



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Plant Biological Sciences

E-ISSN: 3041-9603

Vol. 16, Issue 1, No. 59, spring 2024

Document Type: Research Paper

Received: 19/11/2024

Accepted: 20/01/2025

The dose-dependent effect of yeast extract on the content of some phenolics in the cell suspension culture of *Dracocephalum polychaetum* Bornm.

Zohreh Vasefpour¹, Marzieh Taghizadeh¹ ^{*}, Seyed Hamed Moazzami Farida¹

¹Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

Dracocephalum polychaetum is a significant medicinal plant known for its antioxidant and anticancer properties. In this study, we assessed the impact of varying yeast extract (YE) doses on the levels of certain phenolic compounds in *D. polychaetum* cells. The experiments followed a completely randomized design with three replicates. The results indicated that all parameters considered in the treated cells showed a significant difference compared to the control. Our results indicated that the highest activities of the key enzymes PAL and TAL were observed in cells treated with 100 mg/L of YE, suggesting a response to oxidative stress induced by YE. Consequently, the highest contents of total phenol, flavonoid, quercetin, catechin, carvacrol, and thymol were found in cells treated with the same YE concentration. In addition, cells treated with 25 mg/L YE showed the highest levels of rosmarinic acid. The response to different YE concentrations was dose-dependent rather than linear. Therefore, we conclude that moderate YE concentrations (100 mg/L) effectively increase phenolic contents. Moreover, the variations in phenolic compound levels may represent a defense mechanism in *D. polychaetum* cells exposed to YE. Based on the correlation coefficient, the accumulation of phenolic compounds can be positively regulated by activating key enzymes, particularly the PAL enzyme, in the phenylpropanoid biosynthesis pathway in cells treated with YE.

Keywords: Cell suspension culture, *Dracocephalum polychaetum*, Phenolic compounds.

*Corresponding author: m.taghizadeh@bio.ui.ac.ir



Introduction

Dracocephalum polychaetum is a medicinal plant known for its potent antioxidant and anticancer properties. Extensive research has highlighted this species' applications in modern and traditional medicine, particularly its anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, and anticancer properties. Phytochemical analyses have revealed a variety of phenolic compounds present in the plant. However, production of these valuable metabolites is often limited, usually making up less than 1% of the dry weight. This production is influenced by the plant's physiological and developmental stages and environmental conditions.

To overcome the limitations in producing secondary metabolites, tissue and cell suspension cultures have emerged as effective biotechnological strategies. The biosynthesis of these metabolites can be significantly enhanced by applying biotic and abiotic elicitors. One commonly used elicitor is yeast extract (YE), which has been demonstrated to substantially increase the production of secondary metabolites compared to untreated controls.

Despite the medicinal significance of *D. polychaetum*, there is a lack of experimental studies utilizing biotic elicitors to boost its metabolite production. Therefore, this study aims to investigate the effects of various concentrations of YE on the accumulation of specific phenolic compounds, as well as the activity of key enzymes involved in their biosynthetic pathways, namely phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia-lyase (TAL), within *D. polychaetum* cell cultures.

Material and Method

D. polychaetum seeds were germinated in MS medium supplemented with GA₃ under dark conditions at 25°C. Hypocotyl explants were cultured in MS medium containing BAP, NAA, sucrose, and agar to induce callus formation, also in complete darkness at a temperature of 23±2°C. The resulting calli were then used to establish suspension cultures maintained at 25°C on an orbital shaker and subcultured every 12 days to promote uniform cell growth.

On the eighth day of cultivation, during the logarithmic growth phase, the cells were treated with varying concentrations of YE. The cells were harvested on the 13th day. The phenolic and flavonoid content and the activities of the PAL and TAL enzymes were quantified using UV-Vis spectrophotometry, while HPLC was utilized for phytochemical analysis. Statistical analyses were conducted, including Duncan's test ($P \leq 0.05$) and principal component analysis (PCA), to identify significant differences and relationships among the physiological parameters.

Results and Discussion

The findings indicated that YE treatment significantly affected all measured parameters in *D. polychaetum* cells compared to the control group. The highest activities of PAL and TAL were found in cells treated with 100 mg/L YE. This suggests a strong response to the oxidative stress induced by YE. Additionally, this treatment led to the most significant accumulation of total phenols, flavonoids, quercetin, catechin, carvacrol, and thymol. Notably, the maximum content of rosmarinic acid was observed in cells treated with 25 mg/L YE.

The response to YE was dose-dependent yet non-linear, with moderate concentrations (100 mg/L) proving most effective in enhancing phenolic compound production. These variations imply a defensive mechanism in *D. polychaetum* cells, which upregulate phenolic biosynthesis as a protective response to YE treatment. Correlation analysis further confirmed a positive association between the accumulation of phenolic compounds and the activation of PAL, underscoring the enzyme's critical role in regulating secondary metabolite production.

YE is abundant in amino acids, vitamins, and minerals supporting plant growth and development. Additionally, it acts as an elicitor by triggering secondary signaling pathways by generating free radicals. These reactive molecules serve as secondary messengers, activating the phenylpropanoid pathway and stimulating the synthesis of phenolic compounds. The increased production of these potent antioxidants

likely helps protect plant cells under YE-induced oxidative conditions, highlighting the potential of YE as an effective elicitor for enhancing secondary metabolite production in medicinal plants.

Conclusion

This study demonstrates that YE is an effective elicitor for enhancing the production of secondary metabolites in *D. polychaetum*. Moderate concentrations of YE (100 mg/L) significantly activated the phenylpropanoid pathway, leading to increased activity of PAL and TAL. As a result, there was an enhanced accumulation of phenolic compounds such as quercetin, catechin, and thymol. These findings highlight the potential of YE to optimize the biosynthesis of valuable medicinal metabolites, offering a sustainable strategy to address the limitations of natural metabolite production in medicinal plants.

اثر وابسته به غلظت عصاره مخمر بر محتوای برخی از ترکیبات فنلی در کشت سلولی مفرو (*Dracocephalum polychaetum* Bornm)

زهرة واصف پور^۱، مرضیه تقی زاده^{۱*} ، سید حامد معظمی فرید^۱

^۱گروه زیست شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

Dracocephalum polychaetum یک گیاه دارویی مهم است که به علت خواص آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی خود مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، تأثیر غلظت های ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره مخمر (YE) بر میزان تولیدی برخی از ترکیبات فنلی در سلول های *D. polychaetum* بررسی شد. آزمایش ها در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. نتایج به دست آمده نشان دادند تمامی فاکتورهای اندازه گیری شده در سلول های تیمار شده تفاوت معنی داری نسبت به شاهد داشتند. بر این اساس، بالاترین فعالیت آنزیم های کلیدی فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) و تیروزین آمونیلایز (TAL) در سلول های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر YE مشاهده شد. در نتیجه، بیشترین محتوای فنل کل، فلاونوئید کل، کوئرستین، کاتچین، کاروکرول و تیمول در سلول های تیمار شده با همان غلظت YE یافت شد. علاوه بر این، سلول های تیمار شده با غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر YE، بالاترین محتوای رزمارینیک اسید را نشان دادند. بر اساس نتایج، پاسخ سلول به اثر غلظت های مختلف YE وابسته به غلظت بود. بنابراین می توان نتیجه گرفت محتوای ترکیبات فنلی در سلول های تحت تیمار با YE به عنوان پاسخ دفاعی سلول در برابر تنش ایجاد شده، بود. همچنین، بر اساس نتایج حاصل از بررسی ضریب همبستگی، تجمع ترکیبات فنلی می تواند به طور مثبت با فعال شدن آنزیم های کلیدی به ویژه آنزیم PAL در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها در سلول های تحت تیمار با YE تنظیم شود.

