

The effect of Rosmarinic acid on glycine betaine, carbohydrate and protein pattern changes of potato (*Solanum tuberosum* L.) callus under *in vitro* condition

Hoda Eskandari¹, Ali Akbar Ehsanpour^{1*}, Naeimeh Al Mansour²

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

² Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, Kuwait University, Kuwait

Abstract

Salt stress is one of the most destructive abiotic stress which affects compatible osmolytes and protein pattern. In the current study, the effect of rosmarinic acid as a polyphenolic quencher on compatible solutes such as glycine betaine, total carbohydrates and protein, Na⁺ and K⁺ and fresh weight were determined to evaluate osmotic adjustment as a stress tolerance mechanism in *Solanum tuberosum* L. c.v. White Desire *in vitro* condition. In the other experiments, SDS-PAGE was performed to verify feasible hypothesis of ameliorative effects of RA on biosynthesis of proteins. *In vitro*-grown cells of potato were incubated on Murashige and Skoog (MS) medium containing 0, 20, 40, and 60 mg/L RA and 0, 90, and 120 mM NaCl. Data showed increase in fresh weight in 120 mM-stress calli pretreated with rosmarinic acid compare to 120 mM stressed calli. Carbohydrate content increased notably by using RA in exposure to NaCl. The results showed a significant increase in glycine betaine in 90 mM NaCl +20 mg/L RA treated calli compared with 90 mM NaCl-stressed calli. There was a notable increase in contents of Na⁺ and decline in K⁺ content in *in vitro* calli cells grown under 90 and 120 mM salt levels. Interestingly, K⁺ contents in RA-treated calli cells were remarkably higher than Na⁺ contents. However, no pronounced changes in K⁺/Na⁺ ratio were observed. Data showed that *in vitro* RA-treated calli responded rapidly to external RA supplement showing higher proteins contents compared to controls. SDS-PAGE data indicated a positive impact of RA on protein pattern. *In vitro* calli cells treated with 20 and 60 mg/l RA showed the induction of 2 new protein bands with approximately 50 KD while, 3 protein bands with approximately 16, 17 and 25 KD were down-regulated by RA. Consequently, data presented in the current study indicated a positive link between salt tolerance and improved metabolites biosynthesis in potato White Desire following RA treatment.

Keywords: Carbohydrate, Glycine betaine, Na⁺ and K⁺, Rosmarinic acid, Salt stress.

* Corresponding Author: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

اثر رزمارینیک اسید بر گلايسين بتائين، کربوهیدرات و تغيير الگوی پروتئين در کالوس سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) در تنش شوری در شرایط کشت در شیشه

هدی اسکندری^۱، علی اکبر احسانپور^{۱*}، نعيمة المنصور^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه کویت، کویت

چکیده

تنش شوری یکی از تنش‌های مخرب زیستی اثرگذار بر میزان اسمولیت‌های سازگار و الگوی پروتئینی است. در پژوهش حاضر اثر رزمارینیک اسید که نوعی آنتی‌اکسیدان است بر میزان وزن تر، گلايسين بتائين، کربوهیدرات، عناصر سدیم و پتاسیم، پروتئين کل و الگوی پروتئینی کالوس‌ها بررسی شد. بدین منظور، کالوس‌های سیب‌زمینی رقم وایت دزیره در تیمار رزمارینیک اسید (صفر تا ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر) و سدیم کلرید (صفر تا ۱۲۰ میلی‌مولار) قرار گرفت. نتایج نشان دادند کالوس‌ها در تیمار رزمارینیک اسید و نمک، وزن تر و کربوهیدرات بیشتری نسبت به کالوس‌های قرار گرفته در تیمار نمک تنها داشتند. میزان گلايسين بتائين در حضور رزمارینیک اسید (۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) در تنش شوری متوسط (۹۰ میلی‌مولار) به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌های رشد یافته در ۹۰ میلی‌مولار نمک افزایش پیدا کرد؛ هرچند در شوری ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار به میزان معنی‌داری میزان عنصر سدیم افزایش و پتاسیم کاهش یافت، در حضور رزمارینیک اسید، میزان عنصر پتاسیم افزایش و عنصر سدیم کاهش یافت. میزان پروتئين نیز در حضور رزمارینیک اسید به‌طور معناداری افزایش پیدا کرد. بررسی الگوی پروتئینی اثر مثبت رزمارینیک اسید را بر ایجاد دو پروتئين جدید در محدوده ۵۰ کیلوالتون نشان داد و تغییر بیان پروتئين‌ها را در محدوده ۱۶، ۱۷ و ۲۵ کیلوالتون تأیید کرد. به‌طور کلی، رزمارینیک اسید با افزایش تجمع پروتئين و کربوهیدرات محلول، کاهش میزان سدیم در سلول و تغییر الگوی پروتئینی، آثار فیزیولوژیک و بیوشیمیایی خود را بر سلول‌های کالوس سیب‌زمینی در تنش شوری نشان داد.

واژه‌های کلیدی: تنش شوری، رزمارینیک اسید، سدیم و پتاسیم، کربوهیدرات، گلايسين بتائين

مقدمه

تنش شوری یکی از تنش‌های مخرب غیرزیستی است که به تجمع بیش از حد نمک در گیاه و در نتیجه ممانعت از رشد و نمو سلول و از دست دادن فشار تورگر و تغییراتی در دیواره سلولی منجر می‌شود (Munns and Tester 2008). همچنین یون‌هایی مانند سدیم و کلر هموستازی یونی درون سلولی را با کاتیون‌های ضروری برای فعالیت‌های متابولیک مانند پتاسیم، منیزیم و کلسیم بر هم می‌زنند. تراوش یونی به افزایش درخور توجه سدیم نسبت به پتاسیم، منیزیم و کلسیم منجر می‌شود که به غیرفعال کردن آنزیم‌های سیتوسولی، ممانعت از تقسیم مریستم رأسی و اختلال در عملکرد دستگاه‌های فتوسنتزی منتهی می‌شود (James et al. 2006). پاسخ دفاعی بسیاری از گیاهان به تنش شوری، کاهش رشد و محصول‌دهی است. علاوه بر این، قرار گرفتن طولانی مدت سلول در معرض شوری، تولید گونه‌های اکسیژن فعال یا ROS (Reactive oxygen Species) را القا می‌کند که خود تخریب پروتئین‌ها، لیپیدهای غشایی، DNA و متابولیت‌ها، پراکسیداسیون لیپید و در نهایت مرگ سلول را موجب می‌شود.

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) چهارمین محصول از نظر میزان تولید در جهان است که بیشترین اهمیت را بین محصولات غذایی غیرغلات دارد (Pino et al. 2007). این گیاه گونه‌ای نیمه حساس به شوری طبقه‌بندی شده است؛ با وجود این، غلظت ۵۰ میلی مولار سدیم کلرید به کاهش رشد این گیاه و کاهش

محصول تا ۵۰ درصد منجر می‌شود و در غلظت بیشتر نمک (۱۵۰ میلی مولار) رشد گیاه به طور کامل ممانعت می‌شود (Hmida-Sayari et al. 2005).

روش کشت بافت به خوبی برای انتخاب نسل‌های سلولی مقاوم به شوری و به دنبال آن باززایی گیاه با تحمل به شوری بیشتر، استفاده شده است (Ochatt et al. 1998; Miki et al. 2001). پژوهش‌های متعدد انجام شده بر *S. tuberosum* نشان‌دهنده وجود ارتباط بین تحمل به شوری و دفاع سیستم آنتی‌اکسیدانی است که نشان می‌دهد القای دفاع آنتی‌اکسیدانی جزئی از سازوکار تحمل به شوری در این گیاه به شمار می‌رود (Benavides et al. 2000). تجمع اسمولیت‌های سازگار مانند بتائین‌ها، آمینواسیدها و قند تری هالوز یکی از سازوکارهای تحمل به تنش اسمزی به شمار می‌رود که در بیشتر گیاهان وجود دارد (Bohnert et al. 1995). این تنظیم‌کنندگان اسمزی بر اثر تجمع در سلول، اختلاف اسمزی میان اطراف سلول و سیتوپلاسم را متعادل و پروتئین‌ها و غشاهای سلول را از واسرشت شدن محافظت می‌کنند (Queiros et al. 2007).

