیر هورمون‌های رشد در شرایط کنترل‌شده کشت درون‌شیشه‌ای ایجاد می‌شود. این روش نه تنها امکان تکثیر انبوه و یکنواخت را فراهم می‌کند، بلکه بستری مناسب برای تولید ترکیب‌های دارویی ارزشمند و مطالعه سازوکارهای پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را فراهم می‌نماید (Kruglova et al., 2023). ایجاد و رشد موفقیت‌آمیز کالوس به‌شدت به ترکیب و

غلظت هورمون‌های رشد به‌کار رفته در محیط کشت بستگی دارد (Sidik et al., 2024). اکسین‌ها مانند ۲،۴-دی‌کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) و نفتالین استیک اسید (NAA) در کنار سیتوکینین‌هایی مانند بنزیل آمینوبورین (BAP) و کیتینین (KIN)، به‌طور گسترده برای تنظیم فرایندهای تقسیم سلولی، رشد و تمایز در کشت کالوس استفاده می‌شوند (Ab Rahman et al., 2022). نوع، غلظت و نسبت این هورمون‌ها در محیط کشت، تعیین‌کننده میزان رشد، بافت، رنگ، استحکام بافتی و قابلیت باززایی کالوس است (Guo & Jeong, 2021). در فرایند کشت کالوس، عواملی مانند نور، دما، pH محیط و ترکیب‌های آلی مکمل مانند ویتامین‌ها و آمینواسیدها نیز نقش مکمل و گاه تعیین‌کننده‌ای در کیفیت و کمیت رشد ایفا می‌کنند (Sudheer et al., 2022).

الیسیاتورها ترکیب‌هایی طبیعی یا سنتزی هستند که با تحریک مسیرهای دفاعی سلول‌های گیاهی، منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه و بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه می‌شوند (Humbal & Pathak, 2023). در سال‌های اخیر، بهره‌گیری از الیسیاتورها به‌ویژه عصاره‌های طبیعی مانند عصاره مخمر، به‌عنوان رویکردی مؤثر برای تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه مورد توجه قرار گرفته است (Goncharuk et al., 2022; Lescano et al., 2025). عصاره مخمر، ترکیبی غنی از اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، پپتیدها، کربوهیدرات‌ها و عناصر ریزمغذی است که می‌تواند مسیرهای دفاعی سلولی را فعال نموده و منجر به افزایش سنتز ترکیب‌هایی مانند فنول‌ها، فلاونوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌های قوی شود (Tao et al., 2022). افزوده شدن عصاره مخمر به محیط کشت کالوس، علاوه بر ارتقاء رشد و بقای کالوس، می‌تواند تولید متابولیت‌های دارویی و ترکیب‌های با خاصیت آنتی‌اکسیدانی را به‌طور معناداری بهبود ببخشد (Zaman et al., 2022). سازوکار اثر عصاره مخمر مبتنی بر تحریک مسیرهای سیگنالینگ دفاعی و افزایش بیان

ژن‌های مرتبط با سنتز ترکیب‌های ثانویه می‌باشد.

این اثرها می‌تواند به بهبود ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و متابولیکی کالوس‌ها منجر شده و ارزش دارویی و تجاری محصولات حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای گل داوودی را افزایش دهد (Kumar et al., 2023; Upadhyay et al., 2025). با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در حوزه تکثیر درون‌شیشه‌ای گل داوودی، همچنان نیاز به تحقیقات جامع در زمینه بررسی اثرهای ترکیبی هورمون‌های رشد و الیستورهای طبیعی مانند عصاره مخمر بر ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و متابولیکی کالوس‌های این گیاه وجود دارد. از این‌رو، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی و عصاره مخمر بر فرایند رشد کالوس، ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و میزان تجمع متابولیت‌های ثانویه در گل داوودی طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه محیط کشت MS و ترکیب‌های هورمونی

ابتدا محیط کشت پایه MS مطابق دستورالعمل موراشیگ و اسکوگ تهیه شد (Murashige & Skoog 1962). به‌منظور بهینه‌سازی فرایند کالوس‌زایی، ترکیبات هورمونی مختلف به محیط کشت افزوده شد. برای تهیه محلول مادری هورمون‌های 2,4-D و NAA، مقدار ۱۰ میلی‌گرم از هر یک در چند قطره اتانول ۹۶ درصد حل و بعد با آب مقطر دوبار تقطیر تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. همچنین محلول مادری BAP با حل کردن ۱۰ میلی‌گرم کینتین در چند قطره سود و آب مقطر تهیه و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورها شامل پنج سطح تیمار هورمونی H1 تا H5 (به ترتیب کنترل، ۱ میلی‌گرم NAA + ۲ میلی‌گرم BAP، ۰/۲ میلی‌گرم 2,4-D، ۰/۲ میلی‌گرم BAP + ۰/۵ میلی‌گرم 2,4-D و ۲ میلی‌گرم BAP + ۲ میلی‌گرم 2,4-D)، دو نوع ریزنمونه E1 (برگ) و E2 (ساقه) و دو نوع شرایط نوری (روشنایی و

تاریکی) بودند.

تهیه و ضدعفونی مواد گیاهی

بذرهای داوودی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. برای ضدعفونی، ابتدا بذرها به مدت ۵ دقیقه در قارچ‌کش بنومیل ۱۰٪، سپس به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰٪ و در نهایت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ قرار داده شدند. پس از آن، بذرها سه بار با آب مقطر استریل شسته و روی محیط کشت MS قرار داده شدند. پس از یک ماه، ریزنمونه‌های برگ و ساقه از گیاهان جوان برداشت و برای آزمون‌های بعدی استفاده شدند.

تهیه الیستور زیستی عصاره مخمر

عصاره مخمر (مرک، آلمان) به‌طور مستقیم با غلظت‌های ۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت اضافه گردید.

ارزیابی کالوس‌زایی

نسبت تعداد ریزنمونه‌های دارای کالوس به کل ریزنمونه‌ها به‌عنوان درصد کالوس‌زایی ثبت شد. زمان تا آغاز کالوس‌زایی نیز به‌عنوان مدت‌زمان سپری‌شده از زمان کشت نمونه‌ها تا شروع تشکیل کالوس اندازه‌گیری گردید. پس از چهار هفته، وزن تر (FW) و وزن خشک (DW) کالوس‌ها با ترازوی دقیق ثبت گردید. حجم کالوس نیز با روش ارشمیدس (جابه‌جایی مایع) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئید

برای استخراج رنگدانه‌ها، ۲۰۰ میلی‌گرم از کالوس با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ استخراج شد. محلول فیلتر شده در اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۸۰ نانومتر قرائت شد (Hemphill & Venketeswaran, 1978). محاسبات براساس فرمول‌های زیر انجام گردید.

$$a = \text{کلروفیل } a = (A645 \times 2.69) - (A663 \times 12.7) \text{ (میلی گرم در گرم وزن تر)}$$

$$b = \text{کلروفیل } b = (A663 \times 4.68) - (A645 \times 22.9) \text{ (میلی گرم در گرم وزن تر)}$$

$$\text{کاروتنوئید (میلی گرم در گرم وزن تر)} = (\text{Chl } b \times 85.02) - (\text{Chl } a \times 1.82) - (A480 \times 1000)$$

تعیین فنل و فلاونوئید کل

بعد به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس ۴ میلی لیتر اسید تری کلرواستیک ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباریتوریک اسید به ۱ میلی لیتر از سرم اضافه شد. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در حمام آب حرارت داده شد و بعد به سرعت در حمام یخ خنک گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آنتوسیانین

برای تعیین آنتوسیانین، ابتدا بافت کالوس به قطعات کوچک تقسیم شده و در یک فالكون قرار داده شد. به منظور استخراج آنتوسیانین‌ها، حدود ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به فالكون اضافه گردید. سپس فالكون‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار گرفتند و به طور منظم هم زده شدند. پس از پایان زمان استخراج، محلول فیلتر شد تا ذرات باقی مانده از مایع جدا شوند. برای تثبیت رنگ آنتوسیانین‌ها، ۱ میلی لیتر 1M HCl به محلول استخراجی افزوده شد. محلول فیلتر شده و اسیدی شده سپس در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرار گرفت. دستگاه با همان حلال ۸۰ درصد کالیبره شد. سپس جذب محلول در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Bürkle et al., 2018).

محتوای پرولین

محتوای پرولین طبق روش Bates (Bates et al., 1973) تعیین شد. برای این منظور، ۰/۰۴ گرم از کالوس‌ها در ۱۵ میلی لیتر اسید سالیسیلیک ۳ درصد آبی هموزنیزه گردید. سپس عصاره فیلتر شد. محلول فیلتر شده (۲ میلی لیتر) با ۲ میلی لیتر معرف نائین هیدرین مخلوط گردید. در نهایت، جذب محلول‌های رنگی در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای تعیین میزان فنل کل، از روش فولین-سیوکالتو طبق دستورالعمل McDonald و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. بدین منظور، ۵ میلی لیتر از عصاره اتانولی با غلظت ۰/۳۲ میلی گرم در میلی لیتر با ۴/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین-سیوکالتو مخلوط گردید. پس از گذشت ۵ دقیقه، ۵ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۷ درصد به مخلوط اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱ تا ۱/۵ ساعت در دمای اتاق نگهداری و بعد میزان جذب محلول در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید. مقدار فلاونوئید کل با اندکی تغییر براساس روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

توانایی آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در مهار رادیکال آزاد پایدار DPPH براساس روش Materska و Perucka (۲۰۰۵) با اندکی تغییر ارزیابی شد. برای این منظور، ۳/۹ میلی لیتر از محلول DPPH تهیه شده در متانول ۹۵ درصد با ۰/۱ میلی لیتر از عصاره مورد نظر مخلوط گردید. پس از انکوباسیون مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد (Materska & Perucka, 2005).

مالون دی‌آلدئید (MDA)

سطح پراکسیداسیون لیپیدها براساس میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) اندازه‌گیری شد که با استفاده از روش Heath & Packer (1968) تعیین گردید. کالوس تازه با ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH 7.8) در دمای یخ‌زده هموزن شد و

گرفته شد. برای مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

نتایج

بررسی تأثیر هورمون، نوع ریزنمونه و شرایط نوری بر صفات مختلف کالوس

پس از کشت بذر و جوانه‌زنی آنها بر روی محیط کشت MS (شکل ۱)، برگ و ساقه گیاهان درون شیشه‌ای به‌منظور انجام فرایند کالوس‌زایی مورد استفاده قرار گرفت. در جدول تجزیه واریانس، نتایج نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اثر متقابل هورمون، نوع ریزنمونه و شرایط نوری در سطح احتمال یک درصد می‌باشد. به همین دلیل، نمودار اثر سه‌گانه ترسیم گردید (جدول ۱).

فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) طبق روش (Aebi, 1984) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷، ۰/۲ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱٪ و ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره بود. فعالیت کاتالاز به‌عنوان کاهش جذب در طول ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر محاسبه شد. برای سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش (Serrano-Martínez et al., 2008) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ استفاده شد. به‌منظور رسم نمودارها، از نرم‌افزار Excel بهره



شکل ۱- بذرهای جوانه‌زده گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) روی محیط کشت MS

Figure 1. *Chrysanthemum morifolium* germinated seeds on MS medium

تیمار E1H5L (برگ، ۲ میلی‌گرم BAP + ۲ میلی‌گرم 2,4-D، روشنایی) به‌میزان ۹۶/۶۶ درصد (شکل ۳ a) می‌باشد.

