فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۵، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۹-۱ (۱۳۸٦)

بهینه سازی کشت بافت آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss) برای تولید اسید رزمارینیک

حلیمه حسن پور[۱]، فرانسواز برنارد[۱]، حسین شاکر[۱]
۱- دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، گروه زیست، تهران. E-mail: ha_hassanpoor@yahoo.com

چکیده

بهینه سازی محیط کشت کالوس آویشن شیرازی برای افزایش تولید اسید رزمارینیک (RA) به عنوان متابولیت ثانویه با استفاده از تغییر شرایط کشت انجام گرفت. القاء کالوس از کشت گره ساقه‌ای آویشن روی محیط کشت MS با ترکیب هورمونی 2,4-D (۰/۵ mg/l) و کینتین (۱ mg/l) انجام شد. بهینه سازی رشد این بافت با محیط گامبورگ (نمکها و ویتامینها) و هورمون بنزیل آدنین (۰/۷۵ mg/l) در شرایط تاریکی صورت گرفت. پس از آن کالوسها در محیط گامبورگ حاوی ساکارز (۳۰ یا ٦۰g/l)، گلوکز (٦۰، ۷۵ یا ۹۰ g/l) و تحت شرایط فتوپریود نوری ۱٦ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی یا تاریکی کامل قرار گرفتند. تجمع RA بافتها ٤٥ روز پس از کشت، با HPLC اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با تکرار مساوی تجزیه و تحلیل گردیدند. تجمع RA در کالوس بالاتر از گیاهچه در شیشه بود و بیوماس بیشتری نیز از کالوس بدست آمد. بیشترین مقدار RA (۱۵/٦٪) با تیمار گلوکز بدست آمد. رشد کالوس در محیط کشت حاوی ۷۵g/l گلوکز نسبت به محیط حاوی ۹۰ g/l گلوکز بیشتر بود، اما اختلاف معنی‌داری بین سطوح گلوکز برای تولید RA مشاهده نگردید. نتایج نشان داد که عوامل اسموتیک و شرایط نوری اثر معنی‌داری بر تجمع RA در کشت کالوس آویشن شیرازی داشته و با کشت کالوس می‌توان RA و رشد بالاتر کالوس را نسبت به گیاهچه رشد یافته در شیشه بدست آورد.

واژه‌های کلیدی: آویشن شیرازی، کشت بافت، کالوس، متابولیت ثانویه و اسید رزمارینیک.

مقدمه

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss) گیاهی دارویی بوده و متعلق به خانواده نعناعیان می‌باشد. این گیاه پراکنش محدودی در جهان دارد و تنها در ایران، افغانستان و پاکستان می‌روید (جم‌زاد، ۱۳۷۳). اسید رزمارینیک (RA) جزء اسیدهای فنلیک بوده و یکی از متابولیت‌های ثانویه گیاه آویشن شیرازی می‌باشد که دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد ویروس، ضد آلرژی، ضد التهاب و ضد سرطان است. این ترکیب در گیاهان خانواده نعناعیان (Lamiaceae) یافت می‌شود (Fesen *et al*, 1993). اخیرا با توجه به اهمیت اقتصادی و دارویی متابولیت‌های ثانویه، کشتهای سلول مورد توجه بسیار قرار گرفته است. بر اساس بیشتر گزارشها میزان تولید متابولیت ثانویه از کشتهای تمایز نیافته بسیار کم است (Collin & Edwareds, 1998). اما تلاشهای زیادی برای تحریک سلولها با استفاده از روشهای متنوع صورت گرفته است. این روشها شامل انتخاب لاین سلولی، بهینه سازی محیط کشت (از نظر مواد غذایی، فیتوهورمونها و پیش

ماده)، شرایط کشت (pH، نور، دما و غیره) و اخیرا مهندسی متابولیکی می‌باشد (Verpoorate *et al.*, 2002). تولید RA در گیاهان متعددی از جمله *Coleus blumi* (Razzaque & Ellis, 1977)، *Anchosa officinallis* (De-Eknamkul & Ellis, 1987) و *Lithospermum erythrorhizon* (Fukui *et al.*, 1984) با استفاده از تیمارهای متنوع بررسی شده است. در رابطه با تولید RA در کشت بافت گیاه آویشن شیرازی تنها تحقیق توسط Mohagheghzadeh و همکاران در سال ۲۰۰٤ صورت گرفته است که به مقدار ۳۵۵ میلی‌گرم RA در هر صد گرم وزن خشک گیاه با استفاده از تیمارهای هورمونی بدست آمده است. در این تحقیق اثر تیمارهای کربوهیدرات و نور را روی بافت کالوس آویشن شیرازی، به منظور دستیابی به محیطی با تولید بیوماس و RA بالا بررسی شده است.