تجمع گلاسیسین بتائین در گیاهان عالی که به طور طبیعی از تجمع‌دهندگان این ترکیب هستند، در پاسخ به تنش شوری، خشکی و سرما به طور گسترده گزارش شده است (Hussain Wani et al. 2013). برخی از گونه‌های گیاهان مقادیر اندکی گلاسیسین بتائین دارند؛ اما بر اثر قرارگیری در معرض تنش مقادیر بیشتری از گلاسیسین بتائین را در خود تجمع می‌دهند (Storey et al. 1977)؛

در پژوهش حاضر کوشش می‌شود اثر رزمارینیک اسید که مادهٔ فنلی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است بر توده سلولی بدون تمایز کالوس‌های سیب‌زمینی، مدل قرار گرفته در تنش شوری، بررسی شود تا سازوکارهای مقابله با شوری و نقش تنظیم‌کنندگی رزمارینیک اسید بر رشد سلول، تجمع متابولیت‌های ثانویه و تغییرات الگوی پروتئینی بهتر درک شوند.

مواد و روش‌ها

کشت کالوس و تیمار با رزمارینیک اسید و سدیم کلرید: گیاهچه‌های سیب‌زمینی رقم وایت دزیره موجود در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه اصفهان در محیط کشت (Murashige MS (Murashige and Skoog 1977) و تکثیر داده شدند؛ سپس قطعات برگ گیاهان تازه و جوان به ابعاد تقریبی یک سانتی‌متر مربع جدا شدند و برای ایجاد کالوس‌های نسل اول به محیط کشت مولد کالوس یعنی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون‌های 2, 4-D، NAA (نفتالن استیک اسید) و کایتین انتقال داده شدند. پس از چند هفته کالوس‌های نسل اول ظاهر شدند. کالوس‌های نسل اول دوباره برای تکثیر به محیط کشت مولد کالوس جدید انتقال داده و کالوس‌های نسل دوم ایجاد شدند؛ سپس کالوس‌های نسل دوم در محیط کشت مولد کالوس حاوی رزمارینیک اسید با غلظت‌های صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر و سدیم کلرید با غلظت‌های صفر، ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار قرار گرفتند. پس از سه هفته شاخص‌های مختلف

در حالی که در بسیاری از گونه‌های گیاهی، در شرایط طبیعی یا تنش، گلايسين بتائين تجمع داده نمی‌شود؛ از این رو بررسی تغییرات میزان گلايسين بتائين در کالوس‌های سیب‌زمینی قرار گرفته در تیمار موضوع جالبی برای مطالعه است.

رزمارینیک اسید، استر کافنیک اسید و ۳ و ۴ دی‌هیدروکسی فنیل استیک اسید است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارد (Hao *et al.* 2014). این ماده در بسیاری از گیاهان عالی، برخی از گونه‌های سرخس، شاخ‌واش‌ها، اعضای خانواده Boraginaceae و زیرخانواده *Nepetoideae* از *Lamiaceae* یافت شده است (Petersen and Simmonds 2003; Koca *et al.* 2006; Park *et al.* 2012; Song *et al.* 2008). سرکوب‌کنندهٔ رزمارینیک اسید در حذف یا کاهش تنش اکسیداتیو القا شده بر اثر شوری به خوبی مشخص شده است. همچنین اثر ضد آپوپتوزی یا مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ سلول این ماده بر سیستم‌های جانوری اثبات شده است (Xu *et al.* 2016). علاوه بر این به خاصیت ضدپیری این ماده در سلول‌های جانوری، انسان‌ها و در معدودی از پژوهش‌های گیاهی به‌طور ویژه توجه شده است (Ahmad *et al.* 2013)؛ اما اثر آنتی‌اکسیدانی آن بر سلول‌های گیاهی در معرض تنش هنوز بررسی نشده است. از آنجا که سیب‌زمینی گیاه زراعی مدل است و از سوی دیگر بررسی اثر رزمارینیک اسید در سطح سلولی مطالعه نشده است، پاسخ توده سلولی بدون تمایز کالوس سیب‌زمینی، پاسخ‌های سلول گیاهی را به رزمارینیک اسید به خوبی نشان می‌دهد.

Scientific، انگلستان) خوانده شد. میزان کربوهیدرات کل کالوس با نمودار استاندارد گلوکز (میکروگرم بر میلی‌لیتر) محاسبه و با احتساب جرم مولکولی گلوکز ۱۸۰/۱۵۵ برحسب میکرومول بر گرم وزن تر گزارش شد.

اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم: برای اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم، از روش تغییر یافته Wet ashing استفاده شد. بدین منظور، ۳۰ میلی‌گرم از پودر خشک کالوس‌های سیب‌زمینی با ۱۰ میلی‌لیتر محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این مدت نمونه‌ها خارج و در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند؛ سپس از روشناور حاصل برای اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم با دستگاه شعله‌سنج نوری (مدل Essex-corning 410، شرکت Halstead، انگلستان) استفاده شد. میزان عناصر سدیم و پتاسیم با نمودار استاندارد رسم شده برای این دو عنصر، محاسبه و بر حسب میلی‌مول بر گرم بافت خشک کالوس گزارش شد.

سنجش و اندازه‌گیری گلاسیین بتائین: اندازه‌گیری گلاسیین بتائین براساس روش Grieve و Grattan (۱۹۸۳) انجام شد. در این روش ابتدا ۲۵ میلی‌گرم بافت خشک کالوس با ۱ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر هموژن شد؛ سپس محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر نگهداری شد. روز بعد نمونه‌ها صاف و به نسبت ۱:۱ با یدور پتاسیم (KI-I₂) سولفوریک اسید ۲ نرمال رقیق شدند و به مدت ۱ ساعت روی یخ قرار داده شدند؛ سپس ۰/۲ میلی‌لیتر معرف یدور

فیزیولوژیک و بیوشیمیایی کالوس‌های قرار گرفته در تیمار اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری وزن تر کالوس: ابتدا پلیت‌های حاوی محیط کشت به‌طور جداگانه توزین شدند. برای جلوگیری از آلوده شدن کالوس‌ها پس از انتقال کالوس‌ها به پلیت‌های حاوی محیط کشت، پلیت‌ها دوباره توزین شدند و با این روش وزن ابتدایی کالوس‌ها به دست آمد. پس از گذشت سه هفته، کالوس‌ها از محیط کشت خارج شدند و وزن تر ثانویه آنها اندازه‌گیری شد؛ سپس با کم کردن وزن تر اولیه کالوس از وزن ثانویه آن، وزن تر کالوس‌ها به دست آمد.

اندازه‌گیری کربوهیدرات محلول: کربوهیدرات‌های محلول با روش آنترون (Yemm and Willis 1954) اندازه‌گیری شدند. بدین منظور، ۰/۳ گرم از کالوس‌های تازه در ۴ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار که pH آن ۷ بود با هموژنایزر (مدل T25 D digital ULTRA، شرکت TURRAX®، IKA®، کشور آلمان) به خوبی هموژن شد؛ سپس مخلوط حاصل در دور ۵۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و روشناور حاصل روی یخ نگهداری شد. آزمون آنترون برای کربوهیدرات‌ها بر مخلوط ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های رقیق شده با ۴ میلی‌لیتر از معرف آنترون انجام شد. لوله‌های آزمایش حاوی نمونه به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. پس از ایجاد رنگ، نمونه‌ها خنک شدند و جذب آنها در طول موج ۶۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (مدل Genesyst 5، شرکت Thermo Fisher

باتوجه به راهنمای موجود در کیت BSA Protein Assay (شرکت Thermo Scientific، آمریکا) پروتئين های موجود در عصاره سلولی در طول موج ۵۲۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان پروتئين های محلول براساس نمودار استاندارد BSA برای هر نمونه به دست آمد و براساس میلی گرم بر گرم وزن تر گزارش شد.