واژه های کلیدی: ترکیبات فنلی، کشت سوسپانسیون سلولی، *Dracocephalum polychaetum*

*Corresponding author: m.taghizadeh@bio.ui.ac.ir



مقدمه

گیاه *Dracocephalum polychaetum* Bornm. با نام بادرنجبویه کرمانی یا لاله‌زاری، مفرو یا زررو بومی ایران و یکی از اعضای خانواده‌ی Lamiaceae یا نعنائیان است. جنس *Dracocephalum* دارای ۵۰ گونه در سراسر جهان است که تنها ۸ گونه از این جنس در ایران یافت می‌شود. این گیاه علفی - نیمه چوبی حدود ۱۵-۲۰ سانتی‌متر ارتفاع دارد. این گیاه چندساله، بومی ایران بوده و در کوه‌های هزار در بخش راین، واقع در جنوب استان کرمان، یافت می‌شود. این گیاه به واسطه داشتن محتوای ارزشمندی از متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی همچون روتین، نارینژین، آپی‌ژنین، کوئرستین، تیمول، رزمارینیک اسید، لیمونن و کاروکرول مورد توجه است (Khodaei et al., 2019; Taghizadeh et al., 2019). این گیاه دارای فعالیت‌های زیستی مهمی از جمله خواص پاد التهابی، پاد اکسیدانی، پاد میکروبی و پاد سرطانی هستند (Taghizadeh et al., 2022). علاوه بر این، آن‌ها به عنوان یک ماده افزودنی و تسکین دهنده درد معده و نیز با اثرات ثابت شده علیه *Staphylococcus aureus* شناخته شده‌اند (Yaghoobi et al., 2018).

رویش گیاه در ارتفاعات بالا (ارتفاع ۴۰۰۰ متر)، آب و هوای سرد رویشگاه و خواب پیچیده بذر از جمله عوامل محدودیت رویش این گونه است، خواب پیچیده بذر، تغییرات آب و هوایی، کاهش بارندگی و استفاده بی‌رویه انسان از این گیاه سبب شده که هر ساله جمعیت آن کاهش یابد. بنابراین، تلاش برای اهلی کردن این گونه به عنوان اقدام حفاظتی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Rajaei & Mohamadi, 2012). رویکردهای بیوتکنولوژیکی، از جمله کشت سلول‌ها و بافت‌های گیاهی، به عنوان یکی از راه‌های امیدوارکننده و موثر در تکثیر گیاهان دارویی در معرض خطر انقراض شناخته شده است. در این تکنیک با به‌کارگیری روش‌های مختلفی مانند انتخاب لاین سلولی با

توانایی تولید محصول بیشتر، اصلاح محیط کشت و استفاده از محرک‌ها (Elicitation)، کشت ریشه موئین، کشت سلول در مقیاس بزرگ در راکتورهای زیستی، بیوترانسفورماسیون (Biotransformation) و plant cell immobilization (تثبیت سلول‌های گیاهی) می‌توان تولید متابولیت‌های ثانویه را بدون تخریب زیستگاه و با حفظ تنوع زیستی افزایش داد (Cardoso et al., 2019; Hassanpouraghdam et al., 2022).

یکی از روش‌های مؤثر در افزایش تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان استفاده از محرک‌ها است. محرک‌ها مولکول‌های سیگنال با منبع زیستی و غیر زیستی هستند که سبب فعال شدن سیستم دفاعی در سلول شده و منجر به افزایش سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه در سلول می‌شوند (Jamiołkowska, 2020). یکی از محرک‌های زیستی، عصاره مخمر (YE) است که می‌تواند با تحریک سیستم دفاعی گیاه، در جهت افزایش تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه نقش داشته باشد. عصاره مخمر یک نام رایج برای انواع مختلف محصولات فراوری شده از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* است که به عنوان افزودنی‌های مواد غذایی و یا طعم دهنده استفاده می‌شوند. اکثر ترکیبات تأثیرگذاری که در عصاره مخمر وجود دارد، شامل ویتامین‌های گروه ب، کیتین، بتا گلوکان، الیگومرهای ان-استیل گلوکز آمین، گلیکوپپتیدها، آمینو اسیدها، ارگوسترول، مواد معدنی از قبیل کبالت، کلسیم و روی هستند که می‌تواند پاسخ سیستم دفاعی گیاه را با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی (ROS) فعال کند (El-Beltagi et al., 2022). حضور غلظت بالایی از رادیکال‌های آزاد در سلول، سلول را دچار آسیب می‌کند. برای جلوگیری از آسیب به سلول، سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی سلول از جمله متابولیت‌های ثانویه از جمله فنل‌ها وارد عمل می‌شود که به پاک‌سازی و مقابله با رادیکال‌های آزاد می‌پردازد (Ho et al., 2018). بررسی

مخمر به عنوان یک محرک زیستی بر تولید ترکیبات فنلی به عنوان بخشی از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی و اثر بر فعالیت آنزیم PAL و TAL در مسیر بیوسنتز این ترکیبات در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *D. polychaetum* Bornm. است.

مواد و روش‌ها

استقرار کشت سوسپانسیون سلولی و تیمار با عصاره مخمر

بذرهای گیاه *D. polychaetum* پس از استریل شدن جهت رشد هیپوکوتیل، به مدت ۳۰ روز در محیط MS+10 mg/l $\frac{1}{2}$ GA₃ کشت و سپس در تاریکی و دمای ۲۳±۲ سانتی-گراد قرار داده شدند. هیپوکوتیل به دست آمده به عنوان ریز نمونه در اندازه‌های ۱/۵-۲ سانتی‌متر جهت القاء کالوس در محیط کشت MS+4mg/L BAP+1.5mg/L NAA به همراه ۳۰ گرم ساکاروز و ۶ گرم آگار کشت شدند و در شرایط تاریکی مطلق با دمای ۲۳±۲ °C قرار گرفتند. کالوس‌های تشکیل شده هر ۲۱ روز یکبار واکشت و به محیط جدید منتقل شدند (Taghizadeh et al., 2019). پس از چند مرحله واکشت کالوس‌ها، ۲/۵ گرم از کالوس‌های کاملاً یکدست و نرم به ارلن مایر ۱۰۰ میلی-لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط MS مایع غنی شده دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل‌آمینوپورین (BAP) و ۱ میلی‌گرم هورمون نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) به همراه ۲۰ گرم ساکارز، منتقل شد. ارلن حاوی سلول‌ها روی شیکر با دور ۱۰۰ rpm و در تاریکی مطلق، در اتاق کشت با دمای ۲۳±۲ °C قرار داده شدند. پس از نگهداری سلول‌ها در محیط کشت مایع و چندین مرحله واکشت کردن، کشت سوسپانسیون سلولی یک‌دست و مناسب به دست آمد. بر اساس منحنی رشد سلول‌های این گیاه، در روز هشتم پس از واکشت سلول‌ها، زمانی که سلول‌ها در مرحله رشد لگاریتمی قرار داشتند (Taghizadeh et al., 2019)،

پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که عصاره مخمر در غلظت‌های مناسب می‌تواند منجر به افزایش رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی در ریشه موئین *Polygonum multiflorum* (Ho et al., 2018)، کشت سلول *Linum grandiflorum* Desf. (Goncharuk et al., 2022) و ریشه موئین *Orthosiphon aristatus* (Smetanska et al., 2021) شود.

ترکیبات فنلی، آنتی‌اکسیدان‌های با وزن مولکولی کم هستند که از نظر ساختار و خواص شیمیایی متنوع هستند (Wagay et al., 2020). بر همکنش آنها با ROS از فرآیندهای اکسیداسیون رادیکال‌ها آزاد جلوگیری می‌کند، بنابراین سلول‌های گیاهی را از آثار سمی و مضر آنها محافظت می‌کند (Kumar & Pandey, 2013). همچنین، خواص آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی گیاهی با ورود به بدن انسان حفظ می‌شود. به همین واسطه این ترکیبات برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (Tungmunnithum et al., 2018).