درصد کالوس‌زایی

بالاترین میزان درصد کالوس‌زایی (شکل ۲) مربوط به

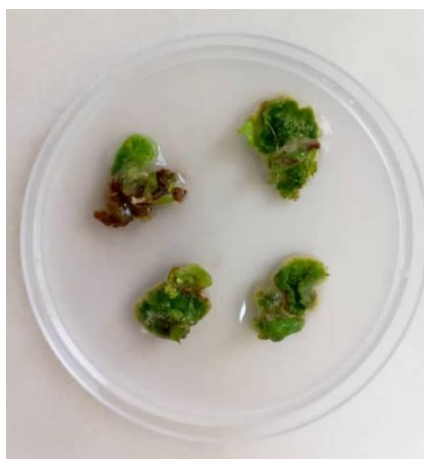
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر هورمون، نوع ریزنمونه و شرایط نوری بر صفات مختلف کالوس گل داوودی

(*Chrysanthemum morifolium*)

Table 1. ANOVA of hormone, explant type and light conditions effects on various *Chrysanthemum morifolium* callus traits

S.O.V	df.	M.S.				
		Callus (%)	Time to onset of callus formation	Callus fresh weight	Callus dry weight	Callus volume
Hormone (a)	4	2910.00**	191.89**	0.410**	0.108**	0.239**
Explant (b)	1	7260.00**	101.40**	0.802**	0.295**	0.394**
Light conditions (c)	1	5606.00**	180.26**	0.636**	0.294**	0.624**
a×b	4	1560.00**	23.02**	0.222**	0.714**	0.0853**
a×c	4	1090.00**	31.89**	0.153**	0.0720**	0.137**
b×c	1	2666.66**	32.26**	0.242**	0.163**	0.178**
a×b×c	4	450.00**	92.22**	0.0572**	0.0494**	0.0402**
Experimental error	40	11.66	0.0666	0.0019	0.0136	0.00028
C. V. (%)	-	24.39	6.85	22.32	9.65	13.13

** significant at 1% probability levels.



شکل ۲- کالوس به دست آمده از ریزنمونه برگ تحت روشنایی و تیمار هورمونی 2 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D

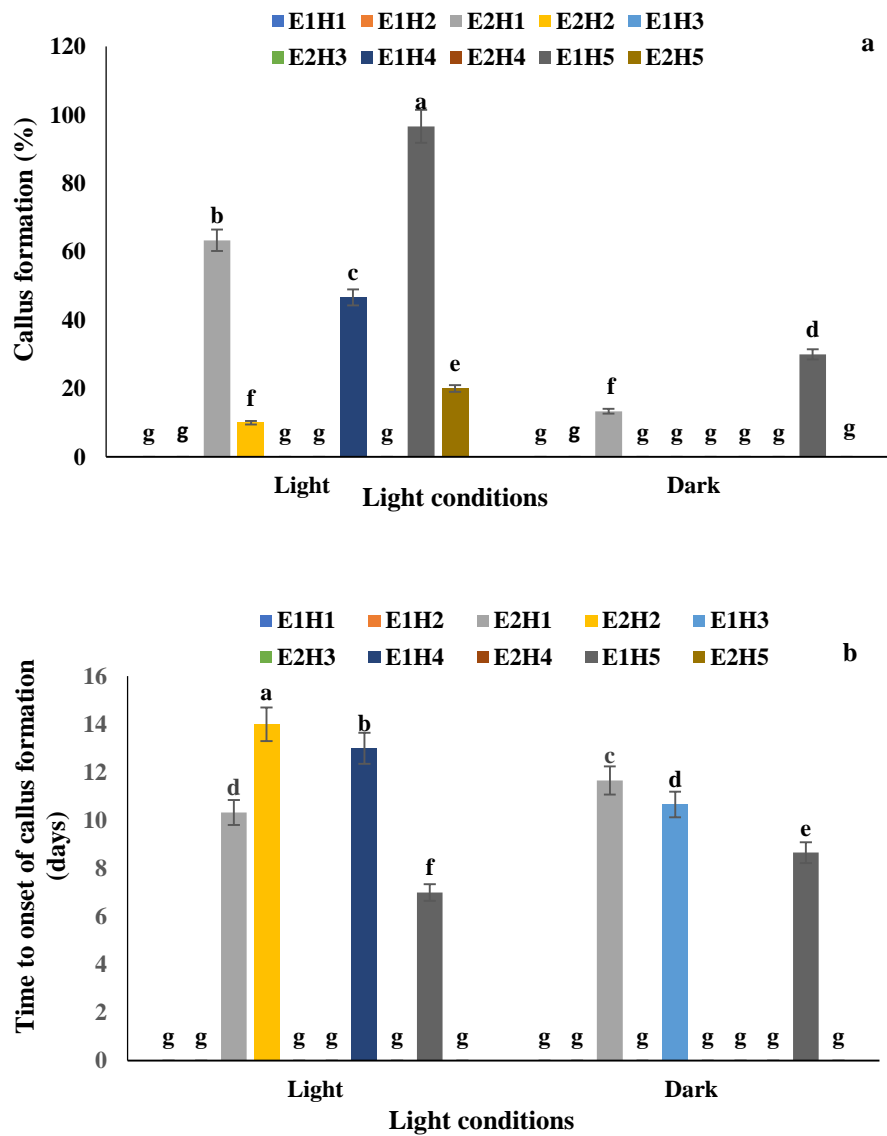
Figure 2. Calli obtained from *Chrysanthemum morifolium* leaf explant under light and hormone treatment 2 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D

وزن تر کالوس

زمان تا آغاز کالوس زایی

میزان وزن کالوس در تیمار E1H5L (برگ، ۲ میلی گرم BAP + ۲ میلی گرم 2,4-D، روشنایی) افزایش معناداری یافت (شکل ۴a).

کمترین میزان زمان تا آغاز کالوس زایی در تیمار E1H5L (برگ، ۲ میلی گرم BAP + ۲ میلی گرم 2,4-D، روشنایی) مشاهده شد (شکل ۳b).

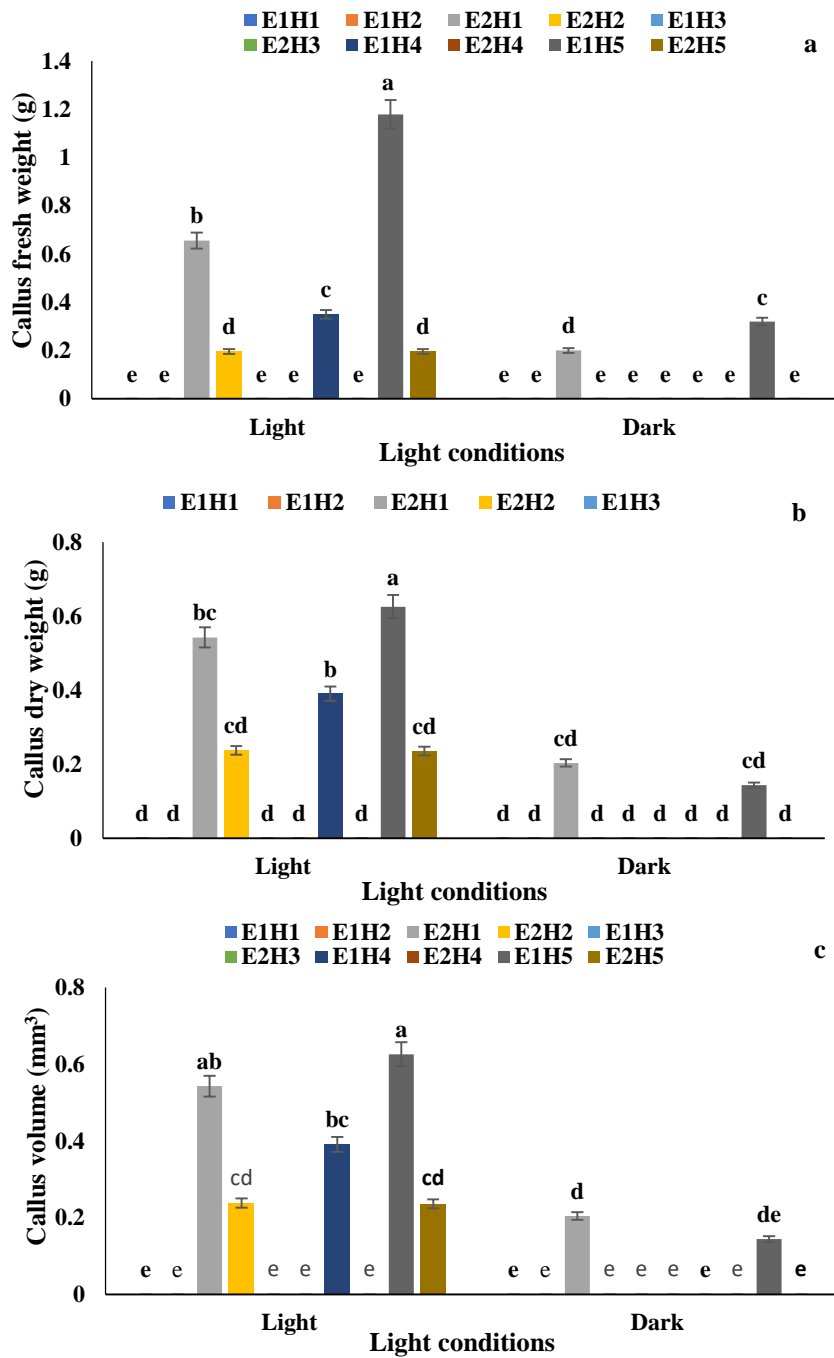


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون، ریزنمونه و شرایط نوری بر درصد کالوس‌زایی (a) و زمان تا آغاز کالوس‌زایی (b) گل

داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)

Figure 3. Mean comparison of hormone, explant, and light conditions interaction on callus percentage (a) and time to callus initiation (b) of *Chrysanthemum morifolium*

E1H1: Leaf explant + Control, E1H2: Leaf explant + 1 mg/L NAA + 2 mg/L BAP, E1H3: Leaf explant + 0.2 mg/L 2,4-D, E1H4: Leaf explant + 0.2 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D, E1H5: Leaf explant + 2 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D, E2H1: Stem explant + Control, E2H2: Stem explant + 1 mg/L NAA + 2 mg/L BAP, E2H3: Stem explant + 0.2 mg/L 2,4-D, E2H4: Stem explant + 0.2 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D, E2H5: Stem explant + 2 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D, Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون، ریزنمونه و شرایط نوری بر وزن تر (a)، خشک (b) و حجم کالوس (c) گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)

Figure 4. Mean comparison of hormone, explant and light conditions interaction on callus fresh weight (a) callus dry weight (b) callus volume (c) of *Chrysanthemum morifolium*

E1H1: Leaf explant + Control, E1H2: Leaf explant + 1 mg/L NAA + 2 mg/L BAP, E1H3: Leaf explant + 0.2 mg/L 2,4-D, E1H4: Leaf explant + 0.2 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D, E1H5: Leaf explant + 2 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D, E2H1: Stem explant + Control, E2H2: Stem explant + 1 mg/L NAA + 2 mg/L BAP, E2H3: Stem explant + 0.2 mg/L 2,4-D, E2H4: Stem explant + 0.2 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D, E2H5: Stem explant + 2 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D, Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

وزن خشک کالوس

روشنایی) گزارش گردید (شکل ۴c).

براساس نتایج مقایسه میانگین، وزن خشک کالوس در تیمار E1H5L (برگ، ۲ میلی‌گرم BAP + ۲ میلی‌گرم 2,4-D، روشنایی) افزایش یافت (شکل ۴b).

حجم کالوس

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر الیستور عصاره مخمر بر صفات کالوس گیاه داوودی بر سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲).

طبق نتایج بیشترین افزایش معنی‌دار حجم کالوس توسط تیمار E1H5L (برگ، ۲ میلی‌گرم BAP + ۲ میلی‌گرم 2,4-D،

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر عصاره مخمر بر صفات کالوس گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)

Table 2. ANOVA of yeast extract effects on *Chrysanthemum morifolium* callus traits

S.O.V	df.	M.S.		
		Callus fresh weight	Callus dry weight	Callus volume
Yeast extract	3	0.0918**	0.0549*	0.0972**
Experimental error	8	0.00494	0.0033	0.0051
C.V. (%)	-	3.78	5.98	6.43

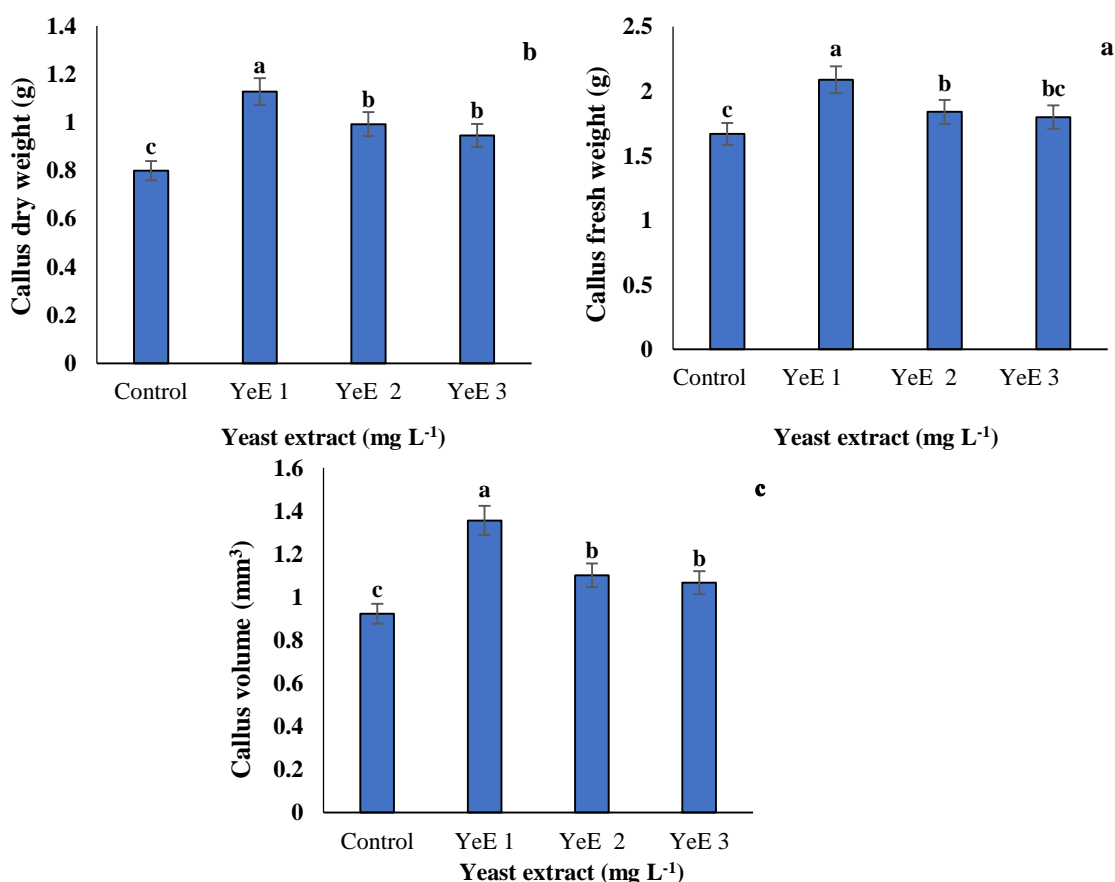
* and **: significant at 5 and 1% probability levels, respectively.