بررسی الگوی پروتئين ها با روش SDS-PAGE:

برای مقایسه الگوی پروتئين های موجود در کالوس های تیمار شده و نمونه های شاهد، ۱۵ میکرولیتر از عصاره پروتئينی حاصل از روش بالا با ۴ میکرولیتر از بافر بارگذاری پروتئين، حاوی ۱۰۰ میلی مولار احیاکننده دی تیوتريتول مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. عصاره های پروتئينی با نشانگر PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (شرکت Thermo Scientific، آمریکا) روی ژل با شیب غلظت ۴ تا ۱۲ درصد الکتروفورز و در پایان، ژل با رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی شد؛ سپس به مدت ۱۶ ساعت در محلول رنگ بر قرار داده شد و در نهایت با دستگاه ژل داگ (مدل EZ system، شرکت BioRad، آمریکا) مشاهده و تصویربرداری شد.

تحليل آماری: آزمایش ها براساس طرح کامل

تصافی با حداقل سه تکرار انجام شدند و داده ها با نرم افزار SPSS تحليل و میانگین داده ها با آزمون

پتاسیم سرد به نمونه ها اضافه شد و نمونه ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای صفر تا ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. مخلوط حاصل در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد محلول روشنآور با دقت و به آرامی جدا شد و کریستال های ته نشین شده پریدید اندکی با آب مقطر شسته شدند تا معرف رنگی موجود روی آن شسته شد؛ سپس کریستال های پریدید در ۱ میلی لیتر حلال ۱ و ۲ دی کلرواتان ورتکس شدند تا درون حلال حل شدند و رنگ قرمز ظاهر شد. محلول رنگی حاصل به مدت ۲ ساعت نگهداری و سپس جذب نمونه ها در طول موج ۳۶۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار گلايسين بتائين با نمودار استاندارد مربوط به گلايسين بتائين خالص، برحسب میکرومول بر گرم وزن خشک گزارش شد.

اندازه گیری پروتئين کل: برای بررسی میزان

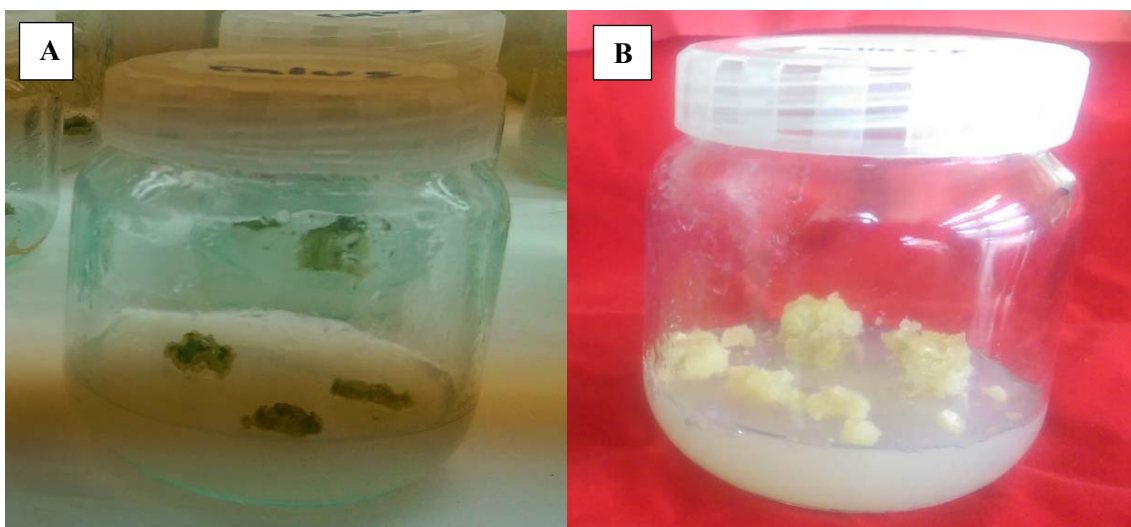
پروتئين های محلول در کالوس، ۰/۵ گرم کالوس تازه توزین و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده شدند؛ سپس در ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار با pH برابر با ۷/۸ حاوی ۱ میلی مولار EDTA، ۲ درصد پلی وینیل پلی پیرولیدین (PVP) و دی تیوتريتول (DTT) با غلظت ۴ میلی مولار با دستگاه Tissue lyser (شرکت QIAGEN، انگلستان) در دمای ۴ درجه سانتی گراد هموزن شد. عصاره های حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت دور ۱۶۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ و از روشنآور حاصل برای اندازه گیری پروتئين استفاده شد؛ سپس

دانکن در سطح ($P \leq 0.05$) ارزیابی شدند.

نتایج

پس از گذشت سه هفته از کشت قطعات برگ سیب‌زمینی در محیط کشت مولد کالوس، کالوس‌های نسل اول تولید شدند (شکل ۱-۱). پس

از انتقال دوباره کالوس‌های نسل اول به محیط کشت مولد کالوس به مدت پانزده روز کالوس‌های نسل دوم آماده و به محیط کشت حاوی تیمار رزمارینیک اسید و نمک منتقل شدند.



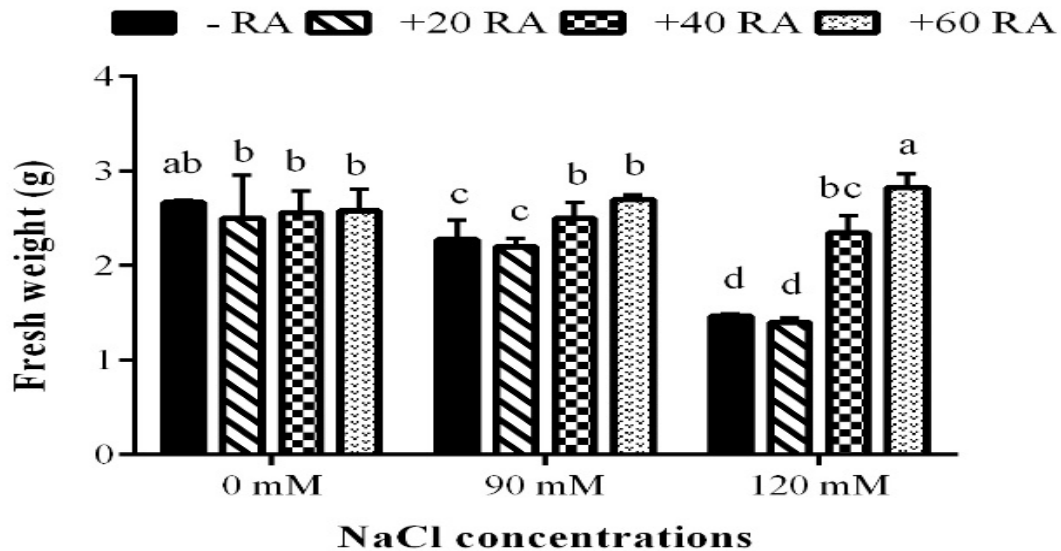
شکل ۱- مراحل تشکیل کالوس سیب‌زمینی نسل اول (A) و نسل دوم (B) در محیط کشت مولد کالوس

میزان کربوهیدرات محلول: اندازه‌گیری کربوهیدرات در کالوس‌های سیب‌زمینی نشان داد با افزودن رزمارینیک اسید به محیط کشت به‌طور معنی‌داری میزان کربوهیدرات کالوس افزایش می‌یابد. همچنین روند افزایشی در میزان کربوهیدرات با افزایش میزان نمک از صفر به ۱۲۰ میلی‌مولار نیز مشاهده شد. در حضور رزمارینیک اسید (۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر)، کالوس‌های رشدیافته در شوری ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار نیز به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌های رشدیافته در نمک تنها افزایش یافتند (شکل ۳).

