دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

اثر وانادیل سولفات بر میزان مصرف محیط کشت توسط سلول‌های مرزه خوزستانی و بیوسنتز رزمارینیک اسید

امیر صحرارو[۱]، عبدالکریم زارعی[۲]، محمد حسین میرجلیلی[۳]، وحید اکبرپور[۴] و پیوریفیکاسیون کورچته[۵]

۱- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان، (نویسنده مسوول: asahraroo@guilan.ac.ir)
۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه جهرم
۳- دانشیار، پژوهشکده گیاهان دارویی و معطر، دانشگاه شهید بهشتی
۴- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۵- استاد، دانشکده بیولوژی، گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه سالامانکا
تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۴

چکیده

کاربرد بیوتکنولوژی برای تولید متابولیت‌های دارویی مهم از سلول‌های گیاهی و همچنین افزایش تولید این متابولیت‌ها با بهره گیری از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی مورد توجه پژوهشگران می‌باشد. این تحقیق به‌منظور بررسی کاربرد ماده وانادیل سولفات (الیسیتور غیرزیستی) بر الگوی مصرف محیط کشت توسط سلول‌های مرزه خوزستانی و همچنین اثر آن بر تولید رزمارینیک اسید انجام گرفت. برای این منظور سلول‌های حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی مرزه خوزستانی پس از ٤ بار واکشت در محیط کشت مایع بی-۵ به همراه پنج میلی‌گرم در لیتر بی اِی (بنزیل آدنین) و یک میلی‌گرم در لیتر آی بی اِی (ایندول بوتریک اسید) کشت گردید. غلظت‌های وانادیل سولفات صفر، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر بکار رفت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان مصرف محیط کشت توسط سلول‌های کشت شده در وانادیل سولفات ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بوده است. این در حالی است که وزن‌خشک بدست آمده در پایان دوره، برای سلول‌های این تیمار کمتر از بقیه بود. همچنین تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر وانادیل سولفات، وزن خشکی تقریبا برابر با شاهد نشان داد. بیشترین میزان بیوسنتز رزمارینیک اسید در پایان دوره مربوط به غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بود که نشان‌دهنده این است که کاربرد این ماده می‌تواند اثر مثبتی در بیوسنتز ماده دارویی رزمارینیک اسید داشته باشد. بطور کلی نتایج این پژوهش مشخص کرد که کاربرد برخی غلظت‌های ماده وانادیل سولفات به عنوان یک الیسیتور غیر زیستی در مرزه خوزستانی توانست زی‌توده خشک را در حد شرایط نرمال حفظ کرده و از طرف دیگر افزایش بیوسنتز ماده دارویی رزمارینیک اسید را نیز در پی داشت. بنابراین می‌توان این ماده را به‌عنوان یکی از مواد آینده‌دار در کشت‌های سوسپانسیون سلولی مرزه خوزستانی برای افزایش تولید رزمارینیک اسید پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: زی توده خشک، سوسپانسیون سلولی، الیسیتور، متابولیت گیاهی