بررسی مقالات منتشر شده نشان دادند تاکنون پژوهشی در رابطه با تأثیر YE بر روی محتوای ترکیبات فنلی در کشت بافت و سوسپانسیون سلولی *D. polychaetum* انجام نشده است، اما از سایر الیستورها جهت افزایش محتوای متابولیت‌های دارویی این گیاه استفاده شده است که از آن جمله می‌توان به پژوهش‌های صورت گرفته توسط Taghizadeh et al., 2019 اشاره کرد. آنها در این پژوهش نشان دادند تیمار سلول‌های *D. polychaetum* توسط نانوذرات مغناطیسی و میدان مغناطیسی ساکن، موجب افزایش محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها و همچنین منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد. بنابراین، با توجه به اهمیت این گیاه از نظر دارویی، و پژوهش‌های اندک انجام شده بر روی این گیاه، هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره

اساتات یک مولار اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شد. شدت جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. از کوئرتستین با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج بر حسب میکروگرم کوئرتستین بر گرم وزن تر سلول‌ها گزارش شد (Chang et al., 2002).

سنجش فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیا ز PAL و تیروزین آمونیا لیا ز TAL

برای استخراج و سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL، ۳۰۰ میلی‌گرم از سلول‌های تازه با ۱.۵ میلی‌لیتر بافر تریس- هیدروکلریک اسید ۵۰ میلی مولار (pH = ۸/۵) حاوی ۲- مرکاپتواتانول ۱۴/۴ میلی مولار و PVP (Polyvinylpyrrolidone) ۵٪ در دمای ۴ °C هموزن شد. سپس مخلوط به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه و با دور rpm ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ °C سانتریفیوژ و محلول رویی جدا سازی و به لوله‌های جدید منتقل شدند.

برای سنجش فعالیت آنزیم PAL به ۱/۸ میلی‌لیتر بافر واکنش تریس- هیدروکلریک اسید ۵۰۰ میکرومولار (pH = ۸) حاوی ۶ میکرومولار فنیل آلانین به عنوان سوبسترای آنزیم PAL و جهت انجام واکنش بین آنزیم و سوبسترا، نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۳۷ °C قرار گرفت و در انتها با افزودن ۵۰ میکرولیتر محلول هیدروکلریک اسید ۵ نرمال به مخلوط واکنش، واکنش آنزیمی متوقف شده و مقدار ترانس- سینامیک اسید تشکیل شده، محصول آنزیم PAL، با خواندن شدت جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج نوری انجام شد. فعالیت ویژه آنزیم PAL با در نظر گرفتن ضریب خاموشی آن محاسبه و بر حسب نانومول تولید محصول در میلی‌گرم پروتئین کل بر گرم وزن تر در ساعت سلول بیان شد (Beaudoin -Eagan & Thorpe, 1985).

غلظت‌های ppm ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ عصاره مخمر به هر ارلن اضافه شد. روز ۱۳ ام از منحنی رشد سلول‌ها، زمانی که سلول‌ها وارد فاز ثابت رشد شدند، سلول‌ها برداشت و برای اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیولوژیکی در فریزر ۷۰- نگهداری شد.

سنجش محتوای فنل کل

جهت اندازه‌گیری محتوای کل ترکیبات فنلی، ۵۰۰ میلی‌گرم از سلول‌های منجمد شده با ۲ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ همگن شد. سپس هموزنات حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ در دمای محیط سانتریفیوژ شد و محلول رویی آن به لوله جدیدی منتقل شد. همچنین جهت اندازه‌گیری محتوای کل ترکیبات فنلی از روش استفاده شد. به ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره، ۷۵۰ میکرولیتر معرف Folin-ciocalteu (۱۰٪) و پس از ورتکس شدید ۵۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۷/۵٪ اضافه شد و پس از ۷۵ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط و تاریکی شدت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتروفوتومتر در مقابل بلانک اندازه‌گیری شد. از گالیک اسید با غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر حسب گرم وزن تر سلول گزارش شد (Singleton et al., 1999).

سنجش محتوای فلاونوئید

برای سنجش محتوای کل فلاونوئیدها، ۵۰۰ میلی‌گرم وزن تر سلول با ۲ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ سائیده شد و مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی جدا سازی شد و برای سنجش فلاونوئید کل مورد استفاده قرار گرفت. سپس به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره، ۲۰۰ میکرولیتر متانول ۸۰٪، ۲۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید (۱۰٪) و ۲۰۰ میکرولیتر محلول سدیم

انجام HPLC ۴۰ دقیقه، Flow rate: 1 و طول موج مورد استفاده ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر بود (Lin & Harnly, 2010). برنامه HPLC شامل دو محلول A: ۱ درصد فورمیک اسید و متانول بود که تحت شرایط گرادیان ۱۰ تا ۲۵ درصد محلول B (v/v) از دقیقه ۰ تا دقیقه ۱۰، ۲۵ تا ۶۰ درصد B از دقیقه ۱۰ تا دقیقه ۲۰ و سرانجام ۶۰ تا ۷۰ درصد محلول B از دقیقه ۲۰ تا ۴۰ انجام شد. برای شناسایی ترکیبات فنلی موجود در هر نمونه از مقایسه‌ی Retention time (RT) پیک هر نمونه و پیک استانداردها (کوئرستین، کاتچین، تیمول و کاروکرول، p-کوماریک اسید و رزمارینیک اسید) در طول موج حداکثر جذب استفاده شد و محاسبه‌ی مقدار ترکیبات فنلی با استفاده از منحنی استاندارد هر نمونه انجام شد.

آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها به صورت طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. معنی‌دار بودن آماری داده‌ها بر اساس آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و در سطح احتمال $P \leq 0.05$ مشخص شد. آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت. به منظور رسم نقشه حرارتی ارتباط بین همه شاخص‌های مورد بررسی در این پژوهش، ضریب همبستگی پیرسون با نرم افزار MetaboAnalyst 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) محاسبه شد. علاوه بر این، از تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA)، به عنوان روش ترسیمی، برای نشان دادن الگوی ارتباطی میان تیمارهای اعمال شده با فاکتورهای بیوشیمیایی مورد بررسی، از نرم‌افزار PAST ver. 4.17 (Hammer & Harper, 2024) استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس فاکتورهای مورد بررسی در این پژوهش در جدول ۱ نشان داد که تیمار عصاره مخمر

جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم TAL، به ۱/۸ میلی لیتر بافر تریس- هیدروکلریک ۵۰۰ میکرومولار (pH = ۸) حاوی ۵.۵ میکرومولار تیروزین به عنوان سوبسترا، ۲۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی اضافه شد و جهت انجام واکنش بین آنزیم و سوبسترا، نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری با دمای 37°C قرار گرفت و در انتها با افزودن ۵۰ میکرولیتر محلول هیدروکلریک اسید ۵ نرمال به مخلوط واکنش، واکنش آنزیمی متوقف شده و مقدار p-کوماریک اسید تشکیل شده، حاصل فعالیت آنزیم TAL، با اندازه‌گیری شدت جذب در طول موج ۳۳۳ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج نوری انجام شد و فعالیت ویژه‌ی آنزیم بر حسب نانومول p-کوماریک اسید تولید شده در میلی گرم پروتئین کل بر گرم وزن تر سلول در ساعت (nmol p-CA. mg pr⁻¹. g FW⁻¹.h) بیان شد (Beaudoin-Eagan & Thorpe, 1985).