وزن تر کالوس

وزن خشک کالوس

در این مطالعه شاهد با مقدار وزن خشک ۰/۸۰ گرم کمترین میزان را نشان می‌دهد، که بیانگر شرایط پایه و عدم استفاده از YeE است. در مقابل، YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1) با مقدار ۱/۱۲۸ گرم بالاترین وزن خشک کالوس را به دست آورده و نشان‌دهنده تأثیر مثبت و قابل توجه این عصاره در افزایش تولید مواد خشک در کالوس است. YeE با غلظت ۱۲۰۰ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE2) است. YeE3 با مقادیر ۰/۹۹۳ و ۰/۹۴۶ گرم تأثیر متوسطی داشته، اگرچه از شاهد بیشتر است، اما به اندازه YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1) نبوده است (شکل ۵b).

نتایج نشان می‌دهند که تیمارهای مختلف عصاره مخمر تأثیر مثبتی بر شاخص مورد نظر نسبت به کنترل داشته‌اند. YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1) با افزایش ۲/۰۹ گرمی نسبت به کنترل، بالاترین تأثیر را داشته و نشان‌دهنده بیشترین کارایی در بهبود این شاخص است. YeE با غلظت‌های ۱۲۰۰ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE2 و YeE3) نیز به ترتیب افزایش ۱/۸۴ و ۱/۸۰ گرم را نشان داده است که نسبت به کنترل بهتر است، اما عملکرد کمتری نسبت به YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1) دارد (شکل ۵a). این داده‌ها بیانگر پتانسیل بالای YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در بهبود وزن تر کالوس می‌باشد.



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف الیسیتور عصاره مخمر بر وزن تر (a)، خشک (b) و حجم کالوس (c) گل داوودی

(*Chrysanthemum morifolium*)

Figure 5. Mean comparison of different concentrations of yeast extract elicitor on fresh weight (a), dry weight (b), and callus volume (c) of *Chrysanthemum morifolium*

Control (0 mg L⁻¹), YeE1 (1000 mg L⁻¹), YeE2 (1200 mg L⁻¹), and YeE3 (1400 mg L⁻¹) represent the different yeast extract treatments applied in the culture medium. Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

نسبت به YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1) (شکل ۵c) ضعیف‌تر هستند.

اثر الیسیتور عصاره مخمر بر صفات فیزیولوژیکی، متابولیتی و آنتی‌اکسیدانی گیاه داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)

در جدول ۳ تجزیه واریانس اثر الیسیتور YeE بر صفات فیزیولوژیک گیاه داوودی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

حجم کالوس

در این مطالعه کنترل دارای کمترین حجم کالوس (۰/۹۲۳ میلی‌متر مکعب) است که نشان‌دهنده شرایط پایه بدون استفاده از YeE می‌باشد. عصاره مخمر با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1)، دارای حجم کالوس به‌میزان ۱/۳۵ میلی‌متر مکعب می‌باشد که نشان‌دهنده اثر مثبت و قوی این عصاره بر تحریک رشد کالوس است. تیمارهای YeE با غلظت‌های ۱۲۰۰ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE2 و YeE3) تأثیر متوسطی در افزایش حجم کالوس نسبت به شاهد دارند، اما

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر عصاره مخمر بر صفات فیزیولوژیکی، متابولیتی و آنتی‌اکسیدانی گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)

Table 3. ANOVA of yeast extract effects on physiological, metabolic, and *Chrysanthemum morifolium* antioxidant traits

S.O.V	df	M.S.					
		Chlorophyll a	Chlorophyll	Carotenoid	Phenol	Flavonoid	Antioxidant
Yeast extract	3	8.16**	42.37**	1.81**	546.56**	122.97**	126.62**
Experimental error	8	0.862	0.410	0.0117	4.82	0.592	0.915
C.V. (%)	-	5.48	5.60	6.48	3.97	2.36	1.66

** : significant at 1% probability level.

کلروفیل *a*

لیتر (YeE2 و YeE3) مقادیر مشابهی دارد (۱۱/۰۷ و ۱۱/۰۴ میلی‌گرم در گرم وزن تر) که نشان می‌دهد این دو YeE تأثیر مشابهی بر کلروفیل *b* دارند. بنابراین، YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1) باعث افزایش قابل توجهی در مقدار کلروفیل *b* می‌شود، در حالی که دو غلظت دیگر YeE، ممکن است تأثیر کمتری داشته با تأثیری مشابه با کنترل داشته باشند (شکل ۶b).

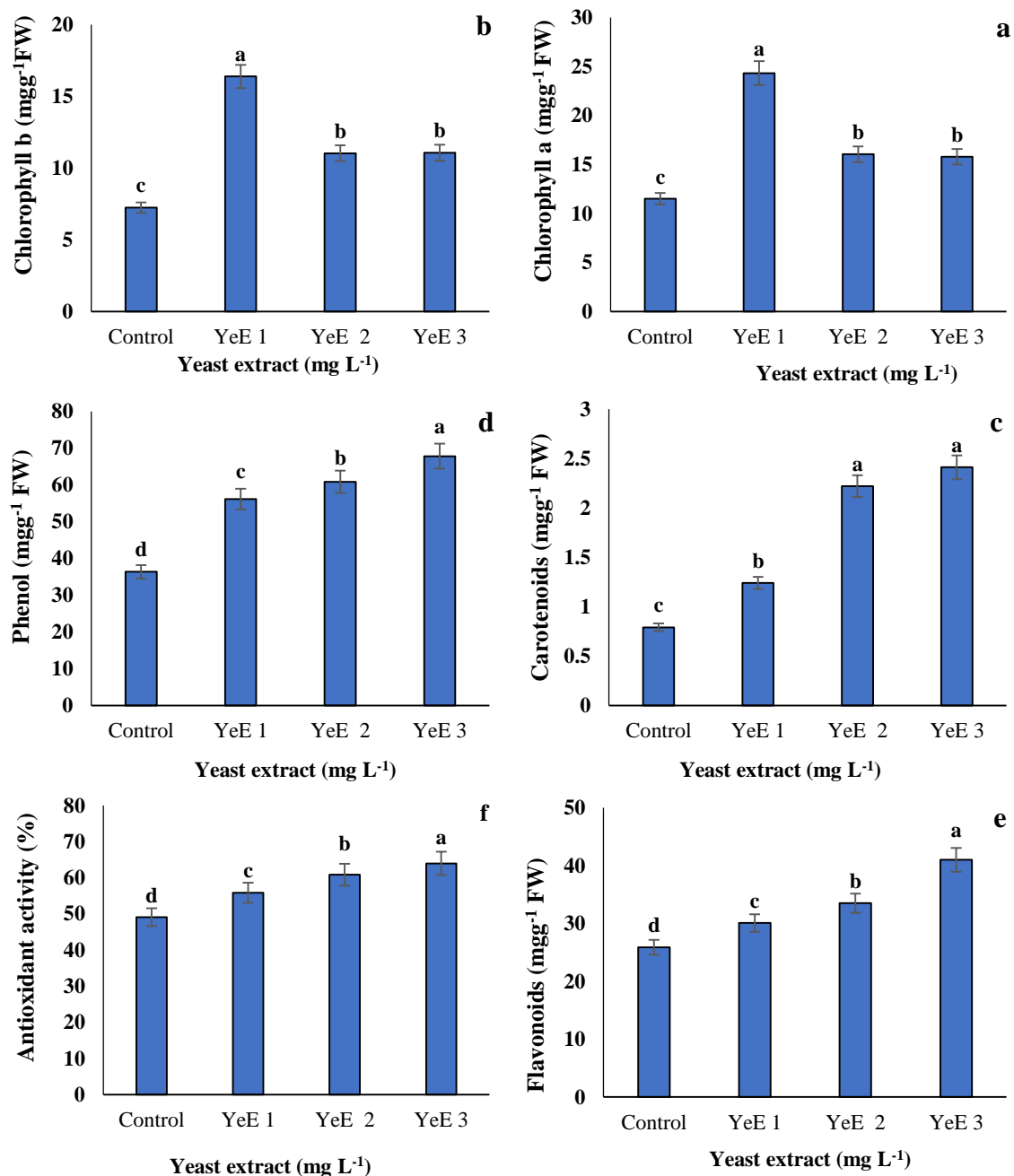
کاروتنوئید

نتایج نشان داد که تیمارهای YeE به‌طور قابل توجهی باعث افزایش میزان کاروتنوئید در مقایسه با تیمار شاهد شدند. میانگین کاروتنوئید در تیمار شاهد برابر با ۰/۷۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر بود، در حالی که این مقدار در تیمار YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1) به ۱/۲۴ میلی‌گرم در گرم وزن تر، در تیمار YeE با غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE2)، ۲/۲۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر و در تیمار YeE با غلظت ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE3)، ۲/۴۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر افزایش یافت (شکل ۶c).

مقدار کلروفیل *a* در تیمار کنترل پایین‌ترین مقدار (۱۱/۵۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر) را نشان می‌دهد. این مقدار نشان‌دهنده شرایط پایه و بدون تأثیر YeE است. تیمار YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1) با مقدار ۲۴/۳۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر بیشترین افزایش را در کلروفیل *a* داشته است. این نشان می‌دهد که YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1) تأثیر قابل توجهی در افزایش تولید و پایداری کلروفیل *a* دارد. تیمارهای YeE با غلظت‌های ۱۲۰۰ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر (YeE2 و YeE3) مقادیر مشابهی دارند (۱۶/۰۵ و ۱۵/۷۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر) که نشان‌دهنده تأثیر مثبت، اما کمتر نسبت به YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1) است (شکل ۶a).

کلروفیل *b*

YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1) بیشترین مقدار کلروفیل *b* را دارد (۱۶/۳۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر) که نشان‌دهنده اثر مثبت این نوع YeE بر تولید کلروفیل *b* است. در حالی که YeE با غلظت‌های ۱۲۰۰ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف الیسیتور عصاره مخمر بر کلروفیل *a* (a)، *b* (b)، کاروتنوئید (c)، فنل (d)، فلاونوئید (e) و آنتی‌اکسیدان (f) گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)

Figure 6. Mean comparison of different concentrations of yeast extract elicitor on chlorophyll a (a), b (b), carotenoids (c), phenols (d), flavonoids (e), and antioxidants (f) of *Chrysanthemum morifolium* L.

Control (0 mg L⁻¹), YeE1 (1000 mg L⁻¹), YeE2 (1200 mg L⁻¹), and YeE3 (1400 mg L⁻¹) represent the different yeast extract treatments applied in the culture medium. Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

محتوای فنل در مقایسه با تیمار شاهد شد. در تیمار YeE با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۲۰۰ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1، YeE2 و YeE3)، محتوای فنل به ترتیب به میزان ۵۴/۳۷٪،

فنل

با افزایش غلظت YeE میزان فنل افزایش یافت. نتایج نشان داد که کاربرد YeE به‌طور قابل توجهی باعث افزایش

توجهی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داده است. در شاهد، آنتی‌اکسیدان برابر با ۴۰/۰۶ درصد بود، در حالی که با افزایش غلظت YeE، این مقدار به طور معنی‌داری افزایش یافت. در تیمار YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1)، آنتی‌اکسیدان به ۵۵/۸۳٪ رسید که بیانگر ۱۳/۸۳٪ افزایش نسبت به شاهد است. با افزایش غلظت YeE در غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE2)، آنتی‌اکسیدان به ۶۰/۸۲٪ افزایش یافت که برابر ۲۴/۰۲٪ نسبت به شاهد می‌باشد. در تیمار YeE با غلظت ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE3)، بیشترین آنتی‌اکسیدان با مقدار ۶۳/۹۵٪ مشاهده شد که ۳۰/۳۷٪ افزایش نسبت به شاهد را نشان می‌دهد (شکل ۴f).

اثر الیستور عصاره مخمر بر صفات بیوشیمیایی گیاه داوودی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر الیستور YeE بر صفات بیوشیمیایی گیاه داوودی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴).

۶۷/۲۴٪ و ۸۶/۴۷٪ افزایش نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۴d).

فلاونوئید

نتایج نشان داد که استفاده از YeE منجر به افزایش قابل توجهی در محتوای فلاونوئید در مقایسه با شاهد شد. در تیمار شاهد محتوای فلاونوئید برابر ۲۵/۸۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر بود. در تیمار YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1)، محتوای فلاونوئید به ۳۰/۰۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر افزایش یافت که برابر ۱۶/۲۰٪ افزایش نسبت به شاهد است. در تیمار YeE با غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در گرم وزن تر (YeE2)، محتوای فلاونوئید به ۳۳/۴۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر رسید که نشان‌دهنده ۲۹/۴۴٪ افزایش نسبت به شاهد می‌باشد. در تیمار YeE با غلظت ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE3) بیشترین محتوای فلاونوئید با مقدار ۴۰/۹۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر مشاهده شد که ۵۸/۴۶٪ افزایش نسبت به شاهد را نشان می‌دهد (شکل ۴e).