مقدمه

الگوهای رفتاری گیاهان دارویی (گیاهان بطورکلی) به تغییرات محیطی و همچنین محتوای کم متابولیت‌های دارویی آنها، بهره‌برداری از جمعیت‌های موجود این گیاهان در عرصه‌های طبیعی و زراعی را دچار تردید می‌سازد. کاربرد روش‌های بیوتکنولوژی و کشت بافت به‌هدف حفاظت گیاهی و تولید متابولیت‌های دارویی مهم رو به افزایش است (۱،۳). بیوتکنولوژی از طریق کشت سلول، بافت یا اندام گیاهان (شاخساره و ریشه) در شرایط درون شیشه‌ای این موقعیت را فراهم می‌سازد که تولید این متابولیت‌های گیاهی تحت شرایط کنترل‌شده و در مدت زمان کوتاه‌تری انجام گیرد (۱۲،۹،۶). امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان از طریق کشت کالوس و سوسپانسیون و در شرایط کنترل شده، با توجه به ارزش اقتصادی این ترکیبات دارای اهمیت فراوانی است (۳). نقش عمده متابولیت‌های ثانوی محافظت گیاهان در برابر تنش‌های زیستی (حشرات، علف خوارها و عوامل بیماری زا) و غیرزیستی (خشکی، شوری و غیره) می‌باشد. بر پایه این اصل راهبردهای مختلفی در جهت القا و یا افزایش تولید این ترکیبات توسعه یافته که برخی شامل تیمار گیاهان و یا سلول‌های گیاهی با الیسیتورها، ترکیبات علامت‌دهنده[۱] و تنش‌های غیرزیستی است. در اغلب موارد، کاربرد این تیمارها در مطالعات گوناگون به طور موثری موجب بهبود عملکرد طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانوی در هر دو شرایط درون[۲] و برون بدنی[۳] گردیده است (۱۳). واکنش‌های مربوط به سیستم دفاعی القایی به دنبال تشخیص طیف وسیعی از عوامل شیمیایی که "الیسیتور" خوانده می‌شوند، تحریک می‌شود. الیسیتورها به‌طور معمول واکنش‌های دفاعی مختلفی از قبیل تولید گونه‌های اکسیژن فعال (رآس)[۴]، ایجاد واکنش فوق حساسیت[۵] و تجمع فیتوالکسین‌ها (مانند ترکیبات ثانوی آنتی باکتریایی) در گیاهان هدف القا می‌نمایند (۸،۷). در برخی موارد ترکیبات القا شده از ارزش اقتصادی بسیار زیادی برخوردارند که به‌عنوان مثال می‌توان از داروها، سموم و سایر ترکیبات مفید گیاهی نام برد.

در میان خانواده‌های گیاهی، نعناعیان، که با بیش از ۲۰۰ جنس و حدود ۵۰۰۰ گونه یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهی می باشد، دارای بیشترین گونه‌های گیاهی دارویی می‌باشند (۳). امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان از طریق کشت کالوس و سوسپانسیون و در شرایط کنترل شده، با توجه به ارزش اقتصادی این ترکیبات دارای اهمیت فراوانی است (۳). از جمله متابولیت‌های دارویی گیاهی مهم که در

1- Signaling compounds 2- *In vitro* 3- *In vivo* 4- Reactive oxygen species (ROS) 5- Hypersensitive

سال‌های اخیر به آن توجه بسیاری شده و خواص دارویی آن از قبیل اثرات مثبت آن بر آلزایمر و افسردگی مورد توجه قرار گرفته است، رزمارینیک اسید می‌باشد. بیوسنتز این ماده در گیاهان خانواده نعناعیان، گونه‌های گیاهی این خانواده را به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای تولید و افزایش بیوسنتز رزمارینیک اسید معرفی می‌کند. در بین گیاهان بومی ایران، گونه‌های متعددی از خانواده نعناعیان همچون گونه‌های سالویا و مرزه را می‌توان یافت که پتانسیل بالقوه‌ای را در تولید رزمارینیک اسید فراهم می‌کنند. در بین الیسیتورهای غیرزیستی، وانادیل سولفات شناخته‌شده‌ترین ترکیب غیر آلی وانادیوم است که به‌عنوان یک الیسیتور برای تحریک تولید و یا افزایش متابولیت‌های دارویی بکار می‌رود. این ترکیب، ماده‌ای جامد و آبی رنگ بوده که بشدت آبدوست می‌باشد و به‌دلیل دوام بالای آن، معروف‌ترین منبع وانادیوم در آزمایشگاه‌ها می‌باشد. یون وانادیوم، به‌عنوان یکی از پایدارترین یون‌های دو ظرفیتی شناخته می‌شود. تاکنون تحقیقات محدودی در رابطه با اثر انگیزندگی این ترکیب در افزایش متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سوسپانسیون سلولی انجام گرفته است. در تنها مطالعه انجام شده در مورد اثر وانادیل سولفات بر تولید رزمارینیک اسید، جورجیف و همکاران (۵) غلظت‌های ۷۵ و ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ میلی‌گرم در لیتر وانادیل سولفات را در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه اُسطوخودوس استفاده کردند. نتایج ایشان نشان داد که پس از چهار ساعت، وزن خشک نمونه‌ها در تمامی تیمارها نسبت به کنترل کاهش یافت که آن را به پاسخ دفاعی به تنش محیطی وارده نسبت دادند. در ادامه و پس از هشت ساعت، افزایش وزن‌خشک نمونه‌ها مشاهده شد تا جایی‌که غلظت‌های ۱۲/۵ و ۶/۲۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان رشد را به‌حساب وزن خشک از خود نشان دادند (دو تا شش درصد افزایش). آنها همچنین بیان کردند که وانادیل سولفات در تمامی غلظت‌های بکار رفته باعث افزایش بیوسنتز رزمارینیک اسید نسبت به شاهد گردید. بطورکلی در تحقیق حاضر اثر وانادیل سولفات (به عنوان یک الیسیتور غیر زیستی) بر روند جذب محیط کشت مایع بوسیله سلول‌های مرزه خوزستانی بررسی شد.