سنجش ترکیبات فیتوشیمیایی با دستگاه HPLC-DAD

برای شناسایی و اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فنلی به کمک HPLC (High-Performance liquid chromatography)، ۲.۵ گرم از وزن تر سلول‌ها با ۷ میلی لیتر متانول اسیدی هموزن و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و در تاریکی انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت هموزنات حاصل به مدت ۳۰ دقیقه و با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ و محلول رویی جمع‌آوری و در دمای محیط تبخیر شد. باقیمانده‌ی عصاره در ۱ mL متانول حل شده و محلول حاصل توسط فیلتر میلی پور $0.22\ \mu\text{m}$ فیلتر و به ویال تمیزی منتقل شده و به دستگاه HPLC تزریق شد (Taghizadeh et al., 2019). برای بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنلی از دستگاه HPLC (Agilent Technologies 1200 series, Germany, UV vis Zorbax eclipse (XDB) C₁₈, 5 μm detector) و ستون $4.6 \times 150\ \text{mm}$ (FT) (ID)، استفاده شد. طول زمان

سبب ایجاد تغییرات معنی دار در تمامی صفات اندازه گیری در سطح ۱ درصد شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت های مختلف عصاره مخمر بر فاکتورهای مختلف مورد بررسی *D. polychaetum*

Table 1- The analysis of variance for different studied traits in *D. polychaetum* cells subjected to yeast extract treatment.

Source of variation	Mean squares of traits										
	DF	TPC	TFC	PAL	TAL	CAT	QUR	p-CA	RA	TYML	CVC
Treatments	5	1.79**	445.64**	2493.85**	91.38**	5.15**	3980.83**	.011**	135.08**	.28**	2.54**
Residual	12	.010	19.78	49.26	3.19	.29	.017	0.001	.053	.002	.025

** معنی دار بودن در سطح ۱٪

درجه آزادی، TFC: محتوای فلاونوئید کل، TPC: محتوای فنل کل، PAL: فنیل آلانین آمونیا لیاز، TAL: تیروزین آمونیا لیاز، CAT: کاتچین، QUR: کوئرستین، p-CA: *p*-کوماریک اسید، RA: رزمارینیک اسید، TYML: تیمول، CVC: کارواکرول.

** Significant at $P < 0.01$.

D.F: Degree of freedom, TPC: Total phenolics content; TFC: Total flavonoids content; PAL: phenylalanine ammonia-lyase, TAL: tyrosine ammonia lyase, QUR: Quercetin, p-CA: *p*-coumaric acid, RA: Rosmarinic acid, TYML: Thymol, CVC: Carvacrol.

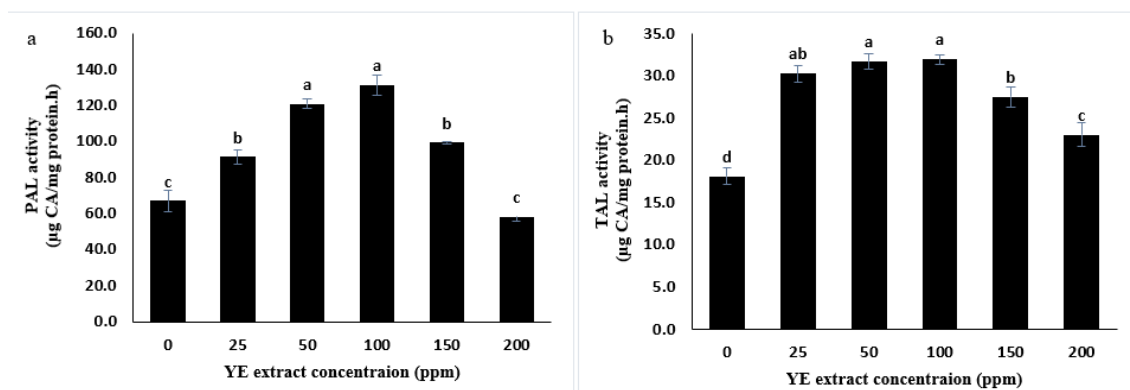
در نمونه های تیمار شده با ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر YE (۳۱/۹۷ nmol *p*-CA/mg protein) یافت شد که ۱۷۶٪ بیش از فعالیت گزارش شده برای نمونه های شاهد بود. لازم به ذکر است این نمونه ها تفاوت معنی داری با نمونه های تحت تیمار با غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر YE نشان ندادند. با وجود این، میزان فعالیت TAL در سلول های تیمار شده با بیشینه غلظت YE، در مقایسه با سطوح دیگر YE کاهش یافت (شکل ۱-ب).

افزایش فعالیت آنزیم های PAL و TAL ممکن است به علت انباشت گونه های فعال اکسیژن (ROS) ناشی از غلظت های متوسط YE در سلول های *D. polychaetum* باشد. به طور مشابه، افزایش میزان فعالیت آنزیم های PAL و TAL در کشت سوسپانسیون سلولی *Zataria multiflora* و *Bletilla striata* تحت تیمار YE گزارش شده است (Bavi et al., 2022; Chen et al., 2021). با هدف افزایش مقاومت گیاه به شرایط تنش اکسیداتیو، این آنزیم ها عملکرد سلول ها را از متابولیسم اولیه به متابولیسم ثانویه تغییر می دهند (Ahmad et al., 2019).

اثر غلظت های مختلف عصاره مخمر بر فعالیت آنزیم های PAL و TAL

شکل ۱، الگوی تغییرات میزان فعالیت دو آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی در سوسپانسیون سلولی *D. polychaetum* تیمار شده با YE را نشان می دهد. براساس نتایج نشان بدست آمده، فعالیت آنزیم های PAL و TAL تحت تأثیر غلظت های مختلف YE می تواند تغییر کند. آنزیم PAL به طور قابل توجهی در مقادیر ۲۵ تا ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر YE فعال شده است. بیشترین فعالیت این آنزیم در سلول های تیمار شده با ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر YE گزارش شد که نزدیک به دو برابر بیش از سلول های شاهد (۶۶/۹۶ nmol CA/mg protein) بود. همچنین داده های حاصل نشان دادند کمترین فعالیت آنزیم PAL مربوط به نمونه های سلولی تیمار شده با بیشترین غلظت به کار برده شده از YE (۲۰۰ میلی گرم بر لیتر) بود که تفاوت معنی داری با نمونه های شاهد نداشت (شکل ۱-الف).

تیمار سوسپانسیون سلولی *D. polychaetum* با غلظت های مختلف YE منجر به افزایش قابل ملاحظه و معنی دار در فعالیت آنزیم TAL شد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (YE) بر فعالیت آنزیم‌های (a) فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) و (b) تیروزین آمونیا لیاز (TAL) در سلول *D. polychaetum*. مقادیر بر اساس میانگین سه تکرار \pm SE نشان داده شده و حروف نامشابه معرف معنی دار بودن بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) است.

Figure 1- Mean comparison the yeast extract (YE) concentrations (0, 25, 50, 100, 150 and 200 mg/L) on the (a) PAL activity and (b) TAL activity in *D. polychaetum* cells. Data are mean values of three replicates \pm SE. Dissimilar letters indicate significant differences based on Duncan's test ($P \leq 0.05$).

ندادند.

قرارگیری سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف YE می‌تواند منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو شود. افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی می‌تواند با فعال شدن سازوکارهای دفاعی در سلول‌های تحریک شده مرتبط باشد. افزایش TPC و TFC در سلول‌های *D. polychaetum* تیمار شده با YE نیز می‌تواند در نتیجه افزایش مقدار رادیکال‌های آزاد باشد. به طور مشابه، YE منجر به افزایش قابل توجه TPC و TFC در کشت سوسپانسیون سلولی *Linum usitatissimum* شد (Nadeem et al., 2018). عصاره مخمر در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *Oryza sativa* L. سبب افزایش وزن خشک و تر سلول، محتوای فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین و تانن شد (El-Beltagi et al., 2022). مقدار فلاونولیکان‌ها در کشت سلولی *Silybum marianum* (L.) تیمار شده با غلظت‌ها مختلف عصاره مخمر نشان داد عصاره مخمر سبب افزایش محتوای این ترکیبات (تا ۵ برابر نمونه شاهد) در غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر شد (Rahimi Ashtiani et al., 2009).

اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر بر محتوای فنل و فلاونوئید کل

نتایج بدست آمده از اثر غلظت‌های مختلف YE بر محتوای TPC در سلول‌های *D. polychaetum* نشان داد غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (۳/۲۱ mg GA/g FW) از این محرک منجر به افزایش بیش از دو برابری محتوای این ترکیبات در مقایسه با سلول‌های شاهد (۱/۵۴ mg GA/g FW) شد. همچنین، تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0.05$) در TPC، بین کمترین (۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) و بیشترین (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) غلظت به کار برده شده از YE با سلول‌های شاهد مشاهده نشد. همچنین، TPC در سلول‌های تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر YE افزایشی حدود ۱/۷۲ و ۱/۹۷ برابر نسبت به نمونه‌های شاهد نشان دادند (جدول ۲). بررسی اثر وابسته به غلظت YE بر محتوای فلاونوئید کل (TFC) نشان داد که سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از YE حاوی بیشترین (بیش از ۱۱۹ µg Qu/g FW) مقدار از TFC بودند که تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0.05$) با سایر سلول‌های مورد بررسی داشتند (جدول ۲). با توجه به جدول ۲، سلول‌های تیمار شده با ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از YE تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0.05$) با نمونه‌های شاهد (۸۹ µg Qu/g FW) نشان

اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر بر محتوای برخی متابولیت‌های ثانویه

نتایج بدست آمده نشان دادند از بین ترکیبات شناسایی شده، فراوان‌ترین ترکیب فنلی حاضر در سلول‌های تیمار شده مربوط به کوئرستین بود که میانگین محتوای این ترکیب در بین همه سلول‌های مورد بررسی بیش از $42 \mu\text{g/g FW}$ بود. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، بیشترین مقدار کوئرستین در نمونه‌های تیمار شده با 100 میلی‌گرم بر لیتر از YE ($108/22 \mu\text{g/g FW}$) مشاهده شد که نزدیک به 58% بیش از نمونه‌های شاهد بود. علاوه بر این، نمونه‌هایی که در معرض 100 میلی‌گرم بر لیتر از YE قرار داده شدند، حاوی بیشترین مقدار کاتچین ($7/38 \mu\text{g/g FW}$) بودند. علاوه بر غلظت 100 میلی‌گرم بر لیتر YE، به کار بردن 25 میلی‌گرم بر لیتر از YE نیز منجر به افزایش تولید کاتچین در سلول‌های تحت تیمار شد که با محتوای این ترکیب فنلی در سلول‌های شاهد ($7/38 \mu\text{g/g FW}$) قابل مقایسه بود. نمونه‌های تیمار شده با سایر غلظت‌های استفاده شده در محیط کشت سوسپانسیون سلولی *D. polychaetum* حاوی مقادیر پائین‌تری نسبت به سلول‌های شاهد بودند. کمترین محتوای کاتچین در سلول‌های تیمار شده با 50 میلی‌گرم بر لیتر YE با مقداری حدود $4/35 \mu\text{g/g FW}$ گزارش شد که حدود 59% نسبت به شاهد کاهش یافته است.

بیشترین مقدار رزمارینیک اسید ($24/29 \mu\text{g/g FW}$) در نمونه‌های تیمار شده با غلظت 25 میلی‌گرم بر لیتر از YE مشاهده شد که نزدیک به 3 برابر بیش از سلول‌های شاهد ($8/28 \mu\text{g/g FW}$) بود. افزایش غلظت YE، منجر به تفاوت معنی‌دار در محتوای این اسید فنلی بین سلول‌های تحت تیمار و نمونه‌های شاهد نشد. همچنین p -کوماریک اسید

فقط در سلول‌های تیمار شده با 150 میلی‌گرم بر لیتر YE قابل مشاهده بود. علاوه بر این، در پژوهش حاضر دو ترکیب تیمول و کاروکرول نیز در سلول‌های تحت تیمار مورد شناسایی قرار گرفتند. داده‌های بدست آمده نشان داد غلظت 100 میلی‌گرم بر لیتر YE موجب تولید و انباشت بیشترین مقدار از دو ترکیب تیمول ($5/26 \mu\text{g/g FW}$) و کاروکرول ($7/67 \mu\text{g/g FW}$) شد که تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0/05$) با نمونه‌های شاهد و سایر سلول‌های مورد تیمار نشان دادند.

احتمالاً یکی از مسیرهایی که سلول‌های تحت تیمار برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از بکارگیری YE انتخاب کرده‌اند، افزایش بیوستز متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی و تجمع آن‌ها در سلول‌های مورد بررسی بوده است. محصولات نهایی در مسیر فنیل پروپانوید مانند رزمارینیک اسید، کوئرستین و کاتچین، پس از تیمار با غلظت‌های مختلف YE القا شده‌اند. نتایج نشان می‌دهد که ارتباط معنی‌داری بین تجمع و بیوستز ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوستز آن‌ها مشاهده شد (شکل ۳). جالب توجه است که بیوستز برخی نظیر کاروکرول و تیمول نیز به طور قابل توجهی در سلول‌های *D. polychaetum* تیمار شده با YE افزایش یافت (جدول ۲). به طور مشابه، کیتوزان و YE منجر به القای بیوستز و تجمع برخی از ترکیبات فنلی در کشت سوسپانسیون سلول‌های *Z. multiflora* شد (Bavi et al., 2022). همچنین، تیمار سلول‌های *Azadirachta indica* L. با غلظت 50 میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر سبب افزایش تولید اسکوالن و موالونیک اسید شد (Babich et al., 2020).

جدول ۲- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف عصاره مخمر بر محتوای ترکیبات فنلی در سلول‌های *D. polychaetum*.

Table 2- Mean comparison of various concentrations of YE on phenolic content in *D. polychaetum* cells.

Concentration (mg/L)	TPC (mg GA/g FW)	TFD (μg Qu/g FW)	Catechin (μg/g FW)	Quercetin (μg/g FW)	p-Coumaric acid (μg/g FW)	Carvacrol (μg/g FW)	Rosmarinic acid (μg/g FW)	Thymol (μg/g FW)
0	1.54±0.04 ^d	97.15±2.36 ^c	7.38±1.25 ^{ab}	18.69±0.04 ^e	ND ^b	5.88±0.12 ^c	8.28±0.02 ^b	4.68±0.05 ^c
25	1.66±0.11 ^d	107.22±9.36 ^b	7.69±0.27 ^a	13.43±0.06 ^f	ND ^b	5.38±0.04 ^d	24.29±0.08 ^a	4.99±0.02 ^b
50	2.65±0.11 ^c	119.08±2.97 ^a	4.35±0.14 ^d	32.66±0.07 ^c	ND ^b	6.99±0.016 ^b	14.45±0.13 ^b	4.54±0.02 ^d
100	3.21±0.07 ^a	119.46±2 ^a	7.82±0.16 ^a	108.22±0.28 ^a	ND ^b	7.67±0.23 ^a	8.9±0.12 ^b	5.26±0.05 ^a
150	3.03±0.10 ^b	112.93±3.12 ^{ab}	6.52±0.03 ^{bc}	61.56±0.08 ^b	0.15±0.002 ^a	6.84±0.11 ^b	8.4±0.07 ^b	4.7±0.06 ^c
200	1.56±0.13 ^d	89.36±2.54 ^c	6.12±0.13 ^c	21.43±0.06 ^d	ND ^b	5.51±0.2 ^d	12.05±1.38 ^b	4.43±0.05 ^e