آنتی‌اکسیدان

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از YeE به طور قابل

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس اثر الیستور عصاره مخمر بر صفات بیوشیمیایی داوودی

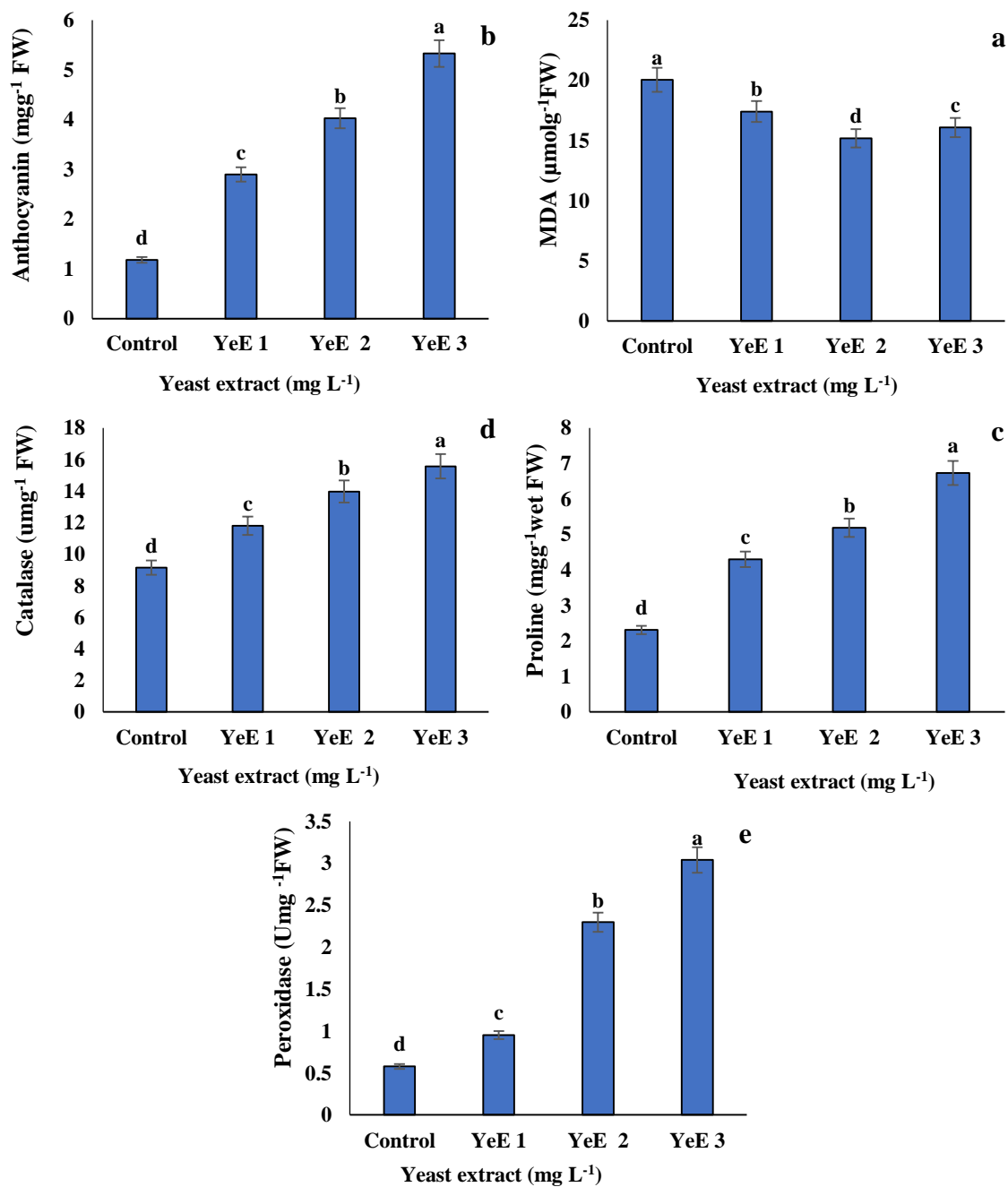
Table 4. Results of analysis of variance of the effect of yeast extract on biochemical traits of *Chrysanthemum morifolium* L.

S.O.V	df	M.S.				
		Malondialdehyde	Anthocyanin	Proline	Catalase	Peroxidase
Yeast extract	3	13.46**	9.28**	10.20**	23.27**	3.97**
Experimental error	8	0.142	0.0099	0.0877	0.105	0.00874
C.V. (%)	-	2.19	2.97	6.38	2.57	5.44

مقابل ۲۰/۰۵ میکرومول بر گرم وزن تر در شاهد). این کاهش در تیمار YeE با غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE2) به ۲۴/۱۵٪ رسید (۱۵/۱۸ میلی‌گرم بر لیتر در مقابل ۲۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر در شاهد). همچنین، در تیمار YeE با غلظت ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE3)، کاهش ۱۹/۸۹٪ در میزان MDA مشاهده شد (۱۶/۰۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر در مقابل ۲۰/۰۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر در شاهد) (شکل ۴a).

مالون دی‌آلدئید

نتایج نشان می‌دهد که استفاده از YeE منجر به کاهش میزان MDA در مقایسه با شاهد شده است. کاهش MDA می‌تواند به عنوان نشانه‌ای از کاهش تنش اکسیداتیو و آسیب‌های ناشی از آن در سلول‌ها تفسیر شود. در تیمار YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1)، MDA به میزان ۱۳/۱۲٪ کاهش یافت (۱۷/۴۱ میکرومول بر گرم وزن تر در



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف الیسیتور عصاره مخمر بر مالون دی آلدئید (a)، آنتوسیانین (b)، پرولین (c)، کاتالاز (d) و پراکسیداز (e) گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)

Figure 7. Mean comparison of different concentrations of yeast extract elicitor on malondialdehyde (a), anthocyanin (b), proline (c), catalase (d), and peroxidase (f) of *Chrysanthemum morifolium*

Control (0 mg L⁻¹), YeE1 (1000 mg L⁻¹), YeE2 (1200 mg L⁻¹), and YeE3 (1400 mg L⁻¹) represent the different yeast extract treatments applied in the culture medium. Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

است. آنتوسیانین‌ها از جمله مهمترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاهان هستند که علاوه بر نقش حفاظت سلولی، در مقابله با

آنتوسیانین کاربرد YeE تأثیر چشمگیری بر افزایش آنتوسیانین داشته

پراکسیداز

نتایج نشان می‌دهد که استفاده از YeE تأثیر قابل توجهی بر افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه داشته است. مقدار فعالیت پراکسیداز در تیمار شاهد برابر با ۰/۵۷۸ واحد بر میلی‌گرم در گرم وزن تر بود. در حالی که این مقدار در تیمارهای مختلف YeE به‌طور معناداری افزایش یافت. در تیمار YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1)، فعالیت پراکسیداز به ۰/۹۵۲ واحد بر میلی‌گرم در گرم وزن تر رسید که نشان‌دهنده افزایش ۶۴/۷ درصدی نسبت به شاهد است. در تیمار YeE با غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE2)، این فعالیت به ۲/۲۹۷ واحد بر میلی‌گرم در گرم وزن تر افزایش یافت که برابر ۲۹۷/۵ درصد بیشتر از شاهد بود. بیشترین مقدار فعالیت پراکسیداز در تیمار YeE با غلظت ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE3)، با مقدار ۳/۰۴ واحد بر میلی‌گرم در گرم وزن تر مشاهده شد (شکل ۷e).

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که ترکیب ۲ میلی‌گرم BAP + ۲ میلی‌گرم 2,4-D در ریزنمونه برگ و شرایط روشنایی بهترین پاسخ را از نظر القای کالوس و افزایش زیست‌توده در *Chrysanthemum morifolium* ایجاد کرد. این افزایش احتمالاً به‌دلیل تعادل مؤثر بین اکسین مصنوعی 2,4-D و سیتوکینین BAP رخ داده است. 2,4-D به‌عنوان یک اکسین قوی، باعث تمایززدایی سلول‌ها، القای تقسیم سلولی و تشکیل کالوس می‌شود. در حالی که BAP با تحریک تکثیر سلولی، رشد کالوس را تقویت می‌کند (Handayani et al., 2019). نسبت متعادل این دو هورمون در این تیمار احتمالاً مسیرهای تنظیمی مرتبط با رشد غیرتمایزی را فعال کرده و تشکیل کالوس را به حداکثر رسانده است. استفاده از برگ به‌عنوان ریزنمونه نیز به‌دلیل میزان بالاتر سلول‌های مرستمی و حساسیت بیشتر به تنظیم‌کننده‌های رشد، درصد کالوس‌زایی را افزایش می‌دهد (André et al., 2015). علاوه بر این، شرایط نوری (روشنایی) احتمالاً با افزایش فتوسنتز و تولید

تنش‌های محیطی نیز نقش اساسی ایفا می‌کنند (Enaru et al., 2021). در تیمار YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1)، میزان آنتوسیانین نسبت به شاهد ۲/۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر افزایش یافت. این افزایش در تیمار YeE با غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE2) برابر با ۴/۵۰۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر و در تیمار YeE با غلظت ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE3) برابر با ۵/۳۳ میلی‌گرم در گرم بود (شکل ۷b).

پرولین

در این مطالعه میزان پرولین در تیمار شاهد برابر با ۲/۳۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود. این مقدار در تیمار YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1) به ۴/۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر افزایش یافت. در غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE2)، مقدار پرولین به ۵/۱۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر رسید. بیشترین میزان پرولین در غلظت ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE3) مشاهده شد که به ۶/۷۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر رسید (شکل ۷c).

کاتالاز

استفاده از YeE تأثیر قابل توجهی بر افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان داشته است. آنزیم کاتالاز یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کلیدی در گیاهان است که وظیفه تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن را بر عهده دارد و نقش مهمی در کاهش تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند. براساس داده‌های ارائه شده، فعالیت کاتالاز در تیمار شاهد برابر با ۹/۱۵ واحد بر میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود. این مقدار در تیمار YeE با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE1) به ۱۱/۸ واحد بر میلی‌گرم در گرم وزن تر افزایش یافت. در غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE2)، این فعالیت به ۱۳/۹۷ واحد بر میلی‌گرم بر گرم وزن تر رسید. بیشترین فعالیت کاتالاز در غلظت ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (YeE3) مشاهده شد که به ۱۵/۵۷ واحد بر میلی‌گرم در گرم وزن تر رسید (شکل ۷d).

روز) و بیشترین درصد تشکیل کالوس (۸۷/۵۰٪) در گیاه *Solanum tuberosum* L. در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP + NAA مشاهده شد (Kumlay & Ercisli, 2015). این افزایش ناشی از اثر هم‌افزایی سیتوکینین (BAP) و اکسین (2,4-D) در تحریک تقسیم سلولی و رشد کالوس است (Bano et al., 2022). البته تعادل مناسب اکسین به سیتوکینین در این تیمار موجب تقویت رشد نامتمایز کالوس شده است (de Oliveira et al., 2022). افزایش وزن تر کالوس در تیمار E1H5L که در شرایط روشنائی قرار داشت، احتمالاً به دلیل تأثیر نور بر تنظیم متابولیسم، تعادل هورمونی و افزایش تقسیم سلولی بوده است. نور با بهبود فتوسنتز و تأمین انرژی، رشد سلول‌های کالوس را تقویت کرده و می‌تواند از طریق تنظیم هورمون‌هایی مانند سیتوکینین و اکسین، مسیرهای تقسیم سلولی را فعال‌تر کند (Cavallaro et al., 2022). از سوی دیگر، نور با افزایش بیوسنتز متابولیت‌های اولیه، تولید ATP و NADPH و تنظیم تعادل اکسیداتیو، انرژی لازم برای رشد و افزایش زیست توده کالوس را فراهم می‌کند (Zubova et al., 2024). برگ‌ها دارای میزان بیشتری از مواد تنظیم‌کننده رشد، متابولیت‌های اولیه و ثانویه و ذخایر کربوهیدراتی هستند که می‌توانند رشد و تقسیم سلولی را در کالوس‌زایی تقویت کنند (Khan et al., 2018). علاوه بر این، برگ‌ها معمولاً سلول‌های مرستمی فعال‌تری نسبت به ساقه دارند که منجر به تکثیر سریع‌تر سلولی و افزایش زیست توده کالوس می‌شود (André et al., 2015). همچنین، نسبت بالاتر آب و ترکیب‌های فنولی کمتر در برگ‌ها نسبت به ساقه، می‌تواند موجب کاهش تنش اکسیداتیو و بهبود رشد کالوس شود. از سوی دیگر، ساقه‌ها ممکن است دارای بافت لیگنینی و ساختارهای مکانیکی سخت‌تر باشند که فرایند کالوس‌زایی را محدود کرده و رشد را کاهش می‌دهند (Nazir et al., 2019). در تحقیقی، ترکیب ۸ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در شرایط نوری، بیشترین وزن کالوس را ایجاد کرد (Puad et al., 2024). در پژوهشی، ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP تأثیر قابل‌توجهی بر افزایش وزن کالوس برگ‌های *Piper betle* L. داشتند (Junairiah et al.,