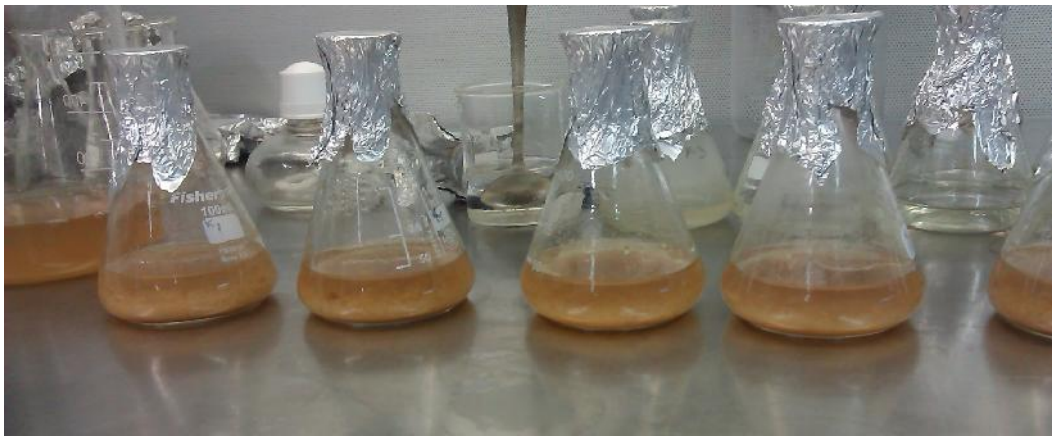
مواد و روش‌ها

کشت سوسپانسیون سلولی

در این آزمایش از سلول‌های بدست آمده از کشت سوسپانسیون سلولی مرزه خوزستانی پس از ۴ بار واکشت استفاده شد (۱۱). در همین خصوص، محیط کشت مایع بی–۵ (۴) دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازیین هیدرولیز شده و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر اِل–گلوتامین تهیه گردید. کازیین پیش از اوتوکلاو محیط کشت به آن اضافه شد اما به دلیل حساسیت گلوتامین به حرارت، محلول این ماده با فیلترهای میکروپور استریل و پس از ولرم شدن به محیط کشت اوتوکلاو شده، در زیر لامینار به آن اضافه شد. تنظیم‌کننده‌های رشدی انتخاب شده برای این آزمایش بی‌اِی در غلظت پنج میلی‌گرم در لیتر و آی‌بی‌اِی در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بود. غلظت‌های وانادیل سولفات صفر، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر اعمال گردید و پی‌اچ محیط کشت روی ۶ تنظیم شد. در پایان، محیط‌های آماده شده در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری توزیع شد (۲۰ میلی‌لیتر در هر ارلن) و درب ارلن‌ها بصورت کامل با پنبه استریل و فویل آلومینیوم بسته شد بنحوی که فویل تقریبا تمامی گردن ارلن را نیز پوشانده بود. اوتوکلاو در شرایط ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. برای شروع آزمایش، مقدار یک گرم سلول در شرایط کاملا استریل توزین و در ارلن‌ها ریخته شد. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد (شکل ۱). به منظور بررسی اثر وانادیل سولفات بر کشت سلولی مرزه خوزستانی دو آزمایش صورت گرفت.

در آزمایش نخست برای تعیین میزان مصرف محیط کشت توسط سلول‌ها، ارلن‌ها بفاصله هر دو روز تا روز هجدهم پس از کشت توزین شدند. در پایان وزن خشک و میزان رزمارینیک اسید آنها مورد بررسی قرار گرفت.

در آزمایش دوم تیمارهای وانادیل سولفات ۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر در روز سوم و یازدهم پس از واکشت اعمال و نمونه‌ها ۴۸ ساعت پس از آن برداشت شده و با شاهد مقایسه شدند. برای هر کدام از غلظت‌ها سه تکرار در نظر گرفته شد.