مواد و روشها

ماده گیاهی

بذرهای گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss) از ارتفاعات کوه زرد در روستای خنب از توابع کاشان در سال ۱۳۸۳ جمع آوری شدند. بر اساس روش نژادفلاح (۱۳۸۲) بذرها پس از شستشو با محلول Tween20 (۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل+ ۲ قطره Tween20)، در الکل ۷۰ درصد شناور شدند. پس از دو بار شستشو با آب مقطر استریل، در ۲۰ میلی‌لیتر هیپوکلریت سدیم تجاری ۱٪ (در تاریکی) ضدعفونی شدند. بذرهای استریل شده در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) جامد قرار گرفت و پس از ۲ ماه، از قطعات گره فاقد جوانه انتهایی به عنوان قطعه جداکشت، استفاده گردید.

کشت کالوس

کالوس از کشت گره ساقه‌ای گیاه آویشن شیرازی رشد یافته روی محیط MS با ترکیب هورمونی 2,4-D (۰/۵ mg/l) و کینتین (۱ mg/l)، ساکارز (۳۰ g/l)، آگار (۷ g/l) و کازئین هیدرولیز (۲۰۰mg/l) بدست آمد. پس از آن بافتهای کالوس در سه نوع محیط کشت: محیط کشت گامبورگ (B5) همراه با ویتامینهای گامبورگ (vit B5)، محیط کشت MS همراه با ویتامینهای B5 (vit B5) و محیط کشت MS همراه با ویتامینهای MS (vit MS) با هورمون بنزیل آدنین (۰/۷۵ mg/l) در شرایط دمایی ۱ ± ۲۵ درجه، فتوپریود نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و نور فلورسنت ۲۲۰۰ لوکس کشت شدند. بعد از انتخاب بهترین محیط کشت از نظر رشد، رنگ و شکل ظاهری پس از شش هفته، بافتهای کالوس سه بار در محیط فوق واکشت شدند. قطعات جداکشت کالوس در محیط B5 با هورمون بنزیل آدنین (۰/۷۵mg/l)، ساکارز (۳۰ و ٦۰g/l)، گلوکز (٦۰، ۷۵ و ۹۰g/l) قرار گرفته و به شرایط تاریکی و یا فتوپریود نوری ۱٦ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شده و بعد از ٦ هفته مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

اندازه گیری رشد

جهت اندازه گیری میزان رشد، کالوسها را روی دستگاه Moisture analyzer (Sartorius) مدل MA40 قرار داده، وزن تر آنها بدست آمد و تحت اثر دمای ٦۰ درجه سانتیگراد در مدت ۱/۵-۱ ساعت وزن خشک آنها تعیین گردید. نتایج بدست آمده از رشد میانگین ٤ تکرار بدست آمد.

آماده سازی محلول استاندارد

برای تهیه محلول استاندارد مقدار ۲۰ میلی‌گرم از RA استاندارد پس از وزن شدن در متانول حل شد و به حجم ۱۰۰ml رسانده شده و محلولی با غلظت ppm ۲۰۰۰ بدست آمد. جهت تهیه محلولی با غلظت ۴۰ppm، مقدار ۵۰۰µl از محلول اولیه را برداشته و با متانول به حجم ۲۵ رسانده و محلول استانداردی با غلظت ۴۰ ppm تهیه شد.