متابولیت‌های ثانویه، محیط مناسبی برای رشد کالوس فراهم کرده است (Kapoor et al., 2018). در تحقیقی روی گیاه *Coffea arabica*، نتایج نشان داد که ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP توانست ۴۹٪ کالوس برگ‌ها را پس از سه هفته القا کند. علاوه بر این، ترکیب ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین نتیجه را برای تکثیر کالوس فراهم کرد (Munawarti et al., 2024). در مطالعه‌ای، غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌عنوان ترکیب هورمونی بهینه برای تولید بیشترین میزان کالوس گیاه *Trachyspermum ammi* شناسایی شد (Fazeli-Nasab, 2018). در پژوهشی، بهترین غلظت برای القای کالوس در *Hymenocallis littoralis* با استفاده از ترکیب 2,4-D همراه با BAP به‌دست آمد که منجر به ۹۳/۷۵٪ القای کالوس شد (Sundarasekar et al., 2012). نتایج تحقیقی روی گیاه *Momordica cochinchinensis* نیز نشان داد که بهترین غلظت برای پاسخ‌دهی رشد و توسعه القای کالوس در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در ریزنمونه‌های برگ بود (Nidaulhasanah et al., 2025). افزایش زمان تا آغاز کالوس‌زایی در تیمار E_2H_2L می‌تواند ناشی از تأثیر متقابل نوع بافت، هورمون‌ها و شرایط نوری باشد (Zhou et al., 2018). نسبت اکسین به سیتوکینین در این تیمار احتمالاً تعادلی ایجاد کرده که تقسیم سلولی را به تأخیر انداخته است (Schaller et al., 2015). در پژوهشی روی گیاه *Piper betle* سریع‌ترین زمان القای کالوس به‌مدت ۱۳/۱۷ روز در برگ‌ها با افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد (Junairiah et al., 2020). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، ترکیب هورمون‌های 2,4-D و BAP در گیاه *Piper retrofractum* باعث شد تا القای کالوس به‌طور میانگین ۱۵ روز پس از کشت آغاز شود (Arofah et al., 2021). محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP نیز در گیاه *Allium hirtifolium* باعث کمترین زمان تا آغاز کالوس‌زایی شد (Farhadi et al., 2017). در پژوهشی دیگر، کمترین زمان القای کالوس (۸/۳۳)

تسریع رشد کالوس و افزایش حجم آن می‌شود (Mayerni et al., 2020). علاوه بر این، روش‌نایی به‌عنوان یک عامل محیطی مؤثر می‌تواند فرایندهای متابولیکی و بیوشیمیایی لازم برای رشد بهینه کالوس را تحریک کرده و در نهایت به افزایش حجم آن کمک کند (Tariq et al., 2014). در مطالعه‌ای روی گیاه *Glinus lotoides*، بیشترین القای کالوس (۱۰۰٪) در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D همراه با BAP مشاهده شد که با افزایش حجم کالوس همراه بود (Teshome & Feyissa, 2015). در پژوهشی دیگر، حجم کالوس گیاه *Pimpinella alpina* در محیط کشت MS حاوی ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D افزایش یافت (Faramayuda et al., 2022).

عصاره مخمر می‌تواند مقاومت گیاهان را به تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری و بیماری‌ها افزایش دهد. این اثرها موجب بهبود شاخص‌های رشد گیاه و افزایش کارایی آن تحت شرایط نامساعد محیطی می‌شود (Ma et al., 2020). YeE می‌تواند موجب بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیکی مانند فرایند فتوسنتز، جذب و انتقال مواد مغذی و حفظ تعادل آب در گیاه شود، این موضوع باعث تقویت عملکرد کلی گیاه و بهبود شاخص‌های مورد نظر می‌شود (Abd El-Sattar & Abdelhameed, 2024). کاهش وزن تر کالوس با افزایش غلظت YeE احتمالاً به دلیل عدم تعادل هورمونی، تنش اسمزی و اثر بازدارنده ترکیب‌های فنلی و پلی‌آمین‌ها بر رشد سلولی می‌باشد (Muilu-Mäkelä et al., 2015). در تحقیقی وزن تر کالوس (*Phoenix dactylifera* L.) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر YeE در مقایسه به شاهد مشاهده شد (Al-Khayri, 2011). در آزمایشی غلظت متوسط عصاره مخمر (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) سبب تجمع زیستی توده یعنی وزن نسبت به شاهد شد (Zaman et al., 2022). در پژوهشی وزن تر کالوس *Psoralea corylifolia* توسط YeE افزایش یافت که در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر YeE به حداکثر رسید (Al-Khayri et al., 2011). تیمار با YeE سبب افزایش وزن تر کالوس سبب شد (Sarkate et al., 2017). انباشت زیست توده افزایش یافته در کشت‌های تحریک شده در مقایسه با گروه کنترل در

2020). همچنین ترکیب هورمون‌های 2,4-D و BAP در محیط کشت موجب افزایش وزن تر کالوس در برگ‌های *Piper retrofractum* شد (Arofah et al., 2021). در تحقیقی نیز مشخص شد که استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در گیاه *Justicia gendarussa* باعث افزایش وزن تر کالوس به میزان ۲/۲۴۷ گرم گردید (Wahyuni et al., 2017).

افزایش وزن خشک در این تیمار به دلیل تحریک تقسیم سلولی و تمایز سلولی ناشی از غلظت مناسب از هر دو هورمون BAP (سیتوکینین) و 2,4-D (اکسین) می‌باشد (Andaryani et al., 2019). این ترکیب هورمونی موجب افزایش فعالیت‌های بیوشیمیایی در کالوس‌ها، به‌ویژه در مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه و سنتز پروتئین‌ها و ترکیب‌های ساختاری می‌شود که منجر به افزایش زیست توده و وزن خشک می‌گردد (Rybin et al., 2024). علاوه بر این، روش‌نایی می‌تواند به‌عنوان محرک در رشد و نمو کالوس‌ها عمل کند و باعث افزایش کارایی فرایندهای متابولیکی در طول رشد سلولی شود (Yu et al., 2019). میزان وزن خشک کالوس گیاه *Piper retrofractum* Vahl. در ترکیب هورمون‌های 2,4-D و BAP افزایش یافت (Arofah et al., 2021). در تحقیقی، استفاده از ترکیب ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، باعث افزایش وزن خشک کالوس برگ گیاه *Stevia rebaudiana* پس از ۴ هفته شد (Pacaldo & Arradaza, 2021). همچنین در مطالعه‌ای، بهترین ترکیب برای القای کالوس در برگ‌های *Piper betle* L. شامل ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بود که منجر به بالاترین وزن خشک کالوس به میزان ۰/۰۹ گرم گردید (Junairiah et al., 2020).

افزایش حجم کالوس توسط این تیمار به دلیل ترکیب اثرهای همزمان هورمون‌ها و شرایط محیطی است. BAP به‌عنوان یک سیتوکینین باعث تحریک تقسیم سلولی و افزایش تولید سلول‌های جدید می‌شود، در حالی که 2,4-D به‌عنوان یک اکسین باعث القای کالوس و تسهیل تمایز سلولی می‌گردد (Handayani et al., 2019). این ترکیب هورمونی باعث

شامل موادمعدنی، آمینواسیدها و کربوهیدرات‌ها باشد که به‌طور مستقیم در متابولیسم کالوس و تولید انرژی نقش دارند (Rafiee *et al.*, 2016). باعث افزایش ظرفیت نگهداری آب در کالوس می‌شود که به تورژسانس بهتر و افزایش حجم آن منجر می‌گردد (Zaman *et al.*, 2022). همچنین، YeE می‌تواند تعادل هورمونی را بهبود ببخشد، آنگیری سلول‌ها را افزایش دهد و باعث گسترش بیشتر بافت کالوسی شود که در نهایت منجر به افزایش حجم کالوس می‌گردد (Sardar *et al.*, 2023). تجمع زیست‌توده کالوس *Ocimum basilicum* L. توسط YeE (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) نشان داده شد (Zaman *et al.*, 2022). حجم کالوس (*Linum grandiflorum* Desf.) در غلظت‌های بالای YeE (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) افزایش یافت (Goncharuk *et al.*, 2022).

نیترژن و آهن از اجزای کلیدی برای سنتز کلروفیل *a* هستند (Li *et al.*, 2021). عصاره مخمر ممکن است این عناصر را تأمین کرده یا جذب آنها توسط گیاه را افزایش دهد (Tao *et al.*, 2022). YeE می‌تواند فعالیت آنزیم‌هایی مانند گلوتامات‌کیناز و کلروفیل‌از را که در مسیرهای بیوشیمیایی سنتز کلروفیل نقش دارند تحریک کند (Ahmed *et al.*, 2020). افزایش غلظت کلروفیل *a* در تیمار با YeE به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با سنتز کلروفیل و بهبود شرایط فیزیولوژیک گیاهان ناشی از ترکیب‌های مغذی موجود در YeE می‌باشد، این ترکیب‌ها می‌توانند تأمین موادمغذی، ویتامین‌ها و هورمون‌ها را بهبود بخشیده و موجب افزایش فتوسنتز و تولید کلروفیل بیشتر شوند (Dawood *et al.*, 2013). همچنین، YeE می‌تواند باعث تقویت فعالیت فتوسنتزی و بهبود وضعیت متابولیکی گیاه گردد که در نهایت منجر به افزایش غلظت کلروفیل *a* می‌شود (Taha *et al.*, 2020). براساس گزارش‌ها، استفاده از YeE منجر به افزایش معنی‌دار محتوای کلروفیل *a* در گیاهان مختلف شده است (Abdelaal *et al.*, 2021; Hammad & Ali, 2014).

افزایش کلروفیل *b* در کاربرد YeE در غلظت‌های پایین ممکن است به دلیل تحریک فعالیت‌های آنزیم‌های مرتبط با سنتز کلروفیل و بهبود جذب موادمغذی باشد که موجب تقویت

کشت‌های *Eryngium planum* L. (Kikowska *et al.*, 2015)، *Salvia castanea* (Yang *et al.*, 2018)، و کشت‌های ریشه مویین *Tropaeolum majus* (Wielanek & Urbanek, 2006) که با YeE تیمار شده بودند، مشاهده شده است.

ترکیب YeE حاوی ترکیب‌هایی مانند ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و هورمون‌های رشد است که می‌توانند تولید متابولیت‌های اولیه (مانند پروتئین‌ها و قندها) و ثانویه (مانند ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدها) را در کالوس افزایش دهند و به تجمع مواد خشک کمک کنند (Thakur *et al.*, 2019). ترکیب‌های موجود در YeE می‌توانند جذب و انتقال عناصر ضروری مانند نیترژن، فسفر و پتاسیم را تسهیل کرده و متابولیسم گیاه را تقویت کنند که این موضوع باعث افزایش تولید زیست‌توده می‌شود (Youssef *et al.*, 2022). عصاره مخمر سنتز ترکیب‌های ساختاری مانند سلولز و همی‌سلولز را تحریک می‌کند که به استحکام بیشتر سلول‌ها و افزایش وزن خشک کالوس منجر می‌شود (Caffall & Mohnen, 2009). کاهش وزن خشک کالوس در تیمار با YeE به دلیل افزایش محتوای آب کالوس، تغییر در تعادل هورمونی، کاهش تجمع متابولیت‌های ساختاری (مانند سلولز و لیگنین) و تأثیر تنش اسمزی ناشی از ترکیب‌های موجود در YeE می‌باشد که باعث کاهش زیست‌توده خشک شده است (Sardar *et al.*, 2023). در آزمایشی YeE ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش وزن خشک کالوس *Ocimum basilicum* L. برابر نسبت به شاهد شد (Zaman *et al.*, 2022). وزن خشک کالوس *Stevia rebaudiana* توسط تیمار YeE در مقایسه با شاهد افزایش یافت (Al-Abadi, 2020). در مطالعه‌ای ترکیب YeE با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش معنی‌دار وزن خشک کالوس *Plumbago zeylanica* L. گردید (Singh *et al.*, 2020). کاربرد YeE سبب افزایش وزن خشک کالوس در سیب شد (Laezza *et al.*, 2024).

ترکیب YeE حاوی ترکیب‌های محرک رشد مانند ویتامین‌ها، پلی‌آمین‌ها، یا محرک‌های هورمونی (مانند اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها) می‌باشد که تقسیم سلولی و رشد کالوس را تقویت می‌کنند (Alshallash *et al.*, 2022). YeE می‌تواند

نقش کلیدی دارند و باعث افزایش تجمع این ترکیب‌ها می‌شوند. ترکیب‌های فنلی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی شناخته می‌شوند که نقش مهمی در خنثی‌سازی ROS و کاهش تنش اکسیداتیو دارند (Zhang *et al.*, 2022). در آزمایشی ۱۰۰ YeE میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش محتوای فنل کل در کالوس *Ocimum basilicum* L. شد (Zaman *et al.*, 2022). در پژوهشی گزارش شد کشت درون شیشه‌ای *Thymus lottocephalus* با تیمارهای ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر YeE باعث افزایش ۲۳ درصدی محتوای فلاونوئیدی شد (Gonçalves *et al.*, 2019). در مطالعه‌ای ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر YeE به سنتز بهینه ترکیب‌های فنولی در کشت‌های کالوس کتان منجر شد (Nadeem *et al.*, 2018).