شکل ۱– سلول‌های مرزه خوزستانی در ابتدای مرحله تیمار با وانادیل سولفات

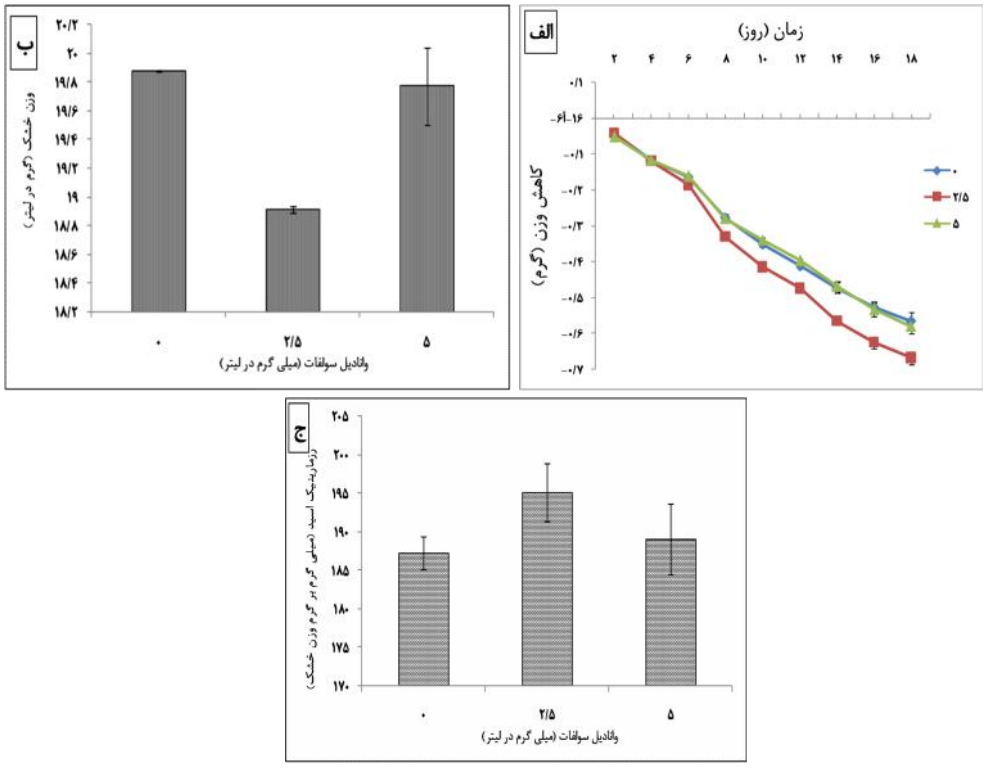
Figure 1. Cells of *Satureja khuzistanica* at the beginning of treatment stage with Vanadyl sulfate

اندازه‌گیری رزمارینیک اسید

برای اندازه‌گیری میزان تولید رزمارینیک اسید در کشت‌های سلولی مرزه خوزستانی، سلول‌های خشک شده (آون، دمای ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۶ روز) بوسیله بوته‌های چینی کاملا پودر شدند. سپس مراحل آماده سازی، استخراج و آنالیز رزمارینیک اسید بر اساس روش صحرارو و همکاران (۸) انجام گرفت.