استخراج RA

عصاره‌گیری کالوسها با استفاده از روش معرفی شده توسط Hippolyte و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد. ابتدا ۱/۵ گرم از وزن تر کالوس مربوط به هر تیمار را در لوله اپندورف (۲ ml) ریخته و با ازت مایع منجمد شد. نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دستگاه لیوفیلیزر قرار داده شد. پس از آن ۵۰ mg از بافت لیوفیلیزه شده را پودر نموده و ۵ ml متانول به آن اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه روی شیکر قرار گرفت و به مدت ۱۵ دقیقه، با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. سوپرناتانت آن جدا شده و حلال متانل آن تبخیر گردید. مواد جامد باقی مانده در ۲ ml متانل حل گردید و با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرولیتر تحت فشار فیلتر شده، عصاره بدست آمده جهت تعیین میزان RA مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین میزان RA

برای تعیین مقدار RA با دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC) از روش Ilieva و Pavlov (۱۹۹۷) استفاده گردید. سیستم کروماتوگرافی بکار رفته در این تحقیق، مدل Well chrom از شرکت Knauer آلمان با پمپ مدل K-1001 و دتکتور DIODE مدل K-2800 که در ۳۳۰ نانومتر تنظیم گردید و ستون مورد استفاده ODS-3 Inertsil 250 × 4.6 mm, بود. فاز متحرک (محلول B) استونیتریل / اسیداستیک ۲٪ با نسبت (v/v ۳: ۷) با گرادیانت خطی ۵۰٪ به ۳۰٪ محلول B نسبت به محلول A و فاز ثابت آن اسید استیک ۲٪ بود. سرعت جریان حلال در ستون ۱/۵ml بر دقیقه و مقدار نمونه تزریق شده ۲۰µl بود. محلولهای استاندارد و عصاره‌های بدست آمده از بافت گیاهی به دستگاه تزریق گردید. زمان بازداری RA در محلول استاندارد ۱± ۱۹ دقیقه بود.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشها در قالب طرح بلوکهای کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شده و نتایج آماری با استفاده از آزمون فاکتوریل تجزیه و تحلیل گردید. داده‌ها در نمودارها به صورت میانگین ±SE بیان شده و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری به کمک نرم افزار SPSS 9.0 و در سطح معنی‌داری ۵٪ صورت گرفت.

نتایج

کشت کالوس

القاء کالوس بر روی محیط کشت MS حاوی هورمونهای 2,4-D (۰/۵ mg/l) و کینتین (۱ mg/l) با موفقیت انجام گرفت، اما یک هفته پس از واکشت روی محیط فوق کالوسها کاملا قهوه‌ای شد. به این دلیل، قطعات جداکشت در سه نوع محیط کشت شامل محیط کشت B5 حاوی ویتامینهای B5، محیط کشت MS

حاوی ویتامینهای B5 و محیط کشت MS حاوی ویتامینهای MS واکشت شدند. بعد از ٦ هفته شاخص‌های رشد مانند وزن تر، وزن خشک، رنگ، شکل ظاهری و اندام زایی کالوسها مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱، شکل ۱). نتایج نشان داد که بیشترین رشد کالوسها بر روی محیط کشت گامبورگ حاوی ویتامینهای B5 صورت گرفته و رنگ کالوسها زرد و فاقد هر گونه اندام زایی می‌باشد. بررسی آماری نشان داد که بین تیمارهای متفاوت محیط کشت از نظر وزن تر و وزن خشک اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) وجود دارد.

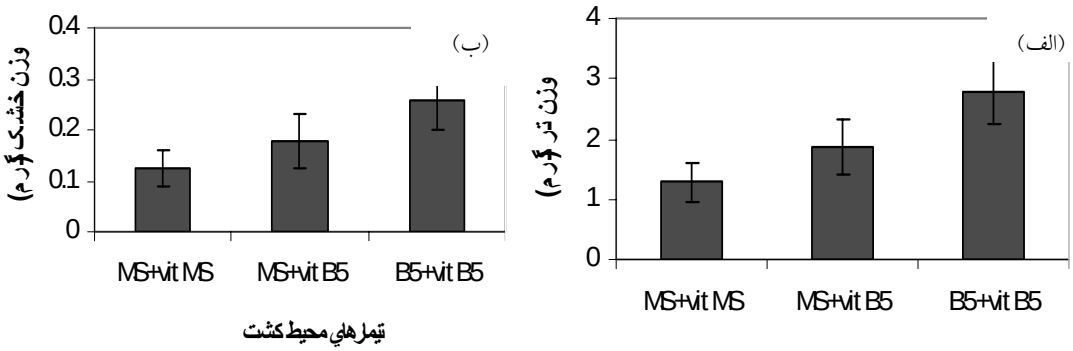
جدول ۱- تأثیر نوع محیط کشت براندام زایی، رشد و رنگ کالوسهای آویشن شیرازی پس از ٦ هفته در شرایط نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با میانگین ٤ تکرار