نتایج این تحقیق نشان‌دهنده نقش مثبت YeE در تحریک تولید فلاونوئیدها است. فلاونوئیدها به‌عنوان ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی قوی می‌توانند مقاومت گیاه را در برابر تنش‌های محیطی افزایش داده و عملکرد سیستم دفاعی گیاه را تقویت کنند (Shomali *et al.*, 2022). افزایش درصد فلاونوئید در تیمارهای مختلف YeE بیانگر تأثیر مثبت این الیسیاتور بر بهبود متابولیسم گیاه است (Akbari & Golkar, 2023). Sobhanizadeh و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر YeE را بر افزایش میزان فلاونوئید کالوس‌های گیاه سیاه‌دانه گزارش کردند (Sobhanizadeh *et al.*, 2017). تأثیر مثبت YeE بر افزایش محتوای فلاونوئیدها در شرایط کشت‌بافتی در مطالعات مختلف گزارش شده است. Sobhanizadeh و همکاران (۲۰۱۷) افزایش معنی‌دار میزان فلاونوئید در کالوس‌های گیاه سیاه‌دانه را در پاسخ به تیمار YeE نشان دادند. در مطالعه‌ای دیگر، گزارش شده که تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر YeE موجب افزایش ۱۱/۹ درصدی در محتوای فلاونوئیدی شد (Gonçalves *et al.*, 2019). همچنین، در پژوهشی روی گیاه *Ocimum basilicum* L. بیشترین میزان فلاونوئید در تیمار با ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر مشاهده گردید (Açıkgöz, 2020).

YeE سنتز ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی را در گیاه تحریک می‌کند. این ترکیب‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های

ساختار فتوسنتزی و افزایش تولید کلروفیل می‌شود (Youssef *et al.*, 2022). این افزایش در غلظت‌های پایین می‌تواند ناشی از تأثیر مثبت YeE بر تعادل هورمونی، بهبود فتوسنتز و افزایش جذب نور باشد (Dawood *et al.*, 2013)؛ اما در غلظت‌های بالاتر، احتمالاً ترکیب‌های موجود در YeE به‌میزان بیش از حد موجب تنش اسمزی، مهار فعالیت آنزیم‌های سنتزی و کاهش کارایی فتوسنتز می‌شود که منجر به کاهش تولید کلروفیل *b* می‌گردد (Betlej *et al.*, 2020). در پژوهشی تیمار YeE با غلظت ۰/۱ در مرزنجوش سبب افزایش میزان کلروفیل *b* به‌میزان ۴۴ درصد شد (Zlotek, 2017). ترکیب YeE با فعال‌سازی آنزیم‌های کلیدی مانند فیتوئن سینتتاز (PSY) و کاروتن دیسموتاز، مسیر بیوسنتزی کاروتنوئیدها را تحریک می‌کند. این آنزیم از ترکیب‌های اولیه مانند ژرانیل ژرانیل پیروفسفات (GGPP) برای تولید کاروتنوئیدها استفاده می‌کند (Jiang *et al.*, 2024). YeE می‌تواند بیان ژن‌های مرتبط با سنتز کاروتنوئیدها (مانند PSY، PDS و ZDS) را تنظیم کند و این منجر به افزایش تولید این ترکیب‌ها می‌شود (Kayani *et al.*, 2024). تیمار YeE با افزایش تولید کاروتنوئیدها، به بهبود بازدهی فتوسنتز کمک می‌کند (Abdelaal *et al.*, 2021). محتوای کاروتنوئیدها در برگ‌های مرزنجوش تحریک شده با YeE مشاهده شد (Zlotek, 2017).

ترکیب YeE حاوی ترکیب‌هایی مانند گلیکان‌ها، پروتئین‌ها و پیتیدها است که گیرنده‌های سیگنال در سلول‌های گیاهی را تحریک می‌کند. این تحریک باعث فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ دفاعی مانند مسیر اسیدسالیسیلیک و اسید جاسمونیک می‌شود. این مسیرها تولید فنل‌ها و سایر ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهند (Ramirez-*et al.*, 2016). در پاسخ به الیسیاتور، تولید موقت ROS مانند پراکسید هیدروژن در سلول‌های گیاهی افزایش می‌یابد. این ROS به‌عنوان مولکول سیگنال‌دهنده عمل کرده و تولید آنزیم‌های مربوط به سنتز فنل‌ها را افزایش می‌دهد (Berni *et al.*, 2019). تیمار با YeE باعث تحریک فعالیت آنزیم‌هایی مانند PAL، کینامات-۴-هیدروکسیلاز (C4H) و پلی‌فنل‌اکسیداز می‌شود. این آنزیم‌ها در مسیر بیوسنتز فنل‌ها

می‌شود (Humbal & Pathak, 2023). YeE می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین، مانند آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پلی فنل هیدروکسیلاز شود که نقش مهمی در تولید آنتوسیانین دارند (Xu et al., 2022). YeE به‌عنوان یک الیسیاتور مقاومت گیاه را در برابر تنش‌های محیطی افزایش می‌دهد. این موضوع می‌تواند منجر به تولید بیشتر آنتوسیانین به‌عنوان یک ترکیب دفاعی شود (El-Beltagi et al., 2022).

پرویلین عمدتاً از طریق مسیر گلوتامات سنتز می‌شود. در شرایط تنش، افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند پرویلین-۵-کربوکسیلات سنتتاز که مرحله کلیدی در سنتز پرویلین را کاتالیز می‌کند، باعث افزایش تجمع این اسیدآمینو می‌شود (Rai & Penna, 2013). YeE با تحریک این آنزیم و کاهش فعالیت آنزیم‌هایی که در تجزیه پرویلین نقش دارند میزان پرویلین را افزایش می‌دهند (Liang et al., 2013). علاوه بر این، پرویلین به‌عنوان یک اسمولیت، تعادل اسمزی سلول‌ها را حفظ کرده و با تثبیت پروتئین‌ها و غشاها از آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (Shafi et al., 2019). همچنین، پرویلین می‌تواند با کاهش غلظت گونه‌های فعال اکسیژن، به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق بهبود فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو تنش اکسیداتیو را کاهش دهد (Zandi & Schnug, 2022). تأثیر YeE در بهبود رشد و افزایش متابولیت‌های سازگار با تنش، از جمله پرویلین، در شرایط کشت درون شیشه‌ای در مطالعات متعددی گزارش شده است. برای نمونه، در پژوهشی روی کالوس‌های گیاه *Limonium algarvense* استفاده از غلظت‌های مختلف عصاره مخمر منجر به افزایش معنی‌دار پرویلین گردید (Gonçalves et al., 2025). همچنین، مطالعه‌ای دیگر روی کشت درون شیشه‌ای *Vaccinium arctostaphylos* L. افزودن YeE به محیط کشت موجب افزایش تولید ترکیب‌های فنلی مانند روتین شد، هرچند اثر محسوسی بر رشد کالوس مشاهده نشد (Kazemi et al., 2023).

YeE حاوی ترکیب‌های زیست فعال مانند پلی‌ساکاریدها، ویتامین‌ها، آمینواسیدها و فاکتورهای رشد است که می‌تواند

غیرآنزیمی قوی عمل کرده و از اکسیداسیون سلولی جلوگیری می‌کنند (Taha et al., 2016). افزایش این متابولیت‌های ثانویه می‌تواند نقش مهمی در بهبود فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو داشته باشد. YeE از طریق افزایش بیان ژن‌های مسئول تولید آنزیم‌های آنزیم‌های اکسیداتیو و ترکیب‌های محافظتی، نقش مستقیم در افزایش فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو ایفا می‌کند (Zahoor et al., 2022). براساس نتایج تحقیقی، قدرت آنزیم‌های اکسیداتیو گیاه کاهو در پاسخ به YeE افزایش یافت (Złotek, 2017).

این نتایج نشان‌دهنده اثر YeE در کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش تنش اکسیداتیو در گیاهان تحت تیمار است. YeE با تحریک سیستم‌های آنزیم‌های اکسیداتیو گیاه از تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌کند. این آنزیم‌ها می‌توانند رادیکال‌های آزاد تولید شده در طی تنش اکسیداتیو را خنثی کرده و از آسیب به غشاهای سلولی جلوگیری نمایند (Goncharuk et al., 2022). YeE به‌عنوان یک الیسیاتور می‌تواند موجب کاهش رادیکال‌های آزاد مانند سوپراکسید و هیدروکسیل رادیکال‌ها شود که معمولاً باعث آسیب به لیپیدها و افزایش سطح MDA می‌گردند. این کاهش رادیکال‌ها می‌تواند به کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش MDA منجر شود (Lala, 2021). YeE باعث فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی دفاعی در گیاه مانند مسیرهای MAPK و تولید هورمون‌های گیاهی مانند اسید سالیسیلیک و اتیلن می‌شود که نقش مهمی در تنظیم واکنش‌های دفاعی و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو دارند (Sun et al., 2023). این نتایج با یافته‌های قبلی گزارش شده مطابقت داشت (Kaya et al., 2019؛ Nie et al., 2019؛ Talaat & Shawky, 2013).

نتایج این تحقیق نشان‌دهنده تأثیر مثبت YeE در افزایش تولید آنتوسیانین است. YeE با تحریک سیستم‌های سیگنال‌دهی داخلی گیاه، مانند مسیریابی هورمونی و فعال‌سازی ژن‌های مربوط به سنتز آنتوسیانین، باعث افزایش تولید آنتوسیانین می‌شود (Li et al., 2024). این عصاره به‌عنوان الیسیاتور می‌تواند موجب تولید مقادیر کم ROS شود که در بسیاری از موارد منجر به تحریک واکنش‌های دفاعی گیاه و افزایش سنتز ترکیب‌های فیتوشیمیایی مانند آنتوسیانین

ژن‌های مرتبط با سنتز این آنزیم است، این روند نشان می‌دهد که استفاده از غلظت‌های بهینه YeE می‌تواند سازوکار دفاعی گیاه را تقویت کرده و توانایی آن را برای مقابله با تنش‌های محیطی بهبود بخشد. Mohrrami و همکاران (۲۰۱۷) در کشت‌های ریشه مویین بذربالنج نشان دادند که تیمار با YeE فعالیت آنزیم پراکسیداز را افزایش داده است (Mohrrami et al., 2017). در تحقیقی اعمال تیمار YeE در گیاه *Levisticum officinale* افزایش ۶۱ درصدی فعالیت آنزیم پراکسیداز را موجب شد (Złotek et al., 2020).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که تیمار برگ، ۲ میلی‌گرم BAP + ۲ میلی‌گرم 2,4-D و روشنایی بالاترین میزان کالوس‌زایی، کمترین زمان تا آغاز کالوس‌زایی و بیشترین وزن تر و خشک کالوس را به همراه داشت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهند که استفاده از عصاره مخمر به‌عنوان یک الیسیاتور طبیعی می‌تواند تأثیر قابل‌توجهی بر فرایند رشد کالوس در کشت‌های بافت گیاهی داشته باشد. تیمارهای مختلف عصاره مخمر به‌ویژه در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، باعث افزایش چشمگیر وزن تر، خشک، حجم کالوس و ترکیب‌های فیزیولوژیکی-متابولیتی مانند کلروفیل، کاروتنوئید، فنول و فلاونوئید شدند. علاوه بر این، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش سطح مالون دی‌آلدئید در تیمارهای حاوی عصاره مخمر نشان‌دهنده توانمندی این الیسیاتور در کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود شرایط رشدی کالوس‌ها است. به‌طورکلی، عصاره مخمر می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مؤثر در بهبود رشد کالوس و افزایش متابولیت‌های مهم دارویی، به‌ویژه در گیاهان دارویی مطرح باشد.

مسیرهای سیگنال‌دهی گیاه را فعال کرده و بیان ژن‌های مرتبط با سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز را تحریک کنند. این فرایند منجر به کاهش اثر منفی تنش‌های زیستی و غیرزیستی، از جمله آسیب‌های ناشی از ROS می‌شود (Chanda et al., 2019; Alugoju et al., 2024). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در پاسخ به تیمار YeE در مطالعات متعددی گزارش شده است. نشان داده شده که تیمار با YeE در کشت درون شیشه‌ای بذربالنج موجب افزایش فعالیت آنزیمی شد (Mohrrami et al., 2017). همچنین، نشان داده شده که کاربرد الیسیاتور YeE در گیاه *Catharanthus roseus* به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گردید (Maqsood & Abdul, 2017). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که تیمار با YeE منجر به افزایش فعالیت کاتالاز در گیاه *Ammi visnaga* L. نسبت به شاهد شد (Akbari & Golkar, 2023). به‌علاوه، در پژوهشی بر روی گیاه *Phoenix dactylifera* L. تیمار با YeE به‌طور مؤثری فعالیت آنزیم کاتالاز را در شرایط درون شیشه‌ای افزایش داد (Sadeghi et al., 2023).