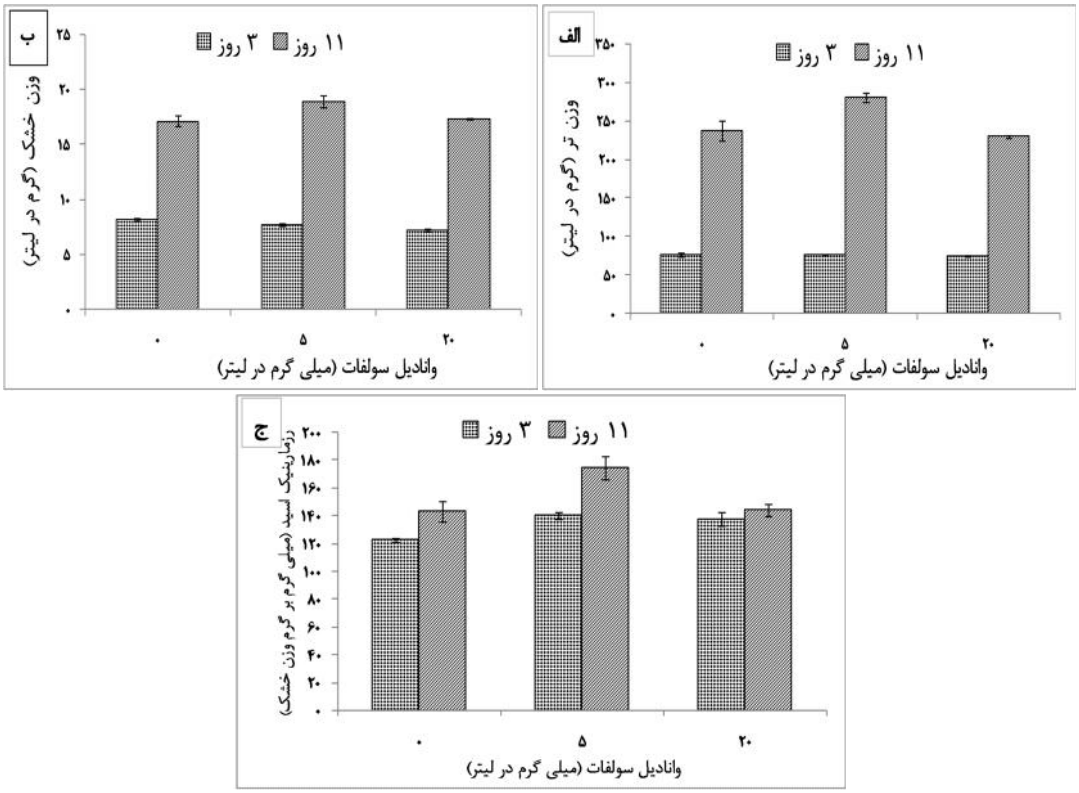
نتایج و بحث

در آزمایش نخست، با کاربرد وانادیل سولفات میزان مصرف محیط کشت توسط سلول‌های مرزه خوزستانی با توزین ارلن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. این فاکتور با کاهش وزن اندازه‌گیری شد. تیمار ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر وانادیل سولفات، بیشترین میزان کاهش وزن را نشان داد (شکل ۲-الف). به‌عبارت دیگر سلول‌های مرزه خوزستانی در این تیمار، بیشترین مصرف محیط کشت را داشته‌اند. تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی داری با شاهد نداشت. بیشترین کاهش وزن خشک در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. این در حالی بود که غلظت‌های ۰ و ۵ میلی‌گرم در لیتر وانادیل سولفات وزن خشک تقریبا برابری داشتند (شکل ۲- ب). الگوی تولید رزمارینیک اسید روندی متفاوت را نشان داد. بیشترین میزان بیوسنتز رزمارینیک اسید در تیمار ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد و تیمارهای صفر و ۵ میلی‌گرم در لیتر در رتبه بعدی قرار گرفتند (شکل ۲- ج). در آزمایش دوم که تیمارهای الیسیتور در زمان‌های متفاوت صورت گرفت و سپس سلول‌ها برداشته شدند نیز نتایج قابل توجهی بدست آمد. میزان رزمارینیک اسید، وزن تر و خشک سلول‌ها در ۱۱ روز پس از واکشت بیشتر از روز سوم دیده شد که بر اساس نتایج پیشین در رابطه با کشت سوسپانسیون سلولی مرزه خوزستانی دور از انتظار نبود. نکته دارای اهمیت این است که تیمارهای بکار رفته در ۱۱ روز پس از واکشت اثربخشی بهتری در مشخصه‌های اندازه‌گیری شده نسبت به روز سوم داشتند (شکل ۳- الف، ب و ج). بطور مثال مقادیر اندازه‌گیری شده برای کشت‌های سلولی تیمار شده با الیسیتور صفر، پنج و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر در سلول‌های سه روزه، ۸/۲، ۷/۷ و ۷/۲ گرم در لیتر وزن خشک (اختلاف کمترین تا بیشترین برابر با ۱ گرم) و ۱۲۲، ۱۴۰ و ۱۳۷ میلی‌گرم رزمارینیک اسید بر گرم وزن خشک (اختلاف کمترین تا بیشترین برابر با ۲۲ میلی‌گرم) بود ولی برای سلول‌های ۱۱ روزه، ۱۷، ۱۹ و ۱۷/۴ گرم در لیتر وزن خشک (اختلاف کمترین تا بیشترین برابر با ۲ گرم) و ۱۴۳، ۱۷۵ و ۱۴۴ میلی‌گرم رزمارینیک اسید بر گرم وزن خشک (اختلاف کمترین تا بیشترین برابر با ۳۲ میلی‌گرم) بدست آمد (شکل ۳- ب و ج).