اندام زایی	شکل ظاهری	رنگ کالوس	تیمار
زیاد	ترد	سبز	**MS+ vit MS**
کم	ترد	سبز مایل به زرد	**MS+ vit B5**
-	ترد	زرد	**B5+ vit B5**

B5+vitB5: محیط کشت گامبورگ حاوی ویتامینهای گامبورگ

MS+vitB5: محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ویتامینهای گامبورگ

MS+vitMS: محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ویتامینهای موراشیگ و اسکوگ



شکل ۱- تأثیر تیمارهای مختلف محیط کشت بر وزن تر (الف)، وزن خشک (ب) کالوسهای آویشن شیرازی بعد از ٦ هفته کشت در شرایط نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با میانگین ٤ تکرار

B5+vitB5: محیط کشت گامبورگ همراه با ویتامینهای گامبورگ

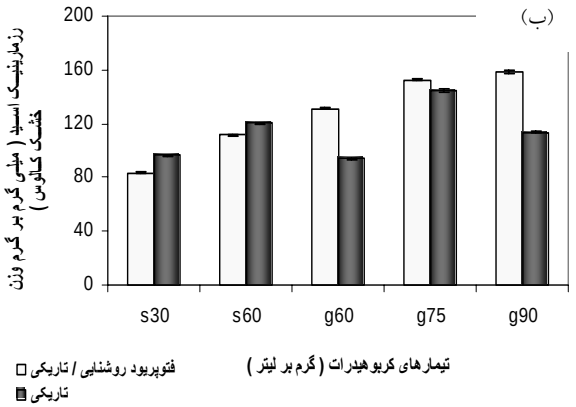
MS+vitB5: محیط کشت موراشیگ و اسکوگ همراه با ویتامینهای گامبورگ

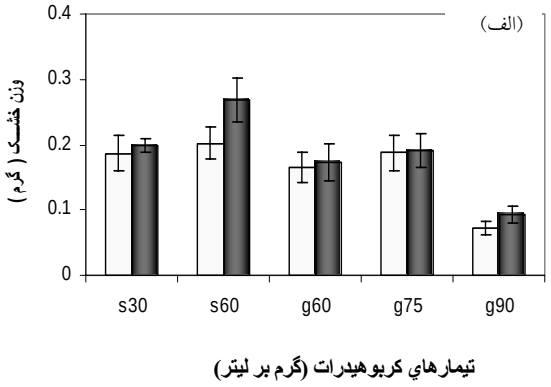
MS+vitMS: محیط کشت موراشیگ و اسکوگ همراه با ویتامینهای موراشیگ و اسکوگ

در شکل ۱ مشخص است که محیط کشت گامبورگ (B5+ vitB5) با هورمون و هورمون بنزیل آدنین (۰/۷۵mg/l)، بهترین محیط برای رشد کالوسهای آویشن شیرازی می‌باشد.

اثر تیمارهای کربوهیدرات بر مقدار RA و رشد

مقدار رزمارینیک اسید و رشد کالوسهای بدست آمده از تیمارهای متفاوت سوکروز (۳۰ و ۶۰g/l)، گلوکز (۶۰، ۷۵ و ۹۰g/l) که در شرایط فتوپریود نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و یا تاریکی کامل قرار گرفته بودند، بعد از ۶ هفته بررسی گردید (شکل ۲). رشد کالوسها در شرایط تاریکی بیشتر از فتوپریود نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی است. تیمار گلوکز ۹۰g/l اثر بازدارنده را روی رشد کالوسها دارد. با افزایش تراکم گلوکز میزان رشد افزایش یافته و زمانی‌که به یک حد مناسب رسید، از آن مرحله به بعد میزان وزن خشک کاهش می‌یابد. رشد کالوسها با تیمار ساکارز نسبت به تیمار گلوکز بیشتر است و بالاترین مقدار رشد مربوط به تیمار سوکروز ۶۰ گرم بر لیتر در شرایط تاریکی است. بررسی آماری نشان داده است که نوع و تراکم کربوهیدرات اثر معنی‌داری ($P<0.05$) بررشد کالوس‌ها دارد.