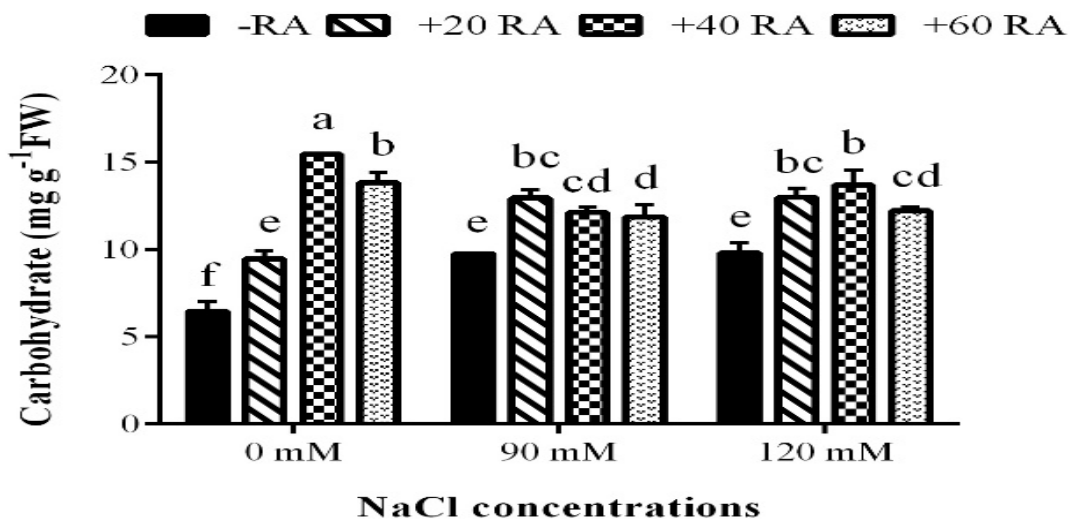
همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، رزمارینیک اسید به‌تنهایی اثر معنی‌داری بر وزن تر کالوس نداشت. در حضور نمک ۹۰ میلی‌مولار، تیمار با غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید نیز به افزایش معنی‌دار وزن تر کالوس نسبت به نمونه‌های رشدیافته در نمک ۹۰ میلی‌مولار منجر شد. همچنین در شوری زیاد (۱۲۰ میلی‌مولار)، تیمار رزمارینیک اسید (۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر) به افزایش معنی‌دار وزن تر کالوس نسبت به نمونه ۱۲۰ میلی‌مولار نمک بدون رزمارینیک اسید منجر شد.

میزان گلايسين بتائين: تجمع گلايسين بتائين در گونه‌های قرار گرفته در تنش نشانه تحمل به شوری

به شمار می‌رود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری گلايسين بتائين نشان دادند با افزایش شوری، تجمع



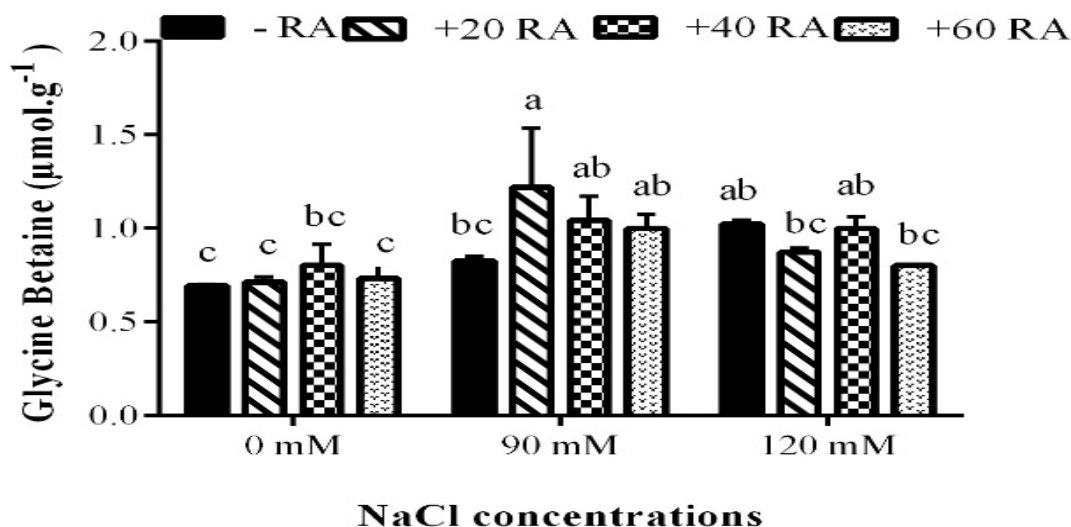
شکل ۲- میزان وزن تر کالوس‌های سیب‌زمینی در تیمار سدیم کلرید برحسب میلی‌مولار و تیمار رزمارینیک اسید (RA) برحسب میلی‌گرم بر لیتر- مقادیر میانگین سه تکرار \pm StD هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن هستند.



شکل ۳- میزان کربوهیدرات در کالوس‌های سیب‌زمینی در تیمار سدیم کلرید برحسب میلی‌مولار و تیمار رزمارینیک اسید (RA) برحسب میلی‌گرم بر لیتر- مقادیر میانگین سه تکرار \pm StD هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن هستند.

لیتر رزمارینیک اسید که نسبت به نمونه بدون رزمارینیک اسید (۹۰ میلی مولار نمک تنها) افزایش معناداری نشان داد؛ در نتیجه رزمارینیک اسید در شوری اندک، به افزایش معنادار گلیسین بتائین منجر شد (شکل ۴).

گلیسین بتائین در کالوس‌ها به طور معنی داری افزایش یافت. حضور رزمارینیک اسید در محیط کشت حاوی نمک، تغییر معناداری در میزان گلیسین بتائین در کالوس‌ها ایجاد نکرد بجز در غلظت ۹۰ میلی مولار نمک حاوی ۲۰ میلی گرم بر



شکل ۴- میزان گلیسین بتائین در کالوس‌های رشد یافته در تیمار نمک سدیم کلرید بر حسب میلی مولار و رزمارینیک اسید (RA) بر حسب میلی گرم بر لیتر - مقادیر میانگین سه تکرار \pm StD هستند. حروف متفاوت بیان کننده تفاوت معنی دار با آزمون دانکن هستند.

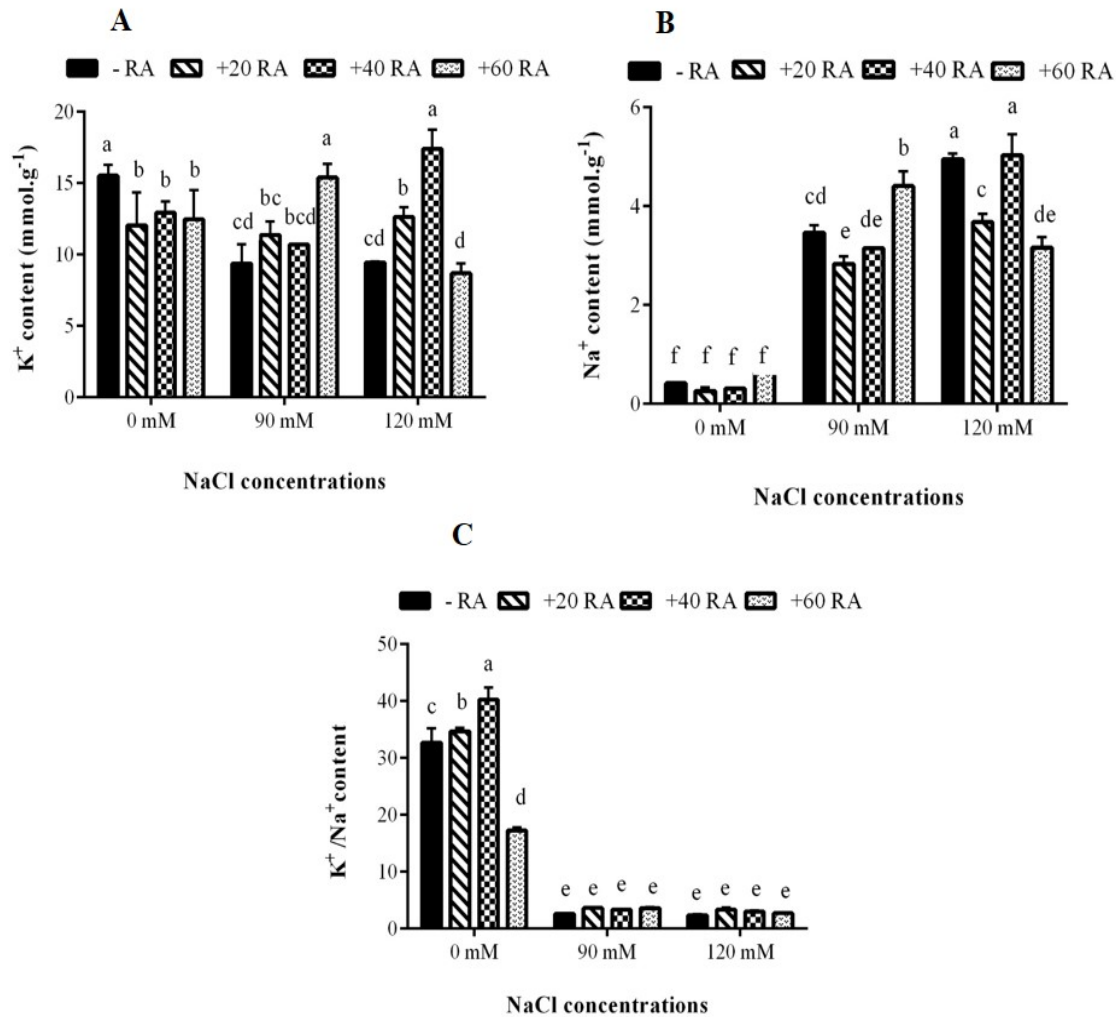
اسید کاهش معنی داری در میزان عنصر سدیم نشان داد.