شکل ۲- تأثیر وانادیل سولفات بر کشت سوسپانسیون سلولی مرزه خوزستانی: الف) میزان کاهش وزن محیط کشت (مصرف محیط کشت) توسط سلول‌های مرزه خوزستانی در یک دوره کشت ۱۸ روزه، ب) اثر وانادیل سولفات بر وزن خشک سلول‌ها و ج) اثر وانادیل سولفات بر بیوسنتز رزمارینیک اسید

Figure 2. Effect of Vanadyl sulfate on cell culture of *Satureja khuzistanica*; a) Weight loss of medium (consumption of medium) by cells of *Satureja khuzistanica* in a 18-day period, b) Effect of Vanadyl sulfate on cell dry weight, g) Effect of Vanadyl sulfate on biosynthesis of rosmarinic acid



شکل ۳- اثر غلظت و زمان کاربرد وانادیل سولفات بر وزن تر (الف)، وزن خشک (ب) و بیوسنتز رزمارینیک اسید (ج) در سلول‌های مرزه خوزستانی

Figure 3. Effect of Vanadyl sulfate concentration and time of application on; a) Fresh weight, b) Dry weight, g) biosynthesis of rosmarinic acid in cells of *Satureja khuzistanica*

همچنین تیمار با وانادیل سولفات در سه روز پس از واکشت اثر چندانی بر وزن‌تر سلول‌ها نداشت ولی وزن خشک به تدریج کاهش و میزان رزمارینیک اسید نیز نسبت به شاهد افزایش نشان داد. این درحالی‌ست که در فاصله ۱۱ روز پس از واکشت تیمارها اثر مشهودتری از خود نشان دادند بطوریکه بیشترین میزان شاخص‌های اندازه‌گیری شده در تیمار پنج میلی‌گرم در لیتر وانادیل سولفات دیده شد ولی تیمار ۲۰ میلی‌گرم در لیتر تفاوتی معنی‌داری با شاهد نشان نداد (شکل ۳- الف، ب و ج).

وانادیل سولفات شناخته شده‌ترین ترکیب غیرآلی وانادیوم است. یون وانادیوم، به‌عنوان یکی از پایدارترین یون‌های دو ظرفیتی شناخته می‌شود. تاکنون تحقیقات محدودی در رابطه با اثر انگیزندگی این ترکیب در افزایش متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سوسپانسیون سلولی انجام گرفته است. کازیدو و همکاران (۲) طی آزمایشی تاثیر کاربرد وانادیل سولفات را بر افزایش بیوسنتز پاکلیتاکسل و باکاتین سه[1] در کشت سوسپانسیون سلولی نوعی سرخدار مورد مطالعه قرار دادند (۲). غلظت‌های انتخابی ۰/۱ و ۰/۰۵ میلی‌مولار بود که قبل از اوتوکلاو به محیط کشت‌های سوسپانسیون سلولی اضافه گردید. برداشت داده‌ها به فاصله هر دو روز و تا روز ۲۶ ادامه داشت. ایشان بیان نمودند که حضور وانادیل سولفات در محیط کشت سوسپانسیون سلولی، باعث افزایش رشد سلولی خواهد شد چرا که وزن خشک تیمارهای حاوی وانادیل سولفات از وزن خشک شاهد در طول دوره ۲۶ روزه (بخصوص در اواخر دوره) بیشتر شد. همچنین در بین غلظت‌های بکار رفته، غلظت ۰/۱ میلی‌مولار افزایش رشد بیشتری را نسبت به غلظت ۰/۰۵ نشان داد. از طرفی میزان بیوسنتز ترکیبات هدف، در غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار وانادیل سولفات از غلظت ۰/۱ میلی‌مولار و شاهد بیشتر بود. غلظت ۰/۱ میلی‌مولار وانادیل سولفات کمترین میزان پاکلیتاکسل و باکاتین سه را به‌خود اختصاص داد. همچنین جورجیف و همکاران (۵)، غلظت‌های ۷۵ و۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ میلی‌گرم در لیتر وانادیل سولفات در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه اسطوخودوس را مطالعه کردند. نتایج ایشان نشان‌داد وزن خشک نمونه‌ها پس از ۸ ساعت رو به افزایش نهاد تا جاییکه غلظت‌های ۱۲/۵ و ۶/۲۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان رشد را به از خود نشان دادند (دو تا شش درصد افزایش). از طرف دیگر، در غلظت‌های بالا (۷۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، وزن خشک نمونه‌ها نسبت به شاهد کاهش یافت. آنها همچنین بیان کردند که وانادیل سولفات در تمامی غلظت‌های بکار رفته باعث افزایش بیوسنتز رزمارینیک اسید نسبت به شاهد شد. تیمار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر وانادیل سولفات بیشترین