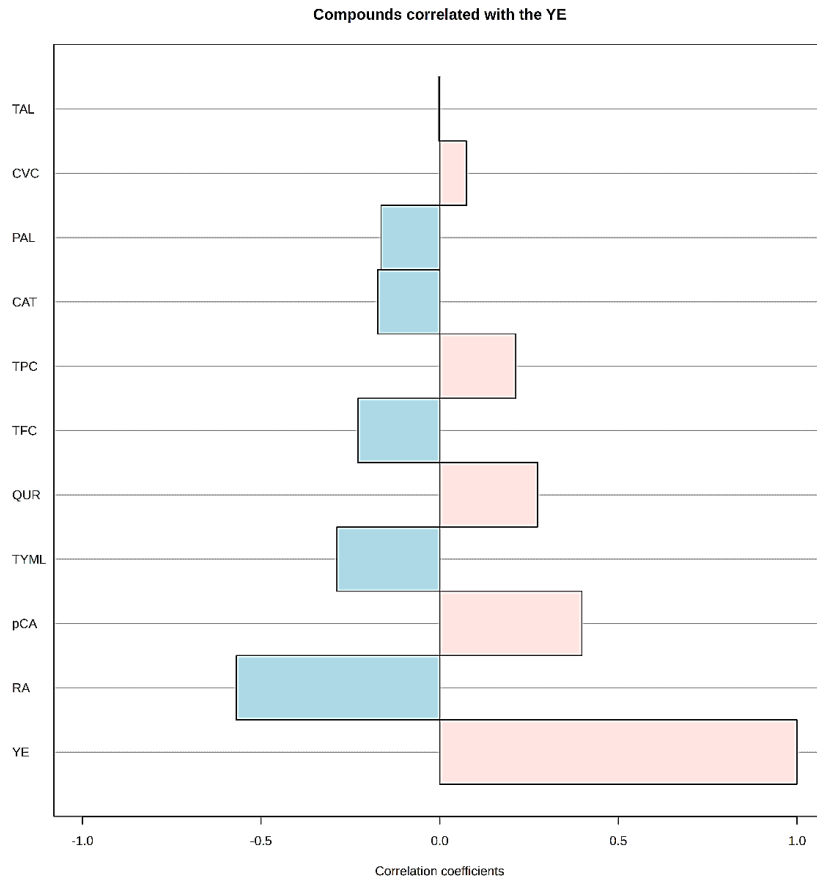
مقادیر براساس میانگین سه تکرار SEM ± نشان داده شده و حروف نامشابه معرف معنی‌دار بودن بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) است. ND (Not Detected) نشان دهنده عدم وجود ترکیبات فنلی در عصاره سلولی است. TPC: محتوای فنل کل، TFD: محتوای فلاونوئید کل. Data are mean values of three replicates ± SD. Dissimilar letters indicate significant differences based on the Duncan test ($P \leq 0.05$).

برده شده از YE با فاکتورهای اندازه‌گیری شده غالباً ضعیف و بسیار ضعیف بود (شکل ۲).

علاوه بر این، برای بررسی بیشتر مفاهیم عملکردی و همبستگی فاکتورهای اندازه‌گیری شده، نمودار نقشه حرارتی رسم شد (شکل ۳). نتایج نشان دادند بین میزان فعالیت آنزیم PAL با TPC ($r_{0.01} = +0.83$)، TFC ($r_{0.01} = +0.89$) و محتوای کوئرستین ($r_{0.01} = +0.83$) یک همبستگی مثبت و تقریباً قوی وجود داشت. همچنین، بین میزان فعالیت آنزیم TAL با TPC ($r_{0.01} = +0.63$)، و TFC ($r_{0.01} = +0.73$) یک همبستگی مثبت و متوسط مشاهده شد. مقایسه این نتایج بیانگر این موضوع است که شاید آنزیم PAL در بیش‌تولیدی و بیش‌انباشتی برخی ترکیبات فنلی در سلول‌های *D. polychaetum* موثرتر از آنزیم TAL عمل می‌کند.

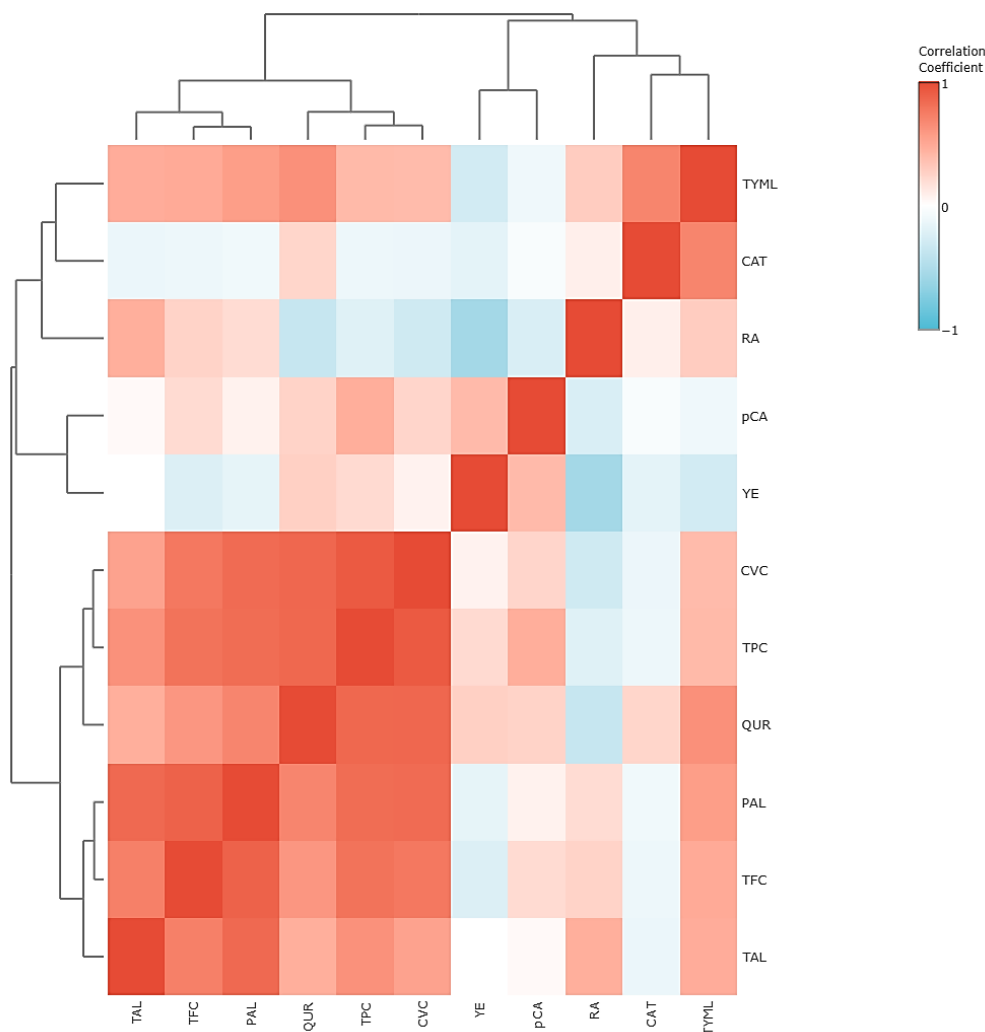
بررسی ضرایب همبستگی بین غلظت‌های مختلف YE و فاکتورهای اندازه‌گیری شده

برای درک بهتر اثر غلظت‌های مختلف YE بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول‌های کشت شده، یک الگوی ساده از میزان همبستگی بین غلظت‌های بکار برده شده و فاکتورهای مختلف اندازه‌گیری شده در سلول‌های شاهد و تیمار شده بررسی شد (شکل ۲). در این الگو ضریب همبستگی پیرسون (ρ) برای نمونه‌های مورد بررسی گزارش شده است. بر اساس این الگو می‌توان اظهار داشت که منفی‌ترین همبستگی با غلظت‌های مختلف YE مربوط به محتوای رزمارینیک اسید ($r_{0.01} = -0.57$) و تیمول ($r_{0.01} = -0.29$) بود و مثبت‌ترین همبستگی بین غلظت‌های مختلف YE و p -کوماریک اسید ($r_{0.01} = +0.40$) و کوئرستین ($r_{0.01} = +0.27$) گزارش شد. هر چند ضرایب بدست آمده نشان داد که همبستگی بین غلظت‌های بکار



شکل ۲- الگوی ساده از میزان همبستگی بین غلظت‌های بکار برده شده از YE (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و فاکتورهای مختلف اندازه‌گیری شده در سلول‌های شاهد و تیمار شده. YE؛ عصاره مخمر، RA؛ رزمارینیک اسید، pCA؛ p-کوماریک اسید، TYML؛ تیمول، QUR؛ کوئرستین، TFC؛ محتوای فلاونوئید کل، TPC؛ محتوای فنل کل، CAT؛ کاتچین، PAL؛ فنیل آلانین آمونیا لیاز، CVC؛ کارواکرول، TAL؛ تیروزین آمونیا لیاز.