میزان پتاسیم: با توجه به شکل ۵-B داده‌ها نشان دادند میزان سدیم در سلول‌های کالوس در تیمار شوری نسبت به سلول‌های کالوس شاهد (بدون نمک) افزایش معنی داری یافت؛ با وجود این در غلظت‌های ۹۰ و ۱۲۰ میلی مولار نمک، تیمار رزمارینیک اسید با غلظت ۲۰ و ۶۰ میلی گرم بر لیتر میزان سدیم را به طور معنی داری کاهش داد. میزان عنصر پتاسیم (شکل ۵-A) برخلاف یون سدیم با

میزان سدیم: برای بررسی مقادیر عناصر سدیم و پتاسیم در کالوس‌های قرار گرفته در تنش شوری در حضور رزمارینیک اسید، پس از سه هفته میزان این عناصر اندازه گیری شد. با توجه به شکل ۵-B، میزان عنصر سدیم به طور معنی داری بر اثر افزایش غلظت سدیم کلرید افزایش یافت. در حضور رزمارینیک اسید در غلظت‌های ۹۰ میلی مولار نمک حاوی ۲۰ میلی گرم بر لیتر رزمارینیک اسید و ۱۲۰ میلی مولار نمک حاوی ۲۰ و ۶۰ میلی گرم بر لیتر رزمارینیک

غلظت های ۹۰ میلی مولار نمک حاوی ۶۰ میلی گرم بر لیتر رزمارینیک اسید و ۱۲۰ میلی مولار نمک

افزایش میزان شوری به طور معناداری کاهش یافت؛ در حالی که در حضور رزمارینیک اسید و نمک، در



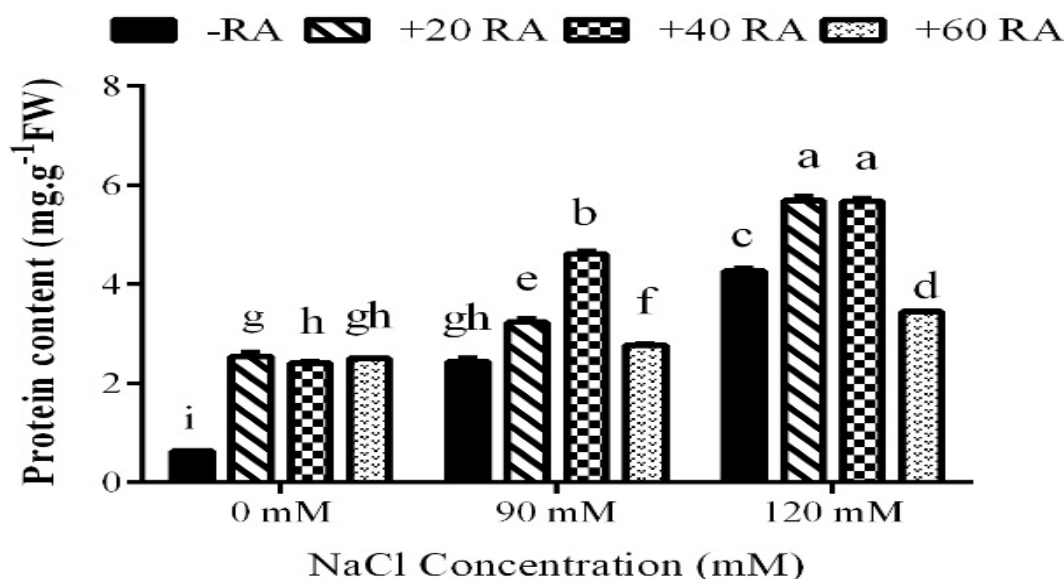
شکل ۵- میزان پتاسیم (A)، سدیم (B) و نسبت پتاسیم به سدیم (C) در کالوس های رشد یافته در تیمار نمک سدیم کلرید بر حسب میلی مولار و رزمارینیک اسید (RA) بر حسب میلی گرم بر لیتر- مقادیر میانگین سه تکرار \pm StD هستند. حروف متفاوت بیان کننده تفاوت معنی دار با آزمون دانکن هستند.

نمک افزایش یافت؛ در حالی که این نسبت در حضور نمک تغییر معنی داری نشان نداد (شکل ۵- C).

حاوی ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر رزمارینیک اسید، میزان عنصر پتاسیم به طور معنی داری افزایش یافت. به هر حال نسبت پتاسیم به سدیم در حضور رزمارینیک اسید (۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر) بدون

افزایش میزان شوری از ۹۰ به ۱۲۰ میلی‌مولار به‌طور معناداری افزایش پیدا کرد. قرار گرفتن کالوس‌های رشدیافته در شوری در حضور رزمارینیک اسید با غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر به افزایش میزان پروتئین در غلظت‌های ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار منجر شد. تنها غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار نمک حاوی ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید به کاهش میزان پروتئین منجر شد.

میزان پروتئین‌های محلول: پس از سه هفته، میزان پروتئین کالوس‌های سیب‌زمینی رشدیافته در محیط حاوی نمک و رزمارینیک اسید اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در شکل ۶ ملاحظه می‌شود حضور رزمارینیک اسید (۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط کشت افزایش ۲/۵ برابری را در میزان پروتئین کالوس‌ها نسبت به نمونه شاهد باعث شد. میزان پروتئین در کالوس‌های قرار گرفته در تنش با