1- Baccatin III

میزان افزایش تولید را به‌خود اختصاص داد بطوریکه ۴۸ ساعت پس از شروع تیمار ها، ۳/۹ گرم در لیتر رزمارینیک اسید از نمونه‌های سلولی بدست آمد که این مقدار ۲/۸ برابر نمونه‌های شاهد بود. در این دو آزمایش نیز همانطور که گفته شد سلول‌های تیمار شده با وانادیل سولفات افزایش وزن‌تر و خشک و افزایش بیوسنتز رزمارینیک اسید را نسبت به سلول‌های شاهد نشان دادند. پیشتر گفته شد که اختلاف بین مشخصه‌های اندازه‌گیری شده در فاصله ۱۱ روز پس از واکشت بیشتر از داده‌های برداشت شده در تیمار ۳ روز بود. یکی از دلایلی که می‌توان به آن اشاره کرد این است که سلول‌ها در روزهای نخستین پس از واکشت هنوز تحت تاثیر واکشت بوده و تا سازگاری به شرایط جدید به زمان نیاز دارند ولی در فاصله ۱۱ روز پس از واکشت سلول‌هایی وجود دارند که با شرایط کشت سازگار شده و در رشد کامل به سر می‌برند بنابراین به تنش‌های بیرونی واکنش بهتری نشان می‌دهند.

الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی ابزارهایی در دست پژوهشگران بیوتکنولوژی می‌باشند که افزایش تولید متابولیت‌های دارویی مهم مانند رزمارینیک اسید را در پی دارند. در این پژوهش، ماده وانادیل سولفات به‌عنوان یک الیسیتور غیرزیستی در کشت سوسپانسیون سلولی مرزه خوزستانی بکار رفت و نتایج قابل توجهی نشان داد. این ماده در غلظت‌های متفاوت توانست زی‌توده خشک را در حد شرایط نرمال نشان دهد و از طرف دیگر افزایش بیوسنتز ماده دارویی رزمارینیک اسید را نیز در پی داشته باشد. همچنین با مقایسه هر دو آزمایش می‌توان گفت تیمار با وانادیل سولفات در تمام طول دوره اثربخشی کمتری نسبت به تیمار در زمان خاص دارد. از طرفی درزمان‌های بکار رفته نیز، کاربرد این الیسیتور در ۱۱ روز پس از واکشت نتیجه بهتری را در تولید و بهره‌وری کشت‌های سوسپانسیون سلولی مرزه خوزستانی داشته و از بین غلظت‌ها نیز غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر موثرتر واقع شده است. بنابراین می‌توان کاربرد این ماده را در کشت‌های سوسپانسیون سلولی مرزه خوزستانی برای تولید رزمارینیک اسید سفارش کرد.