Figure 2- A simple correlation pattern between the different Yeast extract concentrations (0, 25, 50, 100, 150, and 200 mg/L) and various parameters of treated and untreated cells. YE: yeast extract, RA: Rosmarinic acid, p-CA: p-coumaric acid, TYML: Thymol, QUR; Quercetin, TPC: total phenolic compound, TFD: total flavonoid content, CAT: Catechin, PAL: phenylalanine ammonia-lyase, CVC: Carvacrol, TAL: tyrosine ammonia lyase.



شکل ۳- تجزیه و تحلیل نقشه حرارتی و ضریب همبستگی پیرسون (ρ) برای نمونه‌های تیمار شده با YE و نمونه‌های شاهد محاسبه شد. نقشه حرارتی تغییرات در تمام صفات مورد بررسی را مقایسه می‌کند. روش عادی‌سازی شامل میانگین داده‌ها با مقیاس‌های رنگی بود. رنگ آبی نشان‌دهنده همبستگی منفی و رنگ قرمز نشان‌دهنده همبستگی مثبت بین فاکتورهای مورد بررسی بود، همچنین شدت رنگ نشان‌دهنده شدت همبستگی می‌باشد، هرچه شدت رنگ بیشتر همبستگی قوی‌تر و هرچه شدت رنگ کمتر همبستگی ضعیف‌تر می‌باشد. YE؛ عصاره مخمر، RA؛ رزمارینیک اسید، pCA؛ p -کوماریک اسید، TYML؛ تیمول، QUR؛ کوئرستین، TFC؛ محتوای فلاونوئید کل، TPC؛ محتوای فنل کل، CAT؛ کاتچین، PAL؛ فنیل آلانین آمونیا لایاز، CVC؛ کاروکرول، TAL؛ تیروزین آمونیا لایاز.

Figure 3- Heatmap analysis and Pearson's correlation coefficient (ρ) calculated for the YE-treated and untreated cells. Heatmap compares the changes in all studied traits. The normalization procedure consisted of mean row-centering with color scales. YE: yeast extract, RA: Rosmarinic acid, p-CA: p -coumaric acid, TYML: Thymol, QUR: Quercetin, TPC: total phenolic compound, TFD: total flavonoid content, CAT: Catechin, PAL: phenylalanine ammonia-lyase, CVC: Carvacrol, TAL: tyrosine ammonia lyase.

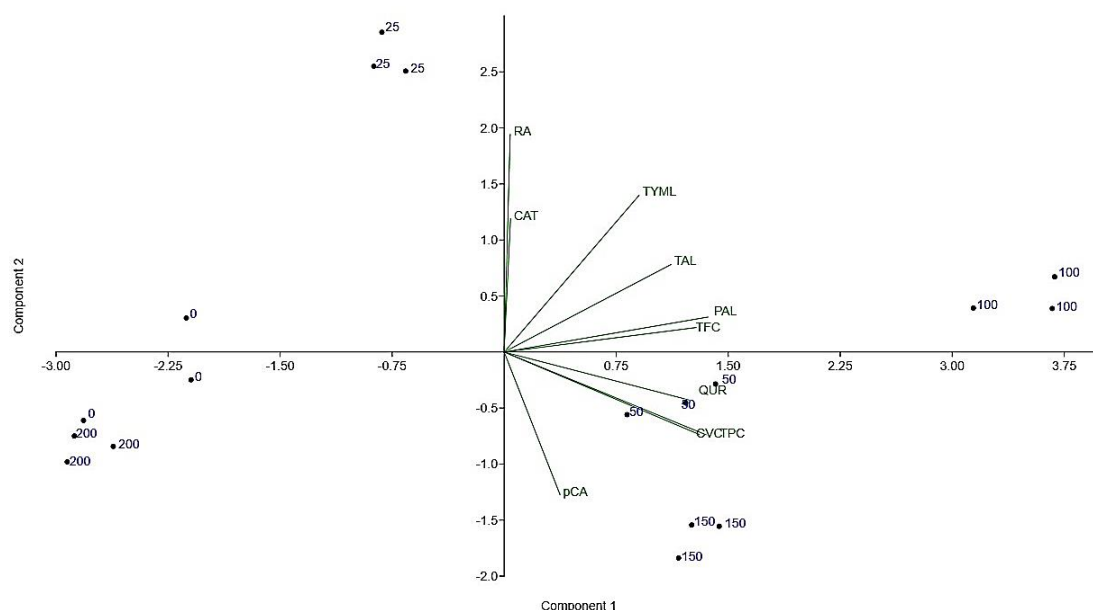
نکته قابل توجه این بود که این موضوع در رابطه با تولید رزمارینیک اسید بر عکس بود. بررسی ضرایب همبستگی پیرسون نشان داد ضریب همبستگی بین میزان فعالیت آنزیم TAL و محتوای رزمارینیک اسید ($r_{0.01} = +0.47$) در سلول‌های مورد پژوهش بیش از ضریب همبستگی گزارش شده بین میزان فعالیت آنزیم PAL و مقدار این ترکیب

$(r_{0.01} = +0.20)$ بود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که شاید اثر آنزیم TAL بر تولید رزمارینیک اسید بیشتر از آنزیم PAL بود. همچنین بین فعالیت دو آنزیم PAL و TAL یک همبستگی مثبت و قوی ($r_{0.01} = +0.85$) گزارش شد. بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت که تجمع ترکیبات فنلی می‌تواند به طور مثبت با فعال شدن آنزیم‌های کلیدی

نکته قابل توجه این بود که این موضوع در رابطه با تولید رزمارینیک اسید بر عکس بود. بررسی ضرایب همبستگی پیرسون نشان داد ضریب همبستگی بین میزان فعالیت آنزیم TAL و محتوای رزمارینیک اسید ($r_{0.01} = +0.47$) در سلول‌های مورد پژوهش بیش از ضریب همبستگی گزارش شده بین میزان فعالیت آنزیم PAL و مقدار این ترکیب

با YE تنظیم شود.

در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها در سلول‌های تحت تیمار



شکل ۴- PCA biplot از پاسخ‌های بیوشیمیایی سلول‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف YE (0، 25، 50، 100، 150 و 200 میلی‌گرم بر لیتر). YE: عصاره مخمر، RA: رزمارینیک اسید، p-CA: *p*-کوماریک اسید، TYML: تیمول، QUR: کوئرستین، TFC: محتوای فلاونوئید کل، TPC: محتوای فنل کل، CAT: کاتچین، PAL: فنیل آلانین آمونیا لیز، CVC: کارواکرول، TAL: تیروزین آمونیا لیز.

Figure 4: PCA biplot of the analyzed biochemical responses of *D. polychaetum* cells to Yeast extract (0, 25, 50, 100, 150 and 200 mg/L) treatment. YE: yeast extract, RA: Rosmarinic acid, p-CA: *p*-coumaric acid, TYML: Thymol, QUR; Quercetin, TPC: total phenolic compound, TFD: total flavonoid content, CAT: Catechin, PAL: phenylalanine ammonia-lyase, CVC: Carvacrol, TAL: tyrosine ammonia lyase.