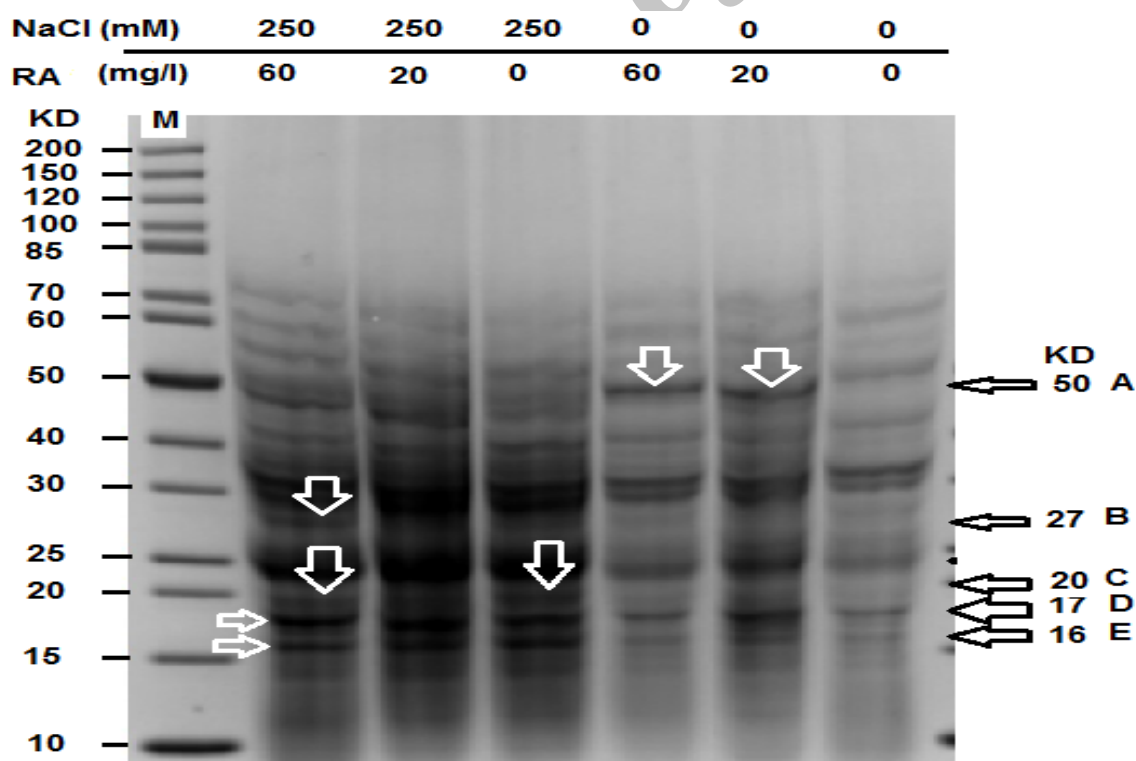
شکل ۶ - میزان پروتئین‌های محلول در کالوس‌های سیب‌زمینی شاهد، در تیمار نمک سدیم کلرید بر حسب میلی‌مولار و رزمارینیک اسید (RA) بر حسب میلی‌گرم بر لیتر - مقادیر میانگین سه تکرار \pm StD هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن هستند.

اسید برای الکتروفورز انتخاب شد. همان‌گونه که در شکل ۶ نشان داده شده است تغییرات محسوسی در باندهای برخی از پروتئین‌ها در حضور رزمارینیک اسید با غلظت ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شدند؛ برای نمونه در نمونه‌های رشدیافته در غلظت‌های ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک

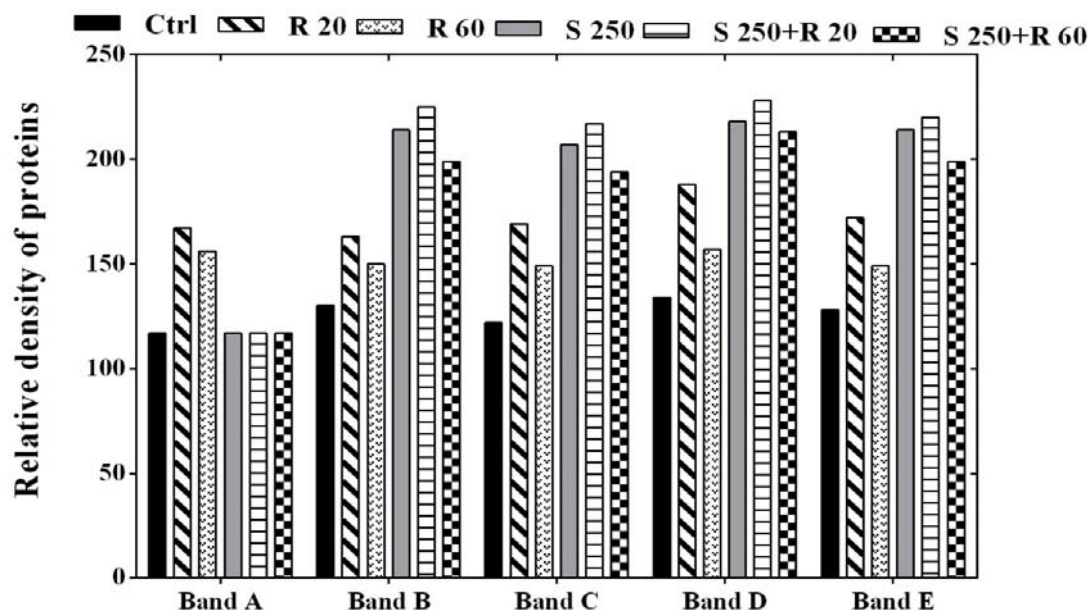
بررسی تغییر الگوی پروتئینی کالوس‌ها با روش SDS-PAGE: تغییرات الگوی پروتئینی کالوس‌های تیمار شده با ژل SDS-PAGE بررسی شدند. با توجه به اینکه نتایج غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید تقریباً یکسان بود، غلظت ۲۰، کمترین و ۶۰، غلظت زیاد رزمارینیک

شدند (شکل ۸)؛ سپس میزان تراکم نسبی این باندها با برنامه Image J تحلیل شد. در باندهای ردیف A در مقایسه با شاهد، افزایش تراکم پروتئين تنها در غلظت ۲۰ و ۶۰ میلی گرم بر لیتر رزمارینیک اسید بدون تنش نمک مشاهده شد؛ در حالی که همه باندهای ردیف‌های B تا E افزایش تراکم نسبی در تیمار رزمارینیک اسید به تنهایی یا با نمک ۲۵۰ میلی مولار نشان دادند. بیشترین میزان تراکم پروتئين در باندهایی مشاهده شد که نمک و رزمارینیک اسید به طور هم‌زمان به محیط کشت اضافه شده بودند.

اسید به طور چشمگیری دو پروتئين جدید نشان داده شده با پیکان با وزن مولکولی حدود ۵۰ کیلودالتون مشاهده شد. علاوه بر این، میزان بیان ۳ پروتئين نیز در محدوده وزن مولکولی تقریبی ۱۶، ۱۷ و ۲۵ کیلودالتون کاهش محسوس نشان داد (شکل ۷)؛ در حالی که همین پروتئين‌ها در تیمار نمک با غلظت ۲۵۰ میلی مولار با رزمارینیک اسید و بدون رزمارینیک اسید افزایش بیان در خورتوجهی نشان دادند (شکل ۷). برای بررسی تغییرات باندهای پروتئينی در تیمارهای مختلف نمک و رزمارینیک اسید، شاخص ترین تغییرات محسوس در باندهای پروتئينی شناسایی و با حروف A تا E نام گذاری



شکل ۷- الگوی الکتروفورزی پروتئين‌های کالوس سیبزمینی در تیمار نمک سدیم کلرید و رزمارینیک اسید (RA)؛ M (نشانگر پروتئينی، ۲۵۰ میلی مولار نمک و ۲۰ و ۶۰ میلی گرم بر لیتر رزمارینیک اسید) و پیکان‌ها (نشان دهنده تغییرات محسوس ترین باندهای پروتئينی)



شکل ۸- تراکم نسبی باندهای پروتئینی حاصل از SDS-PAGE در کالوس سیب‌زمینی در تیمار تنش شوری با سدیم کلرید (S) بر حسب میلی‌مولار و رزمارینیک اسید (R) بر حسب میلی‌گرم بر لیتر

and Almansa 2002; Flowers and Colmer (2015). کالوس‌های گیاه سیب‌زمینی یکی از مدل‌های خوب برای بررسی آثار مخرب تنش شوری در سطح سلولی هستند. در پژوهش حاضر، افزودن رزمارینیک اسید در تنش به افزایش وزن تر در شوری ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار منجر شد. در پژوهش Eskandari و همکاران (۲۰۱۷) نیز اثر مثبت رزمارینیک اسید بر بهبود شاخص‌های رشد در تنش شوری در گیاهچه‌های سیب‌زمینی به اثبات رسیده است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند تجمع اسمولیت‌ها در تنش‌های غیرزیستی گوناگون به‌طور مثبتی به تحمل تنش اکسیداتیو وابسته است (Anjum et al. 2012; Saeedipour 2013)؛ برای نمونه، تجمع کربوهیدرات‌ها در شرایط تنش پدیدهای رایج در محصولات زراعی است

بحث

توسعه محصولات مقاوم به شوری مهم‌ترین راهکار برای کاهش آثار مخرب تنش شوری به شمار می‌رود. درک پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیولوژیک گیاه دخیل در تنش شوری برای بهبود مقاومت گیاهان زراعی نسبت به تنش‌های غیرزیستی از جمله شوری به‌ویژه در سطح سلولی بسیار ضروری است (Hussain et al. 2009). از سوی دیگر، پژوهش‌های انجام‌شده در این زمینه با روش کشت در شیشه مدل روشی بسیار باارزشی هستند که در کوتاه‌مدت در فضای کم، نتایج و پاسخ‌های گیاه را در سلول نشان می‌دهند. با روش کشت‌بافت در زمان کوتاهی، حداقل به شیوه پاسخ‌دهی گیاه و احتمالاً راهکارهای استفاده‌شده گیاه در این پاسخ‌ها پی برده می‌شود (Hernández

فرضیه، سایر پژوهش‌های قبلی ما افزایش رزمارینیک اسید و گالیک اسید داخلی را که ترکیبات فنلی هستند بر اثر تیمار شوری و رزمارینیک اسید به‌خوبی اثبات کرده‌اند (Eskandari et al. 2017). علاوه‌براین، میزان پرولین، مهم‌ترین اسمولیت سازگار در تنش، نیز در سلول‌های سیب‌زمینی در تیمار رزمارینیک اسید به‌طور معنی‌داری در شوری ۱۲۰ میلی‌مولار همراه با ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید نسبت به نمونه‌های رشد یافته در ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نمک به‌تنهایی کاهش یافت که خود بیان‌کننده اثر تعدیل‌کنندگی رزمارینیک اسید بر تنش شوری است (داده‌ها ارائه نشده‌اند).

تجمع بیش از حد یون‌های سدیم و کلر به آسیب اکسیداتیو پروتئین‌های سیتوسولی ضروری از جمله آنزیم‌ها، متابولیت‌های اولیه، نوکلئیک اسیدها، آنزیم‌های فتوسنتزی، کوآنزیم‌های ترقی و لیپیدهای غشایی منجر می‌شود (Meloni et al. 2003). براساس نتایج پژوهش حاضر، در تنش شوری به‌صورت الگوی کلی، میزان تجمع سدیم در سلول‌ها با افزایش میزان نمک افزایش یافت و برعکس تجمع پتاسیم کاهش یافت؛ اما نکته جالب توجه اینست که در حضور رزمارینیک اسید میزان سدیم در کالوس‌های در معرض تنش کاهش و میزان یون پتاسیم به‌طور نسبی در مقایسه با تیمار نمک تنها افزایش یافت. از آنجا که بهبود نسبت پتاسیم به سدیم در گیاهان قرارگرفته در تنش شوری، سازوکاری برای تحمل به شوری به‌شمار می‌رود (Rahman et al. 2016)، همچنین به‌دلیل

(Martinez et al. 1996). در پژوهش حاضر نیز در تأیید پژوهش‌های قبلی، افزایش کربوهیدرات‌های محلول بر اثر افزایش تنش شوری به‌تنهایی و همچنین در کالوس‌های در معرض تنش و در حضور رزمارینیک اسید در همه غلظت‌ها مشاهده شد که یکی از سازوکارهای تحمل به شوری به‌شمار می‌رود (Acosta-Motos et al. 2017). در تأیید پژوهش حاضر، Mirshekari و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند افزایش انواع قندهای احیایی در تنش خشکی در حضور تیمار سالیسیلیک اسید که خود نوعی پلی‌فنل است، با حفظ فشار تورژانس سلول و در نتیجه سازگاری گیاه به تنش خشکی همراه است. افزایش قند که منبع انرژی و تنظیم‌کننده اسمزی است در پاسخ به تنش شوری منطقی به نظر می‌رسد.

براساس داده‌های حاضر میزان گلايسين بتائين در غلظت ۹۰ میلی‌مولار نمک حاوی ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید افزایش معنی‌داری نشان داد؛ در حالی که سایر تیمارهای نمک و رزمارینیک اسید تأثیر معنی‌داری بر میزان گلايسين بتائين نداشتند. بی‌اثر بودن رزمارینیک اسید بر میزان تجمع گلايسين بتائين شاید به این علت باشد که رزمارینیک اسید خود ترکیبی فنلی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و پلی‌فنل‌ها در مقابله با تنش‌های مختلف از جمله تنش شوری افزایش می‌یابند (Acosta-Motos et al. 2017)؛ بنابراین احتمالاً تجمع پلی‌فنل‌های دیگر مانند رزمارینیک اسید موجود در سلول‌های کالوس، نیاز وافر نداشتن را به گلايسين بتائين باعث شده است. در تأیید این

شدند که مؤید نقش رزمارینیک اسید در بیوستز پروتئین‌ها هستند. درمقابل، تعدادی از باندهای پروتئینی در تیمار رزمارینیک اسید بیان کمتری نشان دادند که این یافته نیز تأکیدی بر دخالت این ماده فنی در بیوستز پروتئین‌ها است. تغییر الگوی پروتئین‌های گیاهی در تنش شوری، در مطالعات سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است؛ برای نمونه Mozafari و Kalantari (۲۰۰۶) تغییرات بارزی در الگوی الکتروفوری پروتئین‌های گیاه *Descurainia sophia* L. در تنش شوری گزارش کردند. در پژوهش حاضر اثبات شد رزمارینیک اسید بر الگوی پروتئینی سلول‌های کالوس سیب‌زمینی اثر محسوس دارد. صرف‌نظر از نوع تغییری که در الگوی پروتئین‌ها با رزمارینیک اسید در سلول‌های کالوس سیب‌زمینی اعمال شد، در حال حاضر پرسشی که باقی می‌ماند این است که این باندهای پروتئینی تغییر یافته چه نوع پروتئینی هستند. بدیهی است برای نیل به پاسخ این پرسش مهم، به کارگیری روش‌های پیشرفته‌تر از جمله الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌ها یا اسپکتروسکوپی توده‌ای در پژوهش‌های آینده نیاز است.

جمع‌بندی

رزمارینیک اسید در کالوس سیب‌زمینی در شرایط تنش شوری با بهبود شرایط رشد، افزایش تجمع اسمولیت‌های سازگاری مانند کربوهیدرات، افزایش پروتئین‌های محلول و تغییر الگوی پروتئین‌ها از یک سو و کاهش میزان عنصر سدیم، افزایش عنصر پتاسیم و تغییرات نامحسوس میزان

اثبات خاصیت آنتی‌اکسیدانی رزمارینیک اسید در بررسی‌های قبلی (Furtado *et al.* 2015)، فرضیاتی مانند اثر احتمالی رزمارینیک اسید بر کاهش جذب سدیم و افزایش جذب پتاسیم با تأثیر بر کانال‌های انتقال سدیم - پتاسیم، تأثیر احتمالی بر آنتی‌پورتر سدیم - پرتون غشاء یا تأثیر احتمالی اسمولیت‌هایی مانند کربوهیدرات‌ها، گلیسین بتائین و پرولین مطرح می‌شوند (Khalvandi *et al.* 2017). بدیهی است اثبات اینکه واقعاً کدام یک از فرضیات مطرح شده یا پدیده‌های ناشناخته دیگر به وقوع پیوسته‌اند، به مطالعات دقیق‌تری در آینده نیاز دارد.

تغییر میزان پروتئین در گیاهان نیز یکی از سازوکارهای پاسخ به تنش شوری به شمار می‌رود. حداقل برخی از این پروتئین‌ها ممکن است پروتئین‌های مسیر سنتز کربوهیدرات‌ها و ترکیبات نیتروژن‌دار از جمله گلیسین بتائین و البته بسیاری از ترکیبات دیگر سلول باشند (Kinnnersley and Turano 2000). در پژوهش حاضر میزان پروتئین کل در حضور رزمارینیک اسید در کالوس‌های در معرض تنش شوری افزایش یافت که نشان می‌دهد افزایش بیوستز و تجمع مخزن پروتئین‌های سلول در کالوس سیب‌زمینی پاسخی مناسب برای مقابله با تنش شوری به شمار می‌رود. مقایسه الگوی پروتئینی کالوس‌ها در شرایط تنش در صورت وجود یا نبودن رزمارینیک اسید تغییرات درخورتوجهی در باندهای پروتئینی تیمار شده با رزمارینیک اسید در حضور نمک نشان می‌دهد؛ برای نمونه، دو باند پروتئینی جدید در حضور رزمارینیک اسید مشاهده

- salinity in *in vitro*-regenerated potato (*Solanum tuberosum* L.) explants. *Acta Physiologia Plantarum* (in press).
- Flowers, T. J. and Colmer, T. D. (2015) Plant salt tolerance: adaptations in halophytes. *Annals of Botany* 115:327-331.
- Furtado, R. A., Oliveira, B. R., Silva, L. R., Cleto, S. S., Munari, C. C., Cunha, W. R. and Tavares, D. C. (2015) Chemopreventive effects of rosmarinic acid on rat colon carcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention* 24:106-112.
- Grieve, C. and Grattan, S. (1983) Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil* 70: 303-307.
- Hao, W., Guo, H., Zhang, J., Hu, G., Yao, Y. and Dong, J. (2014) Hydrogen peroxide is involved in salicylic acid-elicited rosmarinic acid production in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *The Scientific World Journal* 2014: 1-7.
- Hernández, J. A. and Almansa, M. S. (2002) Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum* 115: 251-257.
- Hmida-Sayari, A., Gargouri-Bouziid, R., Bidani, A., Jaoua, L., Savouré, A. and Jaoua, S. (2005) Overexpression of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Science* 169: 746-752.
- Hussain, K., Majeed, A., Nawaz, K. and Nisar, M. F. (2009) Effect of different levels of salinity on growth and ion contents of black seeds (*Nigella sativa* L.). *Current Research Journal of Biological Sciences* 1: 135-138.
- گلايسين بتائين ازسوی ديگر، آثار فيزيولوژيک و بيوشيميای خود را بر سلول‌های کالوس سیب‌زمینی اعمال می‌کند.
- سپاسگزارى**
- نگارندگان مقاله از دانشگاه اصفهان، دانشگاه کویت و دانشگاه آرهوس دانمارک به‌دلیل حمایت از انجام پژوهش حاضر سپاسگزارى می‌کنند.
- منابع**
- Acosta-Motos, J. R., Ortuño, M. F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M. J. and Hernandez, J. A. (2017) Plant responses to salt stress: Adaptive Mechanisms. *Agronomy* 7:18-24.
- Ahmad, H. H., Hamza, A. H., Hassan, A. Z. and Sayed, A. H. (2013) Promising therapeutic role of *Rosmarinus officinalis* successive methanolic fraction against colorectal cancer. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5: 164-170.
- Anjum, S. A., Farooq, M., Xie, X., Liu, X. and Ijaz, M. F. (2012) Antioxidant defense system and proline accumulation enables hot pepper to perform better under drought. *Scientia Horticulturae* 140: 66-73.
- Benavides, M. P., Marconi, P. L., Gallego, S. M., Comba, M. E. and Tomaro, M. L. (2000) Relationship between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. *Functional Plant Biology* 27: 273-278.
- Bohnert, H. J., Nelson, D. E. and Jensen, R. G. (1995) Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* 7: 1099-2015.
- Eskandari, H., Al-Mansour, N. and Ehsanpour, A. A. (2017) Can rosmarinic acid ameliorate the negative effects of

- Hussain Wani, S., Brajendra Singh, N., Haribhushan, A. and Iqbal Mir, J. (2013) Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance-role of glycine betaine. *Current Genomics* 14: 157-165.
- James, J., Alder, N., Mühling, K., Läuchli, A., Shackel, K., Donovan, L. and Richards, J. (2006) High apoplastic solute concentrations in leaves alter water relations of the halophytic shrub, *Sarcobatus vermiculatus*. *Journal of Experimental Botany* 57: 139-147.
- Khalvandi, M., Amerian, M. R., Pirdashti, H., Firoozabadi, M. and Gholami, A. (2017) Effects of *Piriformospora indica* fungi symbiotic on the quantity of essential oil and some physiological parameters of peppermint in saline conditions. *Iranian Journal of Plant Biology* 32: 1-20 (in Persian).
- Kinnersley, A. M. and Turano, F. J. (2000) Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19: 479-509.
- Koca, H., Ozdemir, F. and Turkan, I. (2006) Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Biologia Plantarum* 50:745-748.
- Martinez, C. A., Maestri, M. and Lani, E. G. (1996) *In vitro* salt tolerance and proline accumulation in Andean potato (*Solanum* spp.) differing in frost resistance. *Plant Science* 116: 177-184.
- Meloni, D. A., Oliva, M. A., Martinez, C. A. and Cambraia, J. (2003) Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49: 69-76.
- Miki, Y., Hashiba, M. and Hisajima, S. (2001) Establishment of salt stress tolerant rice plants through step up NaCl treatment *in vitro*. *Biologia Plantarum* 44: 391-395.
- Mirshakari, M., Einali, A. and Valizadeh, J. (2017) Physiological and biochemical responses of *Hibiscus sabdariffa* to drought stress in the presence of salicylic acid. *Iranian Journal of Plant Biology* 32: 21-38 (in Persian).
- Mozafari, H. and Kalantari, K. (2006) Effect of calcium on growth, nutrient accumulation and electrophoresis pattern of proteins under salt stress in *Descurania sophia*. *Iranian Journal of Biology* 18: 24-35 (in Persian).
- Munns, R. and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1977) Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. *Botanical Bulletin-Academia Sinica* 18: 1-24.
- Ochatt, S., Marconi, P., Radice, S., Arnozis, P. and Caso, O. (1998) *In vitro* recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 1-8.
- Park, S. U., Uddin, R., Xu, H., Kim, Y. K. and Lee, S. Y. (2008) Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. *African Journal of Biotechnology* 7(25): 4959-4965.
- Petersen, M. and Simmonds, M. S. (2003) Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62: 121-125.
- Pino, M. T., Skinner, J. S., Park, E. J., Jeknić, Z., Hayes, P. M., Thomashow, M. F. and Chen, T. H. (2007) Use of a stress inducible promoter to drive ectopic AtCBF expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield. *Plant Biotechnology Journal* 5: 591-604.
- Queiros, F., Fidalgo, F., Santos, I. and Salema, R. (2007) *In vitro* selection of

- salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. *Biologia Plantarum* 51: 728-734.
- Rahman, A., Nahar, K., Hasanuzzaman, M. and Fujita, M. (2016) Calcium supplementation improves Na⁺/K⁺ ratio, antioxidant defense and glyoxalase systems in salt-stressed rice seedlings. *Frontiers in Plant Science* 7(2016): 609-620.
- Saeedipour, S. (2013) Relationship of grain yield, ABA and proline accumulation in tolerant and sensitive wheat cultivars as affected by water stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B, Biological Sciences* 83: 311-315.
- Saeedipour, S. (2013) Relationship of grain yield, ABA and proline accumulation in tolerant and sensitive wheat cultivars as affected by water stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B, Biological Sciences* 83: 311-315.
- Song, J., Ji, Y., Xu, K. and Wang, Z. (2012) An integrated analysis of the rosmarinic acid-biosynthetic genes to uncover the regulation of rosmarinic acid pathway in *Salvia miltiorrhiza*. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 1501-1511.
- Storey, R., Ahmad, N. and Jones, R. W. (1977) Taxonomic and ecological aspects of the distribution of glycinebetaine and related compounds in plants. *Oecologia* 27: 319-332.
- Xu, W., Yang, F., Zhang, Y. and Shen, X. (2016) Protective effects of rosmarinic acid against radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice. *Journal of Radiation Research* 57(4): 356-362.
- Yemm, E. and Willis, A. (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal* 508: 18-24.

Archive

Archive of SID