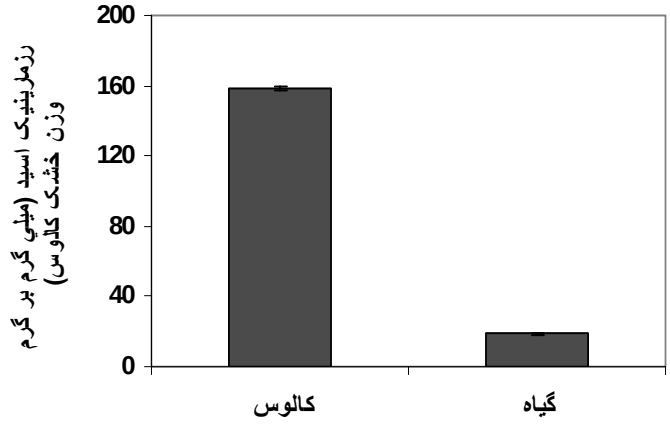
شکل ۲- تأثیر تیمارهای متفاوت ساکارز (s) و گلوکز (g) بر میزان تولید وزن خشک (الف) و RA (ب) کالوسهای آویشن شیرازی تحت فتوپریود نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و تاریکی بعد از ۶ هفته کشت

مقدار RA با تیمار گلوکز بیشتر از تیمار ساکارز بوده و بیشترین مقدار RA (۱۵۸/۲۶ ±۱/۰۸۶ میلی‌گرم در گرم وزن خشک کالوس) با تیمار گلوکز ۹۰g/l در شرایط فتوپریود نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بدست آمد. مقایسه میانگین مربوط به میزان RA در جدول ۲ نشان داده شده است (اعدادی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، در سطح معنی‌دار ۵٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند).

جدول ۲- مقایسه میانگین مربوط به اثر تیمارهای گلوکز و ساکارز بر میزان RA

تیمار	مقدار RA (میلی‌گرم در گرم وزن خشک کالوس)	
	فتوپریود نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی	تاریکی کامل
ساکارز ۳۰	۸۳/۳۳d	۹٦/۳٤d
ساکارز ٦۰	۱۱۱/۳۷c	۱۲۰/۲۲b
گلوکز ٦۰	۱۳۱/۳۵b	۹۳/۷٦d
گلوکز ۷۵	۱۵۲/۷٦a	۱٤٤/٦۱a
گلوکز ۹۰	۱۵٦/۲٦a	۱۱۳/۵۷c

مقدار RA گیاهچه‌های ۲ ماهه بدست آمـده از رویـش بذر در شیشه و کالوسهای حاصل از تیمـار گلـوکز ۹۰g/l نیز مقایسه گردید و مشاهده شد که میزان اسید رزمارینیک در کالوس بیشتر از گیاهچه است (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میزان RA در کالوسهای بدست آمده از تیمارگلوکز ۹۰ g/l و گیاهچه‌های حاصل از رویش بذر