علاوه بر این، سلول‌های تیمار شده با 100 میلی‌گرم بر لیتر YE دسته چهارم را تشکیل دادند. فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL در این گروه از سلول‌ها بیش از سایر سلول‌ها بود. ممکن است این موضوع منجر به تجمع بیشتر TFC و تیمول در این سلول‌ها شده باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های حاصل از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از YE به عنوان محرک زیستی منجر به تحریک فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی و بدنبال آن تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت سوسپانسیون سلولی *D. polychaetum* شد. بسته به غلظت تیمارهای انجام شده، سلول‌ها، پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متفاوتی را نشان دادند. به طور کلی، بیشترین محتوای TFC، TPC، کوئرستین، کاتچین، تیمول و کارواکرول در

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل اجزای اصلی (PCA)، اثر غلظت‌های مختلف YE بر سلول‌های مختلف و روابط بین فاکتورهای اندازه‌گیری شده را نشان داد (شکل ۴). دو جزء اصلی (PC_1 و PC_2) به ترتیب 54/12٪ و 17/05٪ از کل واریانس را در سلول‌های تیمار نشده و تیمار شده توضیح دادند. بر این اساس سلول‌های مورد بررسی در چهار گروه دسته‌بندی شدند. گیاهان شاهد و تیمار شده با 200 میلی‌گرم بر لیتر YE (بالاترین غلظت به کار برده شده در این پژوهش) در یک دسته در کنار هم قرار گرفتند. همچنین، سلول‌های تیمار شده با غلظت 25 میلی‌گرم بر لیتر YE در گروه دوم قرار گرفت. این غلظت منجر به افزایش تولید و انباشت رزمارینیک اسید و کاتچین در سلول‌های تحت تیمار شده. دسته سوم، سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های 50 و 150 میلی‌گرم بر لیتر YE بود که محتوای قابل توجهی از TPC، کارواکرول و کوئرستین را داشتند.

بیوشیمیایی YE بر روی سلول‌های تیمار شده ارائه کرد. به همین ترتیب، YE در غلظت‌های بهینه می‌تواند به عنوان محرک زیستی برای بیش‌تولیدی و بیش‌انباشتی متابولیت‌های ثانویه ارزشمند در گیاهان دارویی نظیر رزمارینیک اسید، کوئرستین، کاتچین، تیمول و کاروکرول در نظر گرفته شوند.

قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدرانی خود را از دانشگاه اصفهان به منظور حمایت از انجام این پژوهش ابراز می‌کنند.

Reference

- Ahmad, Z., Shahzad, A., & Sharma, S. (2019). Chitosan versus yeast extract driven elicitation for enhanced production of fragrant compound 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (2H4MB) in root tuber derived callus of *Decalepis salicifolia* (Bedd. ex Hook. f.) Venter. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 136, 29-40. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1488-4>
- Babich, O., Sukhikh, S., Pungin, A., Ivanova, S., Asyakina, L., & Prosekov, A. (2020). Modern trends in the *in vitro* production and use of callus, suspension cells and root cultures of medicinal plants. *Molecules*, 25(24), 5805. <https://doi.org/10.3390/molecules25245805>
- Bavi, K., Khavari-Nejad, R. A., Najafi, F., & Ghanati, F. (2022). Phenolics and terpenoids change in response to yeast extract and chitosan elicitation in *Zataria multiflora* cell suspension culture. *3 Biotechnology*, 12(8), 163. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03235-x>
- Beaudoin-Eagan, L. D., & Thorpe, T. A. (1985). Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology*, 78(3), 438-441. <https://doi.org/10.1104/pp.78.3.438>
- Cardoso, J. C., Oliveira, M. E. B. d., & Cardoso, F. d. C. (2019). Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira*, 37(2), 124-132. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620190201>
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10 (3), 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Chen, J., Li, L., Tian, P., Xiang, W., Lu, X., Huang, R., & Li, L. (2021). Fungal endophytes from medicinal plant *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. F. promote the host plant growth and phenolic accumulation. *South African Journal of Botany*, 143, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.07.041>
- El-Beltagi, H. S., Mohamed, H. I., Aldaej, M. I., Al-Khayri, J. M., Rezk, A. A., Al-Mssallem, M. Q., Sattar, M. N., & 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(4), 615-629. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10264-x>
- Goncharuk, E., Saibel, O., Zaitsev, G., & Zagoskina, 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(6), 620-628 .
<https://doi.org/10.1134/S1062359022060061>
- Hammer, O., & Harper, D. A. (2024). *Paleontological data analysis*. John Wiley & Sons.
- Hassanpouraghdam, M. B., Ghorbani, H., Esmailpour, M., Alford, M. H., Strzemeski, M., & Dresler, S. (2022). Diversity and distribution patterns of endemic medicinal and aromatic plants of Iran: Implications for conservation and habitat management. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3), 1552.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijerph19031552>
- Ho, T. T., Lee, J. D., Jeong, C. S., Paek, K. Y., & Park, S. Y. (2018). Improvement of biosynthesis and accumulation of bioactive compounds by elicitation in adventitious root cultures of *Polygonum multiflorum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 199-209. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8629-2>
- Jamiołkowska, A. (2020). Natural compounds as elicitors of plant resistance against diseases and new biocontrol strategies. *Agronomy*, 10(2), 173.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10020173>
- Khodaei, M., Amanzadeh, Y., Faramarzi, M. A., & Pirali-Hamedani, M. (2019). Cholinesterase inhibitory, anti-oxidant and anti-tyrosinase activities of three Iranian species of *Dracocephalum*. *Research Journal of Pharmacognosy*, 6(3), 25-31.
<https://doi.org/10.22127/rjp.2019.89457>
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 1, 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Lin, L. Z., & Harnly, J. M. (2010). Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry*, 120(1), 319-326.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.083>
- Nadeem, M., Abbasi, B. H., Garros, L., Drouet, S., Zahir, A., Ahmad, W., Giglioli-Guivarc'h, N., & 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/s11240-018-1468-8>
- Rajaei, P., & Mohamadi, N. (2012). Ethnobotanical study of medicinal plants of Hezar mountain allocated in south east of Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research (IJPR)*, 11(4), 1153.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3813156/>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 99, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Smetanska, I., Tonkha, O., Patyka, T., Hunaefi, D., Mamdouh, D., Patyka, M., Bukin, A., Mushtruk, M., Slobodyanyuk, N., & Omelian, A. (2021). The influence of yeast extract and jasmonic acid on phenolic acids content of *in vitro* hairy root cultures of *Orthosiphon aristatus*. *Slovak Journal of Food Sciences*, 15.
<https://doi.org/10.5219/1508>
- Taghizadeh, M., Nasibi, F., Kalantari, K. M., & Ghanati, F. (2019). Evaluation of secondary metabolites and antioxidant activity in *Dracocephalum polychaetum* Bornm. cell suspension culture under magnetite nanoparticles and static magnetic field elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136, 489-498.
<https://doi.org/10.1007/s11240-018-01530-1>
- Taghizadeh, M., Soltanian, S., & Nasibi, N. (2022). Phytochemical analysis of volatile and non-volatile fractions, antioxidant, and anti-cancer activities of *Dracocephalum polychaetum* and *Dracocephalum kotschyi*. *Journal of Cell and Molecular Research*, 14(1), 11-19.
<https://doi.org/10.22067/jcmr.2022.75035.1031>
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018).

Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines*, 5(3), 93.

<https://doi.org/10.3390/medicines5030093>

Wagay, N. A., Lone, R., Rafiq, S., & Bashir, S. U. (2020). Phenolics: a game changer in the life cycle of plants. *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*, 1, 241-275.

https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_11

Yaghoobi, M. M., Khaleghi, M., Rezanejad, H & Parsia, P. (2018). Antibiofilm activity of *Dracocephalum polychaetum* extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 5(1), 61772-61772. <https://doi.org/10.5812/ajcmi.61772>