استفاده از YeE به‌عنوان یک الیسیاتور زیستی می‌تواند منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسیداز در گیاهان شود. این افزایش به‌ویژه در شرایط تنش، به دلیل نقش کلیدی پراکسیداز در تجزیه پراکسید هیدروژن و کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن اهمیت دارد (Fatemi et al., 2020). YeE حاوی ترکیب‌های فعال زیستی مانند پلی‌ساکاریدها، ویتامین‌ها، پلی‌آمین‌ها و فاکتورهای رشد است که می‌توانند مسیرهای سیگنال‌دهی گیاهی را فعال کنند و تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تحریک نمایند (Rafiee et al., 2016). در این مطالعه، افزایش غلظت YeE به‌طور معناداری فعالیت پراکسیداز را افزایش داد که احتمالاً ناشی از القای بیان

References

- Ab Rahman, Z., Govindasamy, S.K., Ngalm, A., Adlan, N.A.S., Basiron, N.N.A. and Othman, A.N., 2022. Callus induction of young leaf coconut cv. Matag with combination of 2, 4-

- dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D), α -naphthalene acetic acid (NAA) and benzyl amino purin (BAP). *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 13: 254-263. <https://doi.org/10.4236/abb.2022.135015>
- Abd El-Sattar, A.M. and Abdelhameed, R.E., 2024.

- Amelioration of salt stress effects on the morpho-physiological, biochemical and K/Na ratio of *Vicia faba* plants by foliar application of yeast extract. *Journal of Plant Nutrition*, 1-19. <https://doi.org/10.1080/01904167.2024.2327581>
- Abdelaal, K., Attia, K.A., Niedbała, G., Wojciechowski, T., Hafez, Y., Alamery, S., Alateeq, T.K. and Arafa, S.A., 2021. Mitigation of drought damages by exogenous chitosan and yeast extract with modulating the photosynthetic pigments, antioxidant defense system and improving the productivity of garlic plants. *Horticulturae*, 7: 510. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7120510>
 - Açıkgoz, M.A., 2020. Establishment of cell suspension cultures of *Ocimum basilicum* L. and enhanced production of pharmaceutical active ingredients. *Industrial Crops and Products*, 148: 112278. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112278>
 - Aebi, H., 1984. Catalase in vitro, methods in enzymology. Elsevier, 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
 - Ahmed, K.B.M., Khan, M.M.A., Siddiqui, H. and Jahan, A., 2020. Chitosan and its oligosaccharides, a promising option for sustainable crop production: A review. *Carbohydrate Polymers*, 227: 115331. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115331>
 - Akbary, R. and Golkar, P., 2023. Elicitation of medicinally-valuable secondary metabolites, enzymatic, and antioxidant activity using chitin and yeast extract in callus cultures of *Ammi visnaga* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 154: 689-702. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02456-1>
 - Alshallash, K.S., Mohamed, M.F., Dahab, A.A., Abd El-Salam, H.S. and El-Serafy, R.S., 2022. Biostimulation of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. with different yeast strains: Morphological performance, productivity, phenotypic plasticity, and antioxidant activity. *Horticulturae*, 8: 887. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8120887>
 - Alugoju, P., Palanisamy, C.P., Anthikapalli, N.V.A., Jayaraman, S., Prasanskulab, A., Chuchawankul, S., Dyavaiah, M. and Tencomnao, T., 2024. Exploring the anti-aging potential of natural products and plant extracts in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *F1000Research*, 12: 1265. <https://doi.org/10.12688/f1000research.141669.2>
 - Andaryani, S., Samanhudi, S. and Yunus, A., 2019. Effect of BAP and 2, 4-D on callus induction of *Jatropha curcas* in vitro. *Cell Biology and Development*. <https://doi.org/10.13057/cellbioldev/v030202>
 - André, S.B., Mongomaké, K., Modeste, K.K., Edmond, K.K., Tchoa, K., Hilaire, K.T. and Justin, K.Y., 2015. Effects of plant growth regulators and carbohydrates on callus induction and proliferation from leaf explant of *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 8(2): 118-127. <https://www.researchgate.net/publication/288609184>
 - Arofah, J., Manuhara, Y. and Nurhariyati, T., 2021. Effect of 2,4-D and BAP on callus induction of *Piper retrofractum* Vahl. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 14: 1390-1394. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2021.00248.1>
 - Bano, A.S., Khattak, A.M., Basit, A., Alam, M., Shah, S.T., Ahmad, N., Gilani, S.A.Q., Ullah, I., Anwar, S. and Mohamed, H.I., 2022. Callus induction, proliferation, enhanced secondary metabolites production and antioxidants activity of *Salvia moorcroftiana* L. as influenced by combinations of auxin, cytokinin and melatonin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65: e22210200. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-20222210200>
 - Bates, L.S., Waldren, R. and Teare, I., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
 - Berni, R., Luyckx, M., Xu, X., Legay, S., Sergeant, K., Hausman, J.-F., Lutts, S., Cai, G. and Guerriero, G., 2019. Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary metabolism. *Environmental and Experimental Botany*, 161: 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.04.006>
 - Bürkle, S., Walter, N. and Wagner, S., 2018. Laser-based measurements of pressure broadening and pressure shift coefficients of combustion-relevant absorption lines in the near-infrared region. *Applied Physics B*, 124: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.04.006>
 - Caffall, K.H. and Mohnen, D., 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344: 1879-1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>
 - Cavallaro, V., Pellegrino, A., Muleo, R. and Forgione, I., 2022. Light and plant growth regulators on in vitro proliferation. *Plants*, 11: 844. <https://doi.org/10.3390/plants11060844>
 - Chanda, M.J., Merghoub, N. and El Arroussi, H., 2019. Microalgae polysaccharides: the new sustainable bioactive products for the development of plant bio-stimulants? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35: 177. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2721-5>
 - Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C.,

2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- de Oliveira, L.S., Brondani, G.E., Molinari, L.V., Dias, R.Z., Teixeira, G.L., Gonçalves, A.N. and de Almeida, M., 2022. Optimal cytokinin/auxin balance for indirect shoot organogenesis of *Eucalyptus cloeziana* and production of ex vitro rooted micro-cuttings. *Journal of Forestry Research*, 33: 1573-1584. <https://doi.org/10.1007/s11676-021-01436-3>
 - El-Beltagi, H.S., Mohamed, H.I., Aldaej, M.I., Al-Khayri, J.M., Rezk, A.A., Al-Mssallem, M.Q., Sattar, M.N. and Ramadan, K.M., 2022. Production and antioxidant activity of secondary metabolites in Hassawi rice (*Oryza sativa* L.) cell suspension under salicylic acid, yeast extract, and pectin elicitation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 58: 615-629. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10263-0>
 - Enaru, B., Dreţcanu, G., Pop, T.D., Stănilă, A. and Diaconeasa, Z., 2021. Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation. *Antioxidants*, 10: 1967. <https://doi.org/10.3390/antiox10121967>
 - Farhadi, N., Panahandeh, J., Azar, A.M. and Salte, S.A., 2017. Effects of explant type, growth regulators and light intensity on callus induction and plant regeneration in four ecotypes of Persian shallot (*Allium hirtifolium*). *Scientia Horticulturae*, 218: 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.02.020>
 - Fatemi, F., Abdollahi, M.R., Mirzaie-Asl, A., Dastan, D. and Papadopoulou, K., 2020. Phytochemical, antioxidant, enzyme activity and antifungal properties of *Satureja khuzistanica* in vitro and in vivo explants stimulated by some chemical elicitors. *Pharmaceutical Biology*, 58: 286-296. <https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1732343>
 - Fazeli-Nasab, B., 2018. The effect of explant, BAP and 2,4-D on callus induction of *Trachyspermum ammi*. *Slovak Journal of Food Sciences/Potravinarstvo*, 12: 578-586. <https://doi.org/10.5219/879>
 - Gonçalves, S., Mansinhos, I., Rodríguez-Solana, R., Pérez-Santín, E., Coelho, N. and Romano, A., 2019. Elicitation improves rosmarinic acid content and antioxidant activity in *Thymus lotocephalus* shoot cultures. *Industrial Crops and Products*, 137: 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.019>
 - Goncharuk, E., Saibel, O., Zaitsev, G. and Zagorskina, N., 2022. The Elicitor effect of yeast extract on the accumulation of phenolic compounds in *Linum grandiflorum* cells cultured in vitro and their antiradical activity. *Biology Bulletin*, 49: 620-638. <https://doi.org/10.1134/S1062359022060075>
 - Guo, G. and Jeong, B.R., 2021. Explant, medium, and plant growth regulator (PGR) affect induction and proliferation of callus in *Abies koreana*. *Forests*, 12: 1388. <https://doi.org/10.3390/f12101388>
 - Gupta, R., Gupta, A., Jain, S., Singh, D. and Verma, N., 2021. *Chrysanthemum* production, viral diseases and their management. *Virus diseases of ornamental plants: characterization, identification, diagnosis and management*, Springer, 261-275. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8121-4_12
 - Hammad, S.A. and Ali, O.A., 2014. Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract. *Annals of Agricultural Sciences*, 59: 133-145. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2014.06.018>
 - Handayani, R.S., Yunus, I., Sayuti, M. and Irawan, E., 2019. In-vitro callus induction of durian (*Durio zibethinus* Murr.) leaves using kinetin and 2, 4-D (dichlorophenoxyacetic acid). *Journal of Tropical Horticulture*, 2: 59-64.
 - Heath, R.L. and Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)906541](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)906541)
 - Hemphill, J.K. and Venketeswaran, S., 1978. Chlorophyll and carotenoid accumulation in three chlorophyllous callus phenotypes of *Glycine max*. *American Journal of Botany*, 1063: 55-65. <https://doi.org/10.2307/2442471>
 - Humbal, A., and Pathak, B., 2023. Influence of exogenous elicitors on the production of secondary metabolite in plants: A review (“VSI: secondary metabolites”). *Plant Stress*, 8: 100166. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100166>
 - Jiang, Y., Ye, J., Hu, Y., Zhang, J., Li, W., Zhou, X., Yu, M., Yu, Y., Yang, J. and Yang, W., 2024. Extraction and synthesis of typical carotenoids: Lycopene, β -Carotene, and astaxanthin. *Molecules*, 29: 4549. <https://doi.org/10.3390/molecules29194549>
 - Jiang, Y., Zhang, W., Chen, X., Wang, W., Köllner, T.G., Chen, S., Chen, F. and Chen, F., 2021. Diversity and biosynthesis of volatile terpenoid secondary metabolites in the *Chrysanthemum* genus. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 40: 422-445. <https://doi.org/10.1080/07352689.2021.1918046>
 - Junairiah, T.W., Manuhara, Y.S.W. and Sulistyorini, L., 2020. Optimization of callus induction from *Piper betle* L. var. *Nigra* explants with various concentrations of coconut water and addition of 2, 4-

- D and NAP. *Annals of Biology*, 36(2), 324-328. [https://repository.unair.ac.id/125848/6/C24.%20Full text.rev.pdf](https://repository.unair.ac.id/125848/6/C24.%20Full%20text.rev.pdf)
- Kapoor, S., Raghuvanshi, R., Bhardwaj, P., Sood, H., Saxena, S. and Chaurasia, O.P., 2018. Influence of light quality on growth, secondary metabolites production and antioxidant activity in callus culture of *Rhodiola imbricata* Edgew. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 183: 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.024>
 - Kaya, C., Ashraf, M., Wijaya, L. and Ahmad, P., 2019. The putative role of endogenous nitric oxide in brassinosteroid-induced antioxidant defence system in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under water stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 143: 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.08.017>
 - Kayani, S.I., -Rahman, S.U., Shen, Q., Cui, Y., Liu, W., Hu, X., Zhu, F. and Huo, S., 2024. Molecular approaches to enhance astaxanthin biosynthesis; future outlook: engineering of transcription factors in *Haematococcus pluvialis*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 44: 514-529. <https://doi.org/10.1080/07388551.2023.2211234>
 - Khan, T., Abbasi, B.H., Zeb, A. and Ali, G.S., 2018. Carbohydrate-induced biomass accumulation and elicitation of secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. *Industrial Crops and Products*, 126: 168-176. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.012>
 - Kikowska, M., Kędziora, I., Krawczyk, A. and Thiem, B., 2015. Methyl jasmonate, yeast extract and sucrose stimulate phenolic acids accumulation in *Eryngium planum* L. shoot cultures. *Acta Biochimica Polonica*, 62: 197-200. https://doi.org/10.18388/abp.2014_892
 - Kruglova, N., Zinatullina, A. and Yegorova, N., 2023. Histological approach to the study of morphogenesis in callus cultures in vitro: A review. *International Journal of Plant Biology*, 14: 533-545. <https://doi.org/10.3390/ijpb14030041>
 - Kumar, S., Korra, T., Thakur, R., Arutselvan, R., Kashyap, A.S., Nehela, Y., Chaplygin, V., Minkina, T. and Keswani, C., 2023. Role of plant secondary metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. *Plant Stress*, 8: 100154. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100154>
 - Kumar, S.S., Arya, M., Mahadevappa, P. and Giridhar, P., 2020. Influence of photoperiod on growth, bioactive compounds and antioxidant activity in callus cultures of *Basella rubra* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 209: 111937. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111937>
 - Kumlay, A.M. and Ercisli, S., 2015. Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29: 1075-1084. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1077717>
 - Lala, S., 2021. Nanoparticles as elicitors and harvesters of economically important secondary metabolites in higher plants: A review. *IET nanobiotechnology*, 15: 28-57. <https://doi.org/10.1049/nbt2.12003>
 - Lescano, L., Cziáky, Z., Custódio, L. and Rodrigues, M.J., 2025. Yeast extract elicitation enhances growth and metabolite production in *Limonium algarvense* callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 160: 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02845-3>
 - Li, H., Jiang, X., Mashiguchi, K., Yamaguchi, S. and Lu, S., 2024. Biosynthesis and signal transduction of plant growth regulators and their effects on bioactive compound production in *Salvia miltiorrhiza* (Danshen). *Chinese Medicine*, 19: 102. <https://doi.org/10.1186/s13020-024-00895-4>
 - Li, J., Cao, X., Jia, X., Liu, L., Cao, H., Qin, W. and Li, M., 2021. Iron deficiency leads to chlorosis through impacting chlorophyll synthesis and nitrogen metabolism in *Areca catechu* L. *Frontiers in Plant Science*, 12: 710093. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.710093>
 - Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K. and Becker, D.F., 2013. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19: 998-1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
 - Liu, Y., Lu, C., Zhou, J., Zhou, F., Gui, A., Chu, H. and Shao, Q., 2024. *Chrysanthemum morifolium* as a traditional herb: A review of historical development, classification, phytochemistry, pharmacology and application. *Journal of Ethnopharmacology*, 118198. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118198>
 - Materska, M. and Perucka, I., 2005. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1750-1756. <https://doi.org/10.1021/jf035331k>
 - Mayerni, R., Satria, B., Wardhani, D.K. and Chan, S.R.O.S., 2020. Effect of auxin (2, 4-D) and cytokinin (BAP) in callus induction of local patchouli plants (*Pogostemon cablin* Benth.), IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 012003. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/583/1/012003>
 - McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M. and