منابع

1. Baravardi, H., G.A. Ranjbar and S. Kamali Farah Abadi. 2015. Comparison of amount of callus induction in *Juniperus Excelsa* on MS and WPM culture media using different concentration of NAA, 2,4-D and Kin. Journal of Crop Breeding, 7(16): 149-157.
2. Cusido, R.M., J. Palazon, A. Navia-Osorio, A. Mallol, M. Bonfill and C. Morales. 1999. Production of taxol and baccatin III by a selected *Taxus baccata* line and its derived cell suspension culture. Plant Science, 146(2): 101-107.
3. Elyasi, L., A.A. Mehrabi, M. Seyedi and Z. Safari. 2016. Optimization of callus culture of *Satureja Bachtiarica* L. using different explants and concentrations of growth regulators. Journal of Crop Breeding, 8(20): 124-132.
4. Gamborg, O.L., R.A. Millerm and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158.
5. Georgiev, M., S. Kuzeva, A. Kovacheva, E. Pavlov and M. Ilieva. 2006. Enhanced Rosmarinic Acid Production by *Lavandula vera* MM Cell Suspension Culture through Elicitation with Vanadyl Sulfate. Zeitschrift fur Naturforschung, 61: 241-244.
6. Golchoubian, S., G. Ranjbar and S.K. Kazemitabar. 2011. *In Vitro* Micro Propagation of *Aloe vera* L. Journal of Crop Breeding, 3(7): 71-78
7. Montesano, M., G. Brander and E. TapioPalva. 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. Molecular Plant Pathology, 4(1): 73-79.
8. Nürnberger, T. 1999. Signal Perception in Plant Pathogen Defense. Cellular and Molecular Life Sciences, 55: 167-182.
9. Ravishankar, G.A. and L.V. Venkataraman. 1993. Role of plant cell culture in food biotechnology: current trends, limitations and future prospects. In: Prakash J, Pierik RLM, editors. Plant biotechnology: commercial prospects and problems. New Delhi: Oxford IBH Press, 255-274.
10. Sahraroo, A., M. Babalar, M.H. Mirjalili, M.R. Fattahi Moghadam and S. Nejad Ebrahimi. 2014. *In vitro* callus induction and rosmarinic acid quantification in callus culture of *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae). Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 13(4): 1445-1454
11. Sahraroo, A., M.H. Mirjalili and P. Corchete. 2013. Production of rosmarinic acid in cell culture of *Satureja khuzistanica*. XIII Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal, 182 pp., Lisbon, Portugal.
12. Vanisree, M., C.Y. Lee, S.F. Lo, S.M. Nalawade, C.Y. Lin and H.S. Tsay. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Botanical Bulletin, 45: 1-22.
13. Zhao, J., L.C. Davis and R.Verpoorte. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances, 23: 283-333.

Effects of Vanadyl Sulfate on Media Consumption by *Satureja khuzistanica* Cells and Rosmarinic Acid Biosynthesis

Amir Sahraroo[1], Abdolkarim Zarei[2], Mohammad Hossein Mirjalili[3], Vahid Akbarpoor[4] and Purificación Corchete[5]

1- Assistant Professor, Department of Horticulture, University of Guilan
2- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Jahrom University
3- Associate Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University
4- Assistance Professor, Department of Horticulture, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
5- Professor, Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, University of Salamanca, E-37007 Salamanca, Spain

Received: 21 November 2015 Accepted: 21 December 2016

Abstract

Application of biotechnology for production and enhancing of important secondary metabolite by plant cell cultures and elicitors is one of the most noteworthy researches by scientists. This research was carried out with the aim of analysis the effects of Vanadyl Sulfate (abiotic elicitor) on media consumption by *Satureja khuzistanica* cells under suspension culture. Cells obtained after four subcultures from suspension culture of *Satureja khuzistanica* used in the present study. B5 liquid medium containing 5 $mg.l^{-1}$ BA (benzyl adenine) and 1 $mg.l^{-1}$ IBA (Indole-3-butyric acid) were prepared. Three levels of Vanadyl Sulfate (0, 2.5 and 5 $mg.l^{-1}$) were analyzed. According to results, the highest consuming rate of culture media and the lowest cell dry weight obtained by 2.5 $mg.l^{-1}$ Vanadyl sulfate. Furthermore, concentration of 5 $mg.l^{-1}$ showed approximately equal content of dry biomass compared to the control condition. The maximum biosynthesis of rosmarinic acid was obtained by cells in media containing 2.5 $mg.l^{-1}$ Vanadyl sulfate. These results showed that application of Vanadyl sulfate have positive effects on biosynthesis of rosmarinic acid. Altogether application of different concentrations of Vanadyl sulfate as an abiotic elicitor in *Satureja khuzistanica* showed a normal dry matter production; while rosmarinic acid was increased. Therefore, application of this elicitor in suspension culture of *Satureja khuzistanica* is suggested to increase rosmarinic acid production.

Keywords: Biomass, Cell suspension, Elicitor, Plant metabolite