بحث

از اواخر دههٔ ٦٠ میلادی، تکنولوژی کشت بافت و سلول به عنوان ابزاری جهت مطالعه و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی معرفی شده است. با استفاده از سیستم کشت سوسپانسیون سلولی می‌توان در مقیاس وسیع سلولهای گیاهی را کشت داد و متابولیت‌های ثانویه را استخراج نمود (Vanisree *et al*., 2004). گلوکز و ساکارز منابع ترجیحی برای کشت بافت گیاهی هستند. مطالعات نشان می‌دهد که ساکارز به عنوان کربوهیدرات منتخب در تعداد زیادی از گیاهان بوده و به عنوان منبع کربن و انرژی بکار می‌رود (Murashige and Skoog, 1962; Thorpe, 1982). استفاده از گلوکز و ساکارز میزان تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش داده و تراکم منبع کربن بر روی میزان تولید متابولیت ثانویه اثر دارد (Zenk *et al*., 1997). افزایش تراکم ساکارز محیط کشت منجر به افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمینولیاز شده و مقدار اسید سینامیک و به دنبال آن ترکیبهای فنلیک افزایش می‌یابد (Astrid *et al*., 2000). تعدادی از بررسی‌ها نشان داده‌اند که افزایش تراکم ساکارز در محیط کشت میزان RA را افزایش می‌دهد که در *Salvia officinalis* و *Coleus blumei* با افزایش تراکم ساکارز میزان RA در وزن خشک سلولی افزایش می‌یابد (Hippolyte *et al*., 1992; Peterson *et al*., 1993). در این تحقیق برای بررسی اثر کربوهیدرات روی میزان تولید RA از تراکم‌های متفاوت ساکارز (٣٠ و ٦٠g/l) و گلوکز (٦٠، ٧٥ و ٩٠g/l) استفاده گردید و مشخص شد که اولا با افزایش تراکم کربوهیدرات میزان RA افزایش می یابد، ثانیا اثر گلوکز بر میزان تولید RA با قند گلوکز بیشتر از ساکارز است و بیشترین مقدار RA با استفاده از گلوکز ٩٠g/l به میزان ٢٦/ ١٥٨ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک کالوس در شرایط فتوپریود نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی بدست آمد که در مقایسه با کار Mohagheghzadeh و همکاران (٢٠٠٤) بیش از ٤٠ برابر افزایش داشته است. همچنین مشخص شد که بین مقدار RA و رشد کالوس رابطه معکوس وجود دارد. در تحقیقات گذشته فقط از تیمار ساکارز برای افزیش میزان RA استفاده شده و رابطه مثبتی بین میزان RA و رشد کالوس نشان داده شد. در این تحقیق تیمار ساکارز رابطه مثبت بین میزان رشد و RA را نشان داد، ولی هنگامی‌که قند گلوکز به محیط اضافه گردید، نتیجه برعکس شده و تیمار گلوکز ٩٠g/l بیشترین میزان RA و کمترین مقدار رشد کالوس را نشان داد. از نظر اقتصادی گلوکز ٧٥ g/l بهترین تیمار بوده، زیرا از لحاظ میزان RA بین تیمار ٧٥ و ٩٠g/l گلوکز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، ولی رشد کالوس در غلظت ٧٥g/l گلوکز بیشتر بوده و میزان وزن خشک بیشتری را ایجاد می‌نماید.

هورمون 2,4-D عامل مهمی در القاء و تنوع سوماکلونی است. تنوع سوماکلونی ممکن است به علت تنوع ژنتیکی موجود در قطعات جداکشت اولیه، تعداد دفعات واکشت، شرایط کشت (کاربرد مواد تنظیم کننده در محیط کشت) و استفاده از عوامل جهش‌زا رخ دهد (Collin & Edwards, 1998). در این تحقیق میزان RA در کالوس خیلی بیشتر از گیاهچه است که دلیل آن احتمالا افزایش تنوع ژنتیکی کالوسها در طی واکشت و محیط القاء می‌باشد. بنابراین بهتر است برای تولید اقتصادی RA از کشت کالوس استفاده گردد، زیرا میزان

RA بیشتری تولید می‌گردد و وزن خشکی که از هر شیشه کالوس بدست می‌آید، خیلی بیشتر از گیاه است.

سپاسگزاری

نویسندگان از جناب آقای دکتر علیرضا قاسم‌پور از پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی برای کمک در تعیین RA تشکر می‌نمایند. در ضمن این تحقیق به وسیله طرح پژوهشی از دانشگاه شهید بهشتی حمایت مالی شده است.