- Robards, K., 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73: 73-84. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00288-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00288-0)
- Munawarti, A., Nurhury, R., Arimarsetiowati, R., Prastowo, E. and Hakim, L., 2024. Induction and multiplication of callus of AS2K clones *Coffea arabica* L. through 2, 4-D and BAP combination, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 012035. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1356/1/012035>
 - Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
 - Nadeem, M., Abbasi, B.H., Garros, L., Drouet, S., Zahir, A., Ahmad, W., Giglioli-Guivarc'h, N. and Hano, C., 2018. Yeast-extract improved biosynthesis of lignans and neolignans in cell suspension cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 135: 347-355. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1484-y>
 - Nazir, M., Tungmunithum, D., Bose, S., Drouet, S., Garros, L., Giglioli-Guivarc'h, N., Abbasi, B.H. and Hano, C., 2019. Differential production of phenylpropanoid metabolites in callus cultures of *Ocimum basilicum* L. with distinct in vitro antioxidant activities and in vivo protective effects against UV stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67:1847-1859. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05972>
 - Nidaulhasanah, A., Ahmad, J., Pagalla, D.B., Kandowangko, N.Y. and Husain, I., 2025. Effect of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2, 4-D) AND Benzyl Amino Purine (BAP) on callus induction in dumbaya plant leaves (*Momordica cochinchinensis* (lour.) Spreng). *Mikhaýla: Journal of Advanced Research*, 2: 66-72. <https://doi.org/10.36456/stigma.15.01.5606.38-45>
 - Nie, S., Huang, S., Wang, S., Mao, Y., Liu, J., Ma, R. and Wang, X., 2019. Enhanced brassinosteroid signaling intensity via SIBRI1 overexpression negatively regulates drought resistance in a manner opposite of that via exogenous BR application in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 138: 36-47. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.08.009>
 - Pacaldo, F.O. and Arradaza, C.C., 2021. Influence of plant growth regulators and UV light exposure on the formation and phenolic content of stevia rebaudiana bertonii callus: a preliminary study. *Annals of Tropical Research*, 43: 88-101. <https://doi.org/10.32945/atr4328.2021>
 - Puad, N.I.M., Ibrahim, S.A., Azmi, A.S. and Abduh, M.Y., 2024. The influence of plant growth regulators and light supply on bitter cassava callus initiation for starch production. *IJUM Engineering Journal*, 25: 1-11. <https://doi.org/10.31436/ijumej.v25i1.2585>
 - Rafiee, H., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., Qaderi, A., Zarinpanjeh, N., Şekara, A. and Zand, E., 2016. Application of plant biostimulants as new approach to improve the biological responses of medicinal plants: A critical review. *Journal of Medicinal Plants*, 15: 6-39. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2730-8>
 - Rai, A.N. and Penna, S., 2013. Molecular evolution of plant P5CS gene involved in proline biosynthesis. *Molecular Biology Reports*, 40: 6429-6435. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2730-8>
 - Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R.M. and Palazon, J., 2016. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21: 182. <https://doi.org/10.3390/molecules21020182>
 - Rybin, D.A., Sukhova, A.A., Syomin, A.A., Zdobnova, T.A., Berezina, E.V. and Brilkina, A.A., 2024. Characteristics of callus and cell suspension cultures of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivated in the presence of different concentrations of 2, 4-D and BAP in a nutrient medium. *Plants*, 13: 3279. <https://doi.org/10.3390/plants13133279>
 - Taha, R.S., Seleiman, M.F., Alhammad, B.A., Alkahtani, J., Alwahibi, M.S. and Mahdi, A.H., 2020. Activated Yeast extract enhances growth, anatomical structure, and productivity of *Lupinus termis* L. plants under actual salinity conditions. *Agronomy*, 11: 74. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010074>
 - Schaller, G.E., Bishopp, A. and Kieber, J.J., 2015. The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell*, 27: 44-63. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133595>
 - Serrano-Martínez, A., Fortea, M., Del Amor, F. and Núñez-Delgado, E., 2008. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food Chemistry*, 107: 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.028>
 - Shafi, A., Zahoor, I. and Mushtaq, U., 2019. Proline accumulation and oxidative stress: Diverse roles and mechanism of tolerance and adaptation under salinity stress. *Salt Stress, Microbes, and Plant Interactions: Mechanisms and Molecular*

- Approaches, 2: 269-300. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8805-7_13
- Sharma, N., Kumar, M., Kumari, N., Puri, S., Rais, N., Natta, S., Dhupal, S., Navamaniraj, N., Chandran, D. and Mohankumar, P., 2023. Phytochemicals, therapeutic benefits and applications of chrysanthemum flower: A review. *Heliyon*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.101616>
 - Shomali, A., Das, S., Arif, N., Sarraf, M., Zahra, N., Yadav, V., Aliniaefard, S., Chauhan, D.K. and Hasanuzzaman, M., 2022. Diverse physiological roles of flavonoids in plant environmental stress responses and tolerance. *Plants*, 11: 3158. <https://doi.org/10.3390/plants11131518>
 - Sidik, N.J., Agha, H.M., Alkamil, A.A., Alsayadi, M.M.S. and Mohammed, A.A., 2024. A mini review of plant tissue culture: the role of media optimization, growth regulators in modern agriculture, callus induction and the applications. *AUIQ Complementary Biological System*, 1: 96-109. <https://doi.org/10.70176/3007-973X.1019>
 - Sudheer, W., Praveen, N., Al-Khayri, J. and Jain, S., 2022. Role of plant tissue culture medium components, advances in plant tissue culture. *Elsevier*, 51-83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00012-6>
 - Sun, K., Zhang, X., Wei, Z., Wang, Z., Liu, J., Liu, J., Gao, J., Guo, J. and Zhao, X., 2023. Analysis of metabolic and transcription levels provides insights into the interactions of plant hormones and crosstalk with MAPKs in the early signaling response of cherry tomato fruit induced by the yeast cell wall. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 6: 100160. <https://doi.org/10.1016/j.fcms.2023.100160>
 - Sundarasekar, J., Anthony, J.J.J., Murugaiyah, V. and Subramaniam, S., 2012. Preliminary responses of 2, 4-D and BAP on callus initiation of an important medicinal-ornamental *Hymenocallis littoralis* plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6: 2088-2093. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.790>
 - Taha, L.S., Ibrahim, S.M. and Aziz, N.G.A., 2016. Vegetative growth, chemical composition, and flavonoids content of *Azadirachta indica* plants as affected by application of yeast natural extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6: 093-097. <https://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2016.60413>
 - Talaat, N.B. and Shawky, B.T., 2013. 24-Epibrassinolide alleviates salt-induced inhibition of productivity by increasing nutrients and compatible solutes accumulation and enhancing antioxidant system in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 729-740. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1279-5>
 - Tao, Z., Yuan, H., Liu, M., Liu, Q., Zhang, S., Liu, H., Jiang, Y., Huang, D. and Wang, T., 2022. Yeast extract: characteristics, production, applications and future perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33: 151. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00250-0>
 - Tariq, U., Ali, M. and Abbasi, B.H., 2014. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 130: 264-271. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.02.007>
 - Teshome, S. and Feyissa, T., 2015. In vitro callus induction and shoot regeneration from leaf explants of *Glinus lotoides* (L.): An important medicinal plant. *American Journal of Plant Sciences*, 6(9): 1329-1340. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.69132>
 - Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P.K. and Puri, S., 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2019.100237>
 - Upadhyay, R., Saini, R., Shukla, P. and Tiwari, K., 2025. Role of secondary metabolites in plant defense mechanisms: A molecular and biotechnological insights. *Phytochemistry Reviews*, 24: 953-983. <https://doi.org/10.1007/s11101-024-09876-5>
 - Wahyuni, D.K., Andriani, P., Ansori, A.N.M. and Utami, E.S.W., 2017. Callus induction of gendarussa (*Justicia gendarussa*) by various concentration of 2, 4-D, IBA, and BAP. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 9: 402-408. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v9i3.11347>
 - Wielanek, M. and Urbanek, H., 2006. Enhanced glucotropaeolin production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 177-186. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9106-2>
 - Xu, S., Li, G., Zhou, J., Chen, G. and Shao, J., 2022. Efficient production of anthocyanins in *Saccharomyces cerevisiae* by introducing anthocyanin transporter and knocking out endogenous degrading enzymes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10: 899182. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.899182>
 - Yang, D., Fang, Y., Xia, P., Zhang, X. and Liang, Z., 2018. Diverse responses of tanshinone biosynthesis to biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa*. *Gene*, 643: 61-67.

- <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.11.067>
- Youssef, S.M., Abdella, E.M., Al-Elwany, O.A., Alshallash, K.S., Alharbi, K., Ibrahim, M.T., Tawfik, M.M., Abu-Elsaoud, A.M. and Elkelish, A., 2022. Integrative application of foliar yeast extract and gibberellic acid improves morpho-physiological responses and nutrient uptake of *Solidago virgaurea* plant in alkaline soil. *Life*, 12: 1405. <https://doi.org/10.3390/life12091405>
 - Yu, Y., Qin, W., Li, Y., Zhang, C., Wang, Y., Yang, Z., Ge, X. and Li, F., 2019. Red light promotes cotton embryogenic callus formation by influencing endogenous hormones, polyamines and antioxidative enzyme activities. *Plant Growth Regulation*, 87: 187-199. <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0461>
 - Zahoor, H., Watchaputi, K., Hata, J., Pabuprapap, W., Suksamrarn, A., Chua, L.S. and Soontornngun, N., 2022. Model yeast as a versatile tool to examine the antioxidant and anti-ageing potential of flavonoids, extracted from medicinal plants. *Frontiers in Pharmacology*, 13: 980066. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.980066>
 - Zaman, G., Farooq, U., Bajwa, M.N., Jan, H., Shah, M., Ahmad, R., Andleeb, A., Drouet, S., Hano, C. and Abbasi, B.H., 2022. Effects of yeast extract on the production of phenylpropanoid metabolites in callus culture of purple basil (*Ocimum basilicum* L. var *purpurascens*) and their in-vitro evaluation for antioxidant potential. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150: 543-553. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02303-7>
 - Zandi, P. and Schnug, E., 2022. Reactive oxygen species, antioxidant responses and implications from a microbial modulation perspective. *Biology*, 11: 155. <https://doi.org/10.3390/biology11020155>
 - Zhang, X., Zhou, Y., Dhanasekaran, S., Wang, J., Zhou, H., Gu, X., Li, B., Zhao, L. and Zhang, H., 2022. Insights into the defense mechanisms involved in the induction of resistance against black spot of cherry tomatoes by *Pichia caribbica*. *Lwt*, 169: 113973. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113973>
 - Zhou, L., Li, S., Huang, P., Lin, S., Addo-Danso, S.D., Ma, Z., Ding, G., 2018. Effects of leaf age and exogenous hormones on callus initiation, rooting formation, bud germination, and plantlet formation in Chinese fir leaf cuttings. *Forests*, 9: 478. <https://doi.org/10.3390/f9080478>
 - Złotek, U., 2017. Effect of jasmonic acid and yeast extract elicitation on low-molecular antioxidants and antioxidant activity of marjoram (*Origanum majorana* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 16: 371-377. <https://doi.org/10.17306/j.afs.0505>
 - Złotek, U., Szymanowska, U., Rybczyńska-Tkaczyk, K. and Jakubczyk, A., 2020. Effect of jasmonic acid, yeast extract elicitation, and drying methods on the main bioactive compounds and consumer quality of lovage (*Levisticum officinale* Koch). *Foods*, 9: 323. <https://doi.org/10.3390/foods9030323>
 - Zubova, M.Y., Goncharuk, E.A., Nechaeva, T.L., Aksenova, M.A., Zaitsev, G.P., Katanskaya, V.M., Kazantseva, V.V. and Zagorskina, N.V., 2024. Influence of primary light exposure on the morphophysiological characteristics and phenolic compounds accumulation of a tea callus culture (*Camellia sinensis* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 25: 10420. <https://doi.org/10.3390/ijms251910420>