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

Hoda Eskandari [1], Ali Akbar Ehsanpour [1*], Naeimeh Al Mansour [2]

[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. Carbohyadrate 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

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دهم، شمارهٔ سی و ششم، تابستان ۱۳۹۷، صفحهٔ ۱۸-۱
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۷/۲۲
تاریخ بازنگری: ۱۳۹۶/۰۸/۲۰
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۹/۲۵

اثر رزمارینیک اسید بر گلایسین بتائین، کربوهیدرات و تغییر الگوی پروتئین در کالوس سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) در تنش شوری در شرایط کشت در شیشه

هدی اسکندری [۱]، علی اکبر احسانپور [۱*]، نعیمه المنصور [۲]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ 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، گلایسین بتائین، کربوهیدرات، عناصر سدیم و پتاسیم، پروتئین کل و الگوی پروتئینی کالوس‌ها بررسی شد. بدین‌منظور، 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 وکربوهیدرات بیشتری نسبت به کالوس‌های قرارگرفته در تیمار نمک تنها داشتند. میزان گلایسین بتائین در حضور رزمارینیک اسید (۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) در تنش شوری متوسط (۹۰ میلی‌مولار) به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌های رشدیافته 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 پروتئین نیز در حضور رزمارینیک اسید به‌طور معناداری افزایش پیدا کرد. بررسی الگوی پروتئینی اثر مثبت رزمارینیک اسید را بر ایجاد دو پروتئین جدید در محدودهٔ ۵۰ کیلودالتون نشان داد و تغییر بیان پروتئین‌ها را در محدودهٔ ۱۶، ۱۷ و ۲۵ کیلودالتون تأیید کرد. به‌طورکلی، رزمارینیک اسید با افزایش تجمع پروتئین 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، گلایسین بتائین

* نگارندهٔ مسؤول، نشانی پست الکترونیک: ehsanpou@sci.ui.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۳۱۳۷۹۳۴۱۵۰

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

تنش شوری یکی از تنش‌های مخرب غیرزیستی است که به تجمع بیش از حد نمک در گیاه و درنتیجه ممانعت از رشد و نمو سلول و از دست دادن فشار تورگر و تغییراتی در دیوارهٔ سلولی منجر می‌شود (Munns and Tester 2008). همچنین یون‌هایی مانند سدیم و کلر هموستازی یونی درون‌سلولی را با کاتیون‌های ضروری برای فعالیت‌های متابولیک مانند پتاسیم، منیزیم و کلسیم بر هم می‌زنند. تراوش یونی به افزایش درخورتوجه سدیم نسبت به پتاسیم، منیزیم و کلسیم منجر می‌شود که به غیرفعال‌کردن آنزیم‌های سیتوسلی، 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. علاوه‌براین، قرارگرفتن طولانی‌مدت 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 درنهایت مرگ سلول را موجب می‌شود.

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) چهارمین محصول ازنظر میزان تولید در جهان است که بیشترین اهمیت را بین محصولات غذایی غیرغلات دارد (Pino *et al.* 2007). این گیاه گونه‌ای نیمه‌حساس به شوری طبقه‌بندی شده است؛ باوجود 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 میلی‌مولار) رشد گیاه به‌طورکامل ممانعت می‌شود (Hmida-Sayari *et al.* 2005).

روش کشت‌بافت به‌خوبی برای انتخاب نسل‌های سلولی مقاوم به شوری و به‌دنبال‌آن باززایی گیاه با تحمل به شوری بیشتر، استفاده شده است (Ochatt *et al.* 1998; Miki *et al.* 2001). پژوهش‌های متعدد انجام‌شده بر *S. tuberosum* نشان‌دهندهٔ 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 واسرشت‌شدن محافظت می‌کنند (Queiros *et al.* 2007).

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

درحالی‌که در بسیاری از گونه‌های گیاهی، در شرایط طبیعی یا تنش، گلایسین بتائین تجمع داده نمی‌شود؛ ازاین‌رو بررسی تغییرات میزان گلایسین بتائین در کالوس‌های سیب‌زمینی قرارگرفته در تیمار موضوع جالبی برای مطالعه است.

رزمارینیک اسید، استر کافئیک اسید و ۳ و ۴ دی هیدروکسی 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 خانوادهٔ Boraginaceae و زیرخانوادهٔ *Nepetoideae* از Lamiaceae یافت شده است (Petersen and Simmonds 2003; Koca *et al.* 2006; Park *et al.* 2008; Song *et al.* 2012). نقش سرکوب‌کنندهٔ رزمارینیک اسید در حذف یا کاهش تنش اکسیداتیو القاشده بر اثر شوری به‌خوبی مشخص شده است. همچنین اثر ضدآپوپتوزی یا مرگ برنامه‌ریزی‌شدهٔ سلول این ماده بر سیستم‌های جانوری اثبات شده است (Xu *et al.* 2016). علاوه‌براین به خاصیت ضدپیری این ماده در سلول‌های جانوری، انسان‌ها و در معدودی از پژوهش‌های گیاهی به‌طورویژه توجه شده است (Ahmad *et al.* 2013)؛ اما اثر آنتی‌اکسیدانی آن بر سلول‌های گیاهی در معرض تنش هنوز بررسی نشده است. ازآنجاکه سیب‌زمینی گیاه زراعی مدل است و ازسوی‌دیگر بررسی اثر رزمارینیک اسید در سطح سلولی مطالعه نشده است، پاسخ تودهٔ سلولی بدون تمایز کالوس سیب‌زمینی، پاسخ‌های سلول گیاهی را به رزمارینیک اسید به‌خوبی نشان می‌دهد.

در پژوهش حاضر کوشش می‌شود اثر رزمارینیک اسید که مادهٔ فنلی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است بر تودهٔ سلولی بدون تمایز کالوس‌های سیب‌زمینی، مدل قرارگرفته 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 محیط‌کشت Murashige MS (Murashige and Skoog 1977) کشت 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 محیط‌کشت مولد کالوس یعنی محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون‌های 2, 4-D، NAA (نفتالن استیک اسید) و کاینتین انتقال داده شدند. پس از چند هفته کالوس‌های نسل اول ظاهر شدند. کالوس‌های نسل اول دوباره برای تکثیر به محیط‌کشت مولد کالوس جدید انتقال داده و کالوس‌های نسل دوم ایجاد شدند؛ سپس کالوس‌های نسل دوم در محیط‌کشت مولدکالوس 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

فیزیولوژیک و بیوشیمایی کالوس‌های قرارگرفته در تیمار اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری وزن تر کالوس: ابتدا پلیت‌های حاوی محیط‌کشت به‌طورجداگانه توزین شدند. برای جلوگیری از آلوده‌شدن کالوس‌ها پس از انتقال کالوس‌ها به پلیت‌های حاوی محیط‌کشت، پلیت‌ها دوباره توزین شدند و با این روش وزن ابتدایی کالوس‌ها به دست آمد. پس از گذشت سه هفته، کالوس‌ها از محیط‌کشت خارج شدند و وزن تر ثانویهٔ آنها اندازه‌گیری شد؛ سپس با کم‌کردن وزن تر اولیهٔ کالوس از وزن ثانویهٔ آن، وزن تر کالوس‌ها به دست آمد.

اندازه‌گیری کربوهیدرات محلول: کربوهیدرات‌های محلول با روش آنترون (Yemm and Willis 1954) اندازه‌گیری شدند. بدین‌منظور، 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-TURRAX®، شرکت IKA®، کشور آلمان) به‌خوبی هموژن شد؛ سپس مخلوط حاصل در دور ۵۰۰۰ g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و روشناور حاصل روی یخ نگهداری شد. آزمون آنترون برای کربوهیدرات‌ها بر مخلوط ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های رقیق‌شده با ۴ میلی‌لیتر از معرف آنترون انجام شد. لوله‌های آزمایش حاوی نمونه به‌مدت ۵ دقیقه درحمام آب جوش قرار گرفتند. پس از ایجاد رنگ، نمونه‌ها خنک شدند و جذب آنها در طول‌موج ۶۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (مدل Genesyst 5، شرکت Thermo Fisher 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 تغییریافتهٔ Wet ashing استفاده شد. بدین‌منظور، ۳۰ میلی‌گرم از پودر خشک کالوس‌های سیب‌زمینی با ۱۰ میلی‌لیتر محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجهٔ 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 410 Essex-corning، شرکت Halstead، انگلستان) استفاده شد. میزان عناصر سدیم و پتاسیم با نمودار استاندارد رسم‌شده برای این دو عنصر، محاسبه و بر حسب میلی‌مول بر گرم بافت خشک کالوس گزارش شد.

سنجش و اندازه‌گیری گلایسین بتائین: اندازه‌گیری گلایسین 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 به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد روی شیکر نگهداری شد. روز بعد نمونه‌ها صاف و به نسبت ۱:۱ با یدور پتاسیم ($KI-I_2$) سولفوریک اسید ۲ نرمال رقیق شدند و به‌مدت ۱ ساعت روی یخ قرار داده شدند؛ سپس ۰/۲ میلی‌لیتر معرف یدور

پتاسیم سرد به نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای صفر تا ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. مخلوط حاصل در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحلهٔ بعد محلول روشناور با دقت و به‌آرامی جدا شد و کریستال‌های ته‌نشین‌شدهٔ پریدید اندکی با آب مقطر شسته شدند تا معرف رنگی موجود روی آن شسته شد؛ سپس کریستال‌های پریدید در ۱ میلی‌لیتر حلال ۱ و ۲ دی کلرواتان ورتکس شدند تا درون حلال حل شدند و رنگ قرمز ظاهر شد. محلول رنگی حاصل به‌مدت ۲ ساعت نگهداری و سپس جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۳۶۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار گلایسین بتائین با نمودار استاندارد مربوط به گلایسین بتائین خالص، برحسب میکرومول بر گرم وزن خشک گزارش شد.

اندازه‌گیری پروتئین کل: برای بررسی میزان پروتئین‌های محلول در کالوس، ۰/۵ گرم کالوس تازه توزین و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده شدند؛ سپس در ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۷/۸ حاوی ۱ میلی‌مولار EDTA، ۲ درصد پلی وینیل پلی پیرولیدین (PVP) و دی تیوتریتول (DTT) با غلظت ۴ میلی‌مولار با دستگاه Tissue lyser (شرکت QIAGEN، انگلستان) در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد هموژن شد. عصاره‌های حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه با سرعت دور ۱۶۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ و از روشناور حاصل برای اندازه‌گیری پروتئین استفاده شد؛ سپس باتوجه‌به راهنمای موجود در کیت BSA Protein Assay (شرکت Thermo Scientific، آمریکا) پروتئین‌های موجود در عصارهٔ سلولی در طول موج ۵۲۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان پروتئین‌های محلول براساس نمودار استاندارد BSA برای هر نمونه به دست آمد و براساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش شد.

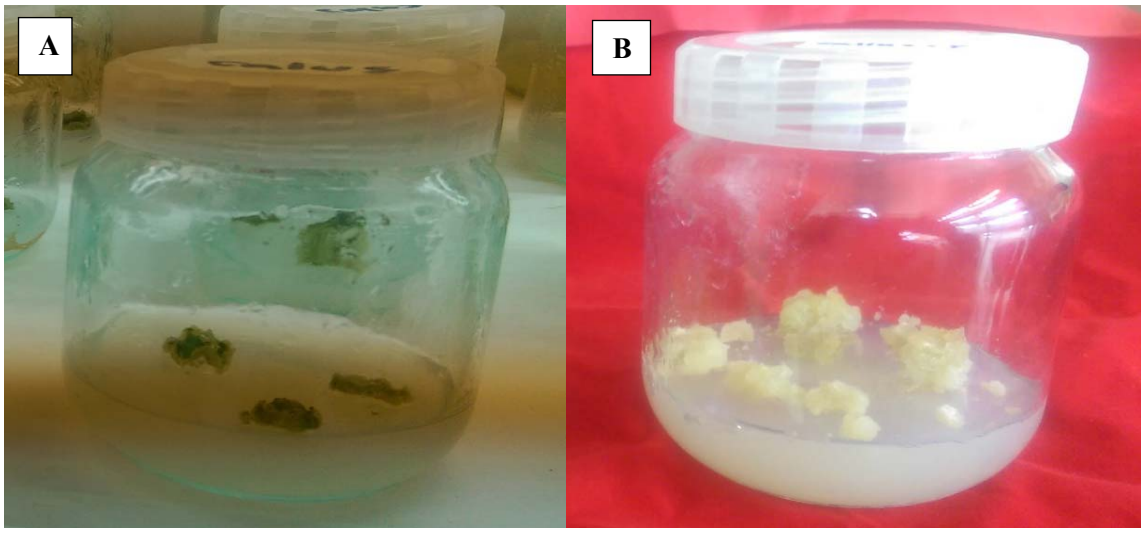
بررسی الگوی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE: برای مقایسهٔ الگوی پروتئین‌های موجود در کالوس‌های تیمارشده و نمونه‌های شاهد، ۱۵ میکرولیتر از عصارهٔ پروتئینی حاصل از روش بالا با ۴ میکرولیتر از بافر بارگذاری پروتئین، حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار احیاکنندهٔ دی تیوتریتول مخلوط و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. عصاره‌های پروتئینی 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 رنگ‌آمیزی شد؛ سپس به‌مدت ۱۶ ساعت در محلول رنگ‌بر قرار داده شد و درنهایت با دستگاه ژل داک (مدل EZ system، شرکت BioRad، آمریکا) مشاهده و تصویربرداری شد.

تحلیل آماری: آزمایش‌ها براساس طرح کامل تصافی با حداقل سه تکرار انجام شدند و داده‌ها با نرم افزار SPSS تحلیل و میانگین داده‌ها با آزمون

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

نتایج

پس از گذشت سه هفته از کشت قطعات برگ سیب‌زمینی در محیط‌کشت مولد کالوس، کالوس‌های نسل اول تولید شدند (شکل ۱-A). پس از انتقال دوبارهٔ کالوس‌های نسل اول به محیط‌کشت مولد کالوس به‌مدت پانزده روز کالوس‌های نسل دوم آماده و به محیط کشت حاوی تیمار رزمارینیک اسید و نمک منتقل شدند.

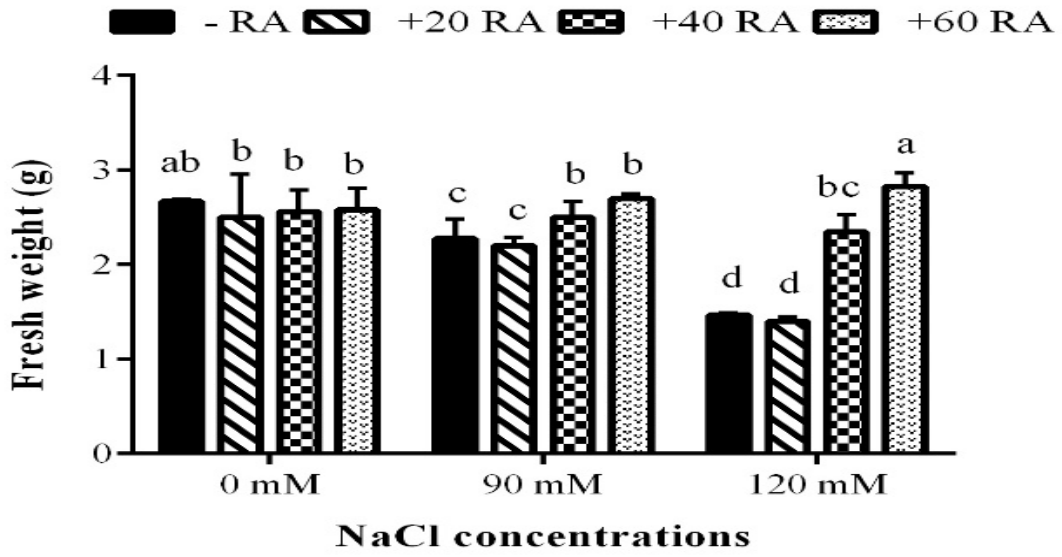


شکل ۱- مراحل تشکیل کالوس سیب‌زمینی نسل اول (A) و نسل دوم (B) در محیط‌کشت مولد کالوس

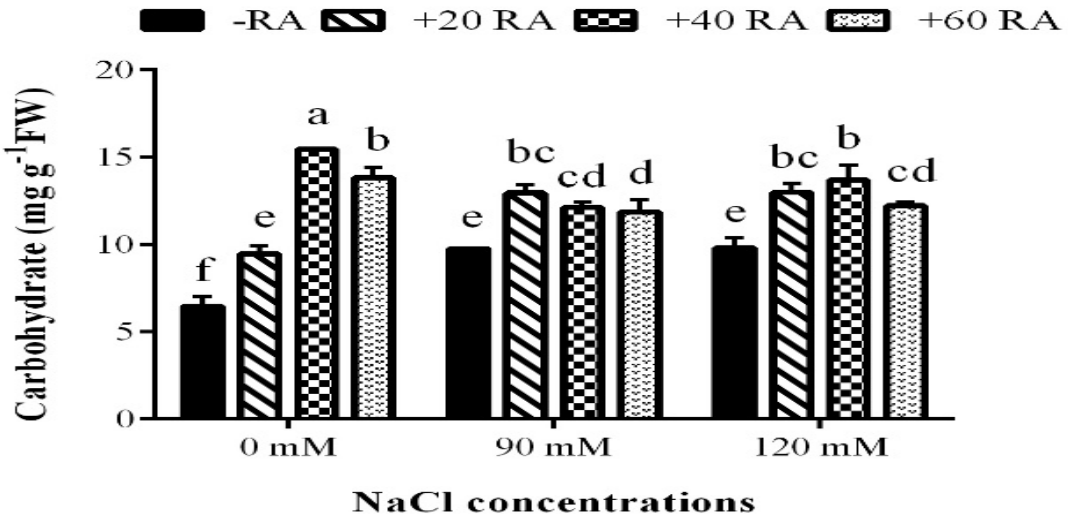
همان‌طورکه در شکل ۲ نشان داده شده است، رزمارینیک اسید به‌تنهایی اثر معنی‌داری بر وزن تر کالوس نداشت. در حضور نمک ۹۰ میلی‌مولار، تیمار با غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید نیز به افزایش معنی‌دار وزن تر کالوس نسبت به نمونه‌های رشدیافته در نمک ۹۰ میلی‌مولار منجر شد. همچنین در شوری زیاد (۱۲۰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

میزان کربوهیدرات محلول: اندازه‌گیری کربوهیدرات در کالوس‌های سیب‌زمینی نشان داد با افزودن رزمارینیک اسید به محیط‌کشت 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).

میزان گلایسین بتائین: تجمع گلایسین بتائین در گونه‌های قرارگرفته در تنش نشانهٔ تحمل به شوری به شمار می‌رود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری گلایسین بتائین نشان دادند با افزایش شوری، تجمع

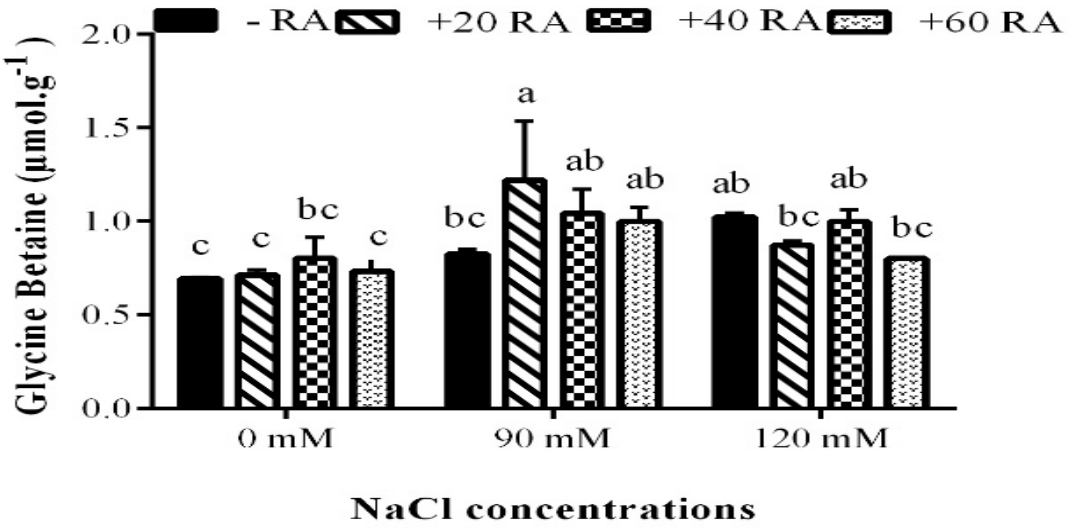


شکل ۲- میزان وزن تر کالوس‌های سیب‌زمینی در تیمار سدیم کلرید برحسب میلی‌مولار و تیمار رزمارینیک اسید (RA) برحسب میلی‌گرم بر لیتر- مقادیر میانگین سه تکرار ± StD هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن هستند.



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 ± StD هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن هستند.

گلایسین بتائین در کالوس‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. حضور رزمارینیک اسید در محیط کشت حاوی نمک، تغییر معناداری در میزان گلایسین بتائین در کالوس‌ها ایجاد نکرد بجز در غلظت ۹۰ میلی‌مولار نمک حاوی ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید که نسبت به نمونهٔ بدون رزمارینیک اسید (۹۰ میلی‌مولار نمک تنها) افزایش معناداری نشان داد؛ درنتیجه رزمارینیک اسید در شوری اندک، به افزایش معنادار گلایسین بتائین منجر شد (شکل ۴).

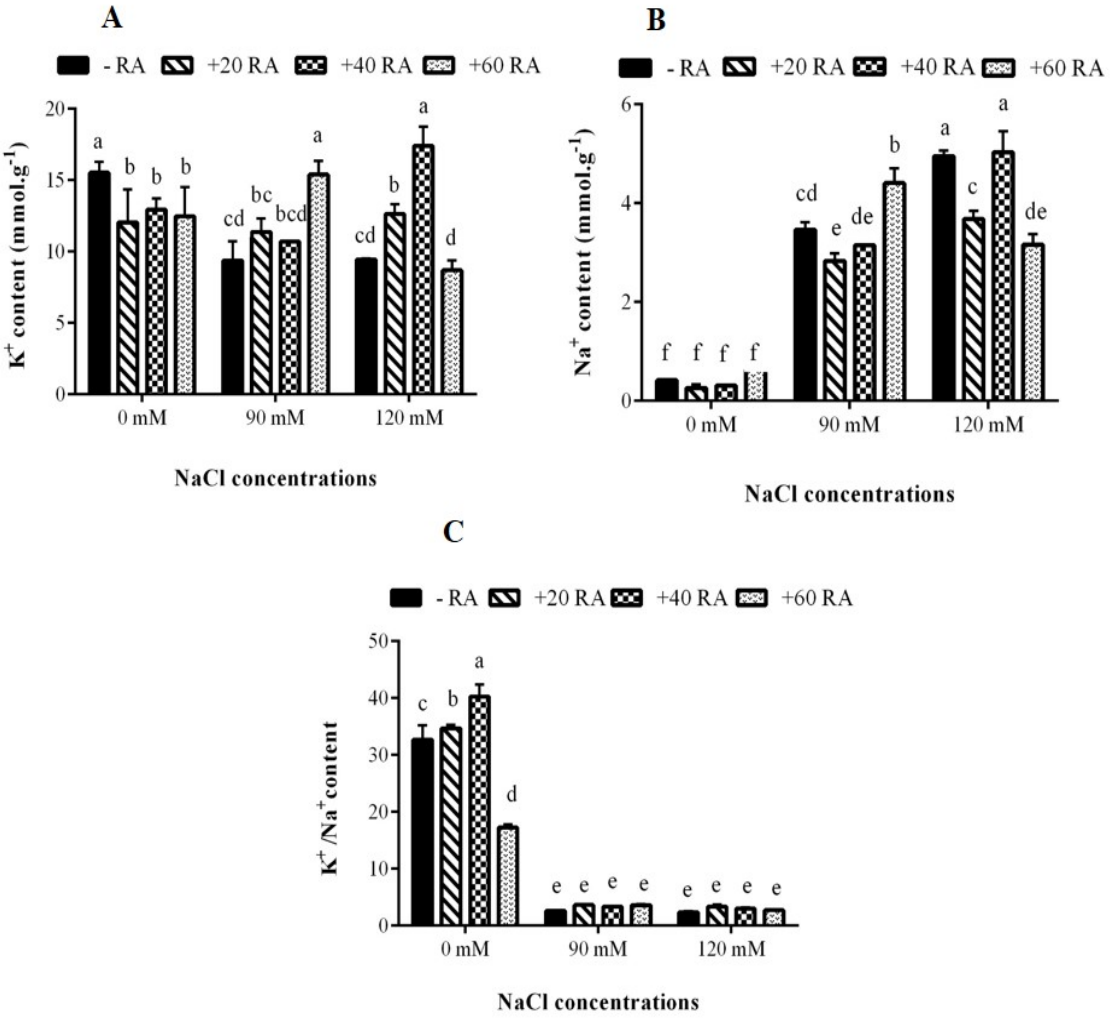


شکل ۴- میزان گلایسین بتائین در کالوس‌های رشدیافته در تیمار نمک سدیم کلرید برحسب میلی‌مولار و رزمارینیک اسید (RA) برحسب میلی‌گرم بر لیتر- مقادیر میانگین سه تکرار ± StD هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن هستند.

میزان سدیم: برای بررسی مقادیر عناصر سدیم و پتاسیم در کالوس‌های قرارگرفته در تنش شوری در حضور رزمارینیک اسید، پس از سه هفته میزان این عناصر اندازه‌گیری شد. باتوجه‌به شکل ۵-B، میزان عنصر سدیم به‌طور معنی‌داری بر اثر افزایش غلظت سدیم کلرید افزایش یافت. در حضور رزمارینیک اسید در غلظت‌های ۹۰ میلی‌مولار نمک حاوی ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک حاوی ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید کاهش معنی‌داری در میزان عنصر سدیم نشان داد.

میزان پتاسیم: باتوجه‌به شکل ۵-B داده‌ها نشان دادند میزان سدیم در سلول‌های کالوس در تیمار شوری نسبت به سلول‌های کالوس شاهد (بدون نمک) افزایش معنی‌داری یافت؛ باوجود این در غلظت‌های ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک، تیمار رزمارینیک اسید با غلظت ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر میزان سدیم را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. میزان عنصر پتاسیم (شکل ۵-A) برخلاف یون سدیم با