منابع مورد استفاده

- جم زاد، ز.، ۱۳۷۳. آویشن، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.
- نژاد فلاح، ز.، ۱۳۸۲. ریزازدیادی گیاه آویشن شیرازی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید بهشتی.
- Astrid, L-E., Treutter, D. and Feucht, W., 2000. Influence of nutrients and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60: 15-21.
- Collin, H. A. and Edwards, S., 1998. Plant cell culture. Bios Scientific Publisher. PP. 121-137.
- De- Eknamkul. W. and Ellis, B.E., 1987. Tyrosine aminotransferase: The entrypiont enzyme of the tyrosine-derived pathway in rosmarinic acid biosynthesis. Phytochemistry, 26:1941-1946.
- Do, C. B. and Cormier, F., 1991. Effect of high ammonium concentration on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension cultured in a production medium. Plant Cell, Tiss Org Cult, 27:169-174.
- Fesen, M. R., Kohn, K. W., Leteutre, F. and Pommier, Y., 1993. Inhibitores of human immunodeficiency virus integrase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 507-511.
- Fukui, H., Yazaki, K. and Tabata, M., 1984. Two phenolic acids from Lithospermum erythrorhizon cell suspension cultures.phytohemistry, 23: 2398-2399.
- Hippolyte, I., Marin, B., Baccou, J.C. and Jonard, R., 1992. Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L.Plant Cell Rep, 11:109-112.
- Ilieva, M. and Pavlov, A., 1997. Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell-suspension culture. PPL. Microbiol. Biotechnol, 47:683-688.
- Mohagheghzadeh, A.; Shams-Ardakani, M; Ghannadi, A. and Minaeian, M., 2004. Rosmarinic acid from *Zataria multiflora* tops and *in vitro* culture. 75 (4): 315.
- Murashige, T. and Skoog. F., 1962. A revised medium for rapid growth and boiassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol, 15:473-497.
- Petersen, M., Hausler, E., Karwatzki, B. and Meinhard, J., 1993. Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell culture of *Coleus blumei Benth*. Planta.,189:10-14.
- Razzaque, A. and Ellis, B. E., 1997. Rosmarinic acid production in *Coleus* cell cultures. Planta, 137:287-291.
- Thorpe, T. A., 1982. Carbohydrate utilization and metabolism. 325-368. In:Bonga, J. M. and Durzan, D. J (eds*)* Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk. The Hague.
- Vanisree, M., Lee, Chen-Yue., Lo, Shu-Fung., Nalawade, S. N., Lin, C. Y. and Tsay, Hsin-sheng., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue culture. BOT. Bull. Acad. Sin, 45:1-22.
- Verpoorte, R., Contin, A. and Memelink, 2002. Biotechnology for the production of plant sceondary metabolites. Phytochemistry Reviews, 1: 13-25.
- Zenk, M. H., EL-Shagi, H. and UIbrich, B., 1997. Production of rosmarinic acid by cell-suspension cultures of *Coleus blumei*. Naturwissen-schaften, 64:585-586.

Optimizing callus culture in *Zataria multiflora* boiss for rosmarinic acid production

H. Hassan poor[1], F. Bernard[1] and H. Shaker[1]

1- Shahid Beheshti University, Dept of biology, Tehran, Iran. E-mail: ha_hassanpoor@yahoo.com

Abstract

Optimization of callus culture of *Zataria multiflora* carried out in order to improve rosmarinic acid (RA) production as a secondary metabolite. The research was conducted using factorial experiments based on randomized complete design. Callus induction from the shoot node culture was realized on MS medium supplemented with 2,4-D (0.5mg/l) and Kinetin (1mg/l). Optimized growth was obtained on Gamborg medium (salt and vitamins) with BA (0.75 mg/l) in dark. The tissues were cultivated in the same medium with sucrose (30, 60 g/l) or glucose (60, 75, 90 g/l) under 16h light/ 8h dark or continuous dark. Accumulation of RA was measured after 45 days of culture by HPLC. Accumulation of RA in callus culture was higher than in seedlings. Also, the higher biomass was obtained with callus culture. High quantities of RA (15.6%) were obtained with glucose treatment. There was not significant difference between 90 and 75g/l glucose for RA content, but higher callus growth was obtained with 75g/l than with 90g/l glucose. The results indicated that osmotic agents and illumination had a significant effect on RA accumulation in *Zataria* callus cultures. Furthermore, higher biomass and RA amounts can be obtained from callus cultures than from the cultured seedling.

Key words: *Zatraia multiflora*, callus culture, secondary metabolites, and rosmarinic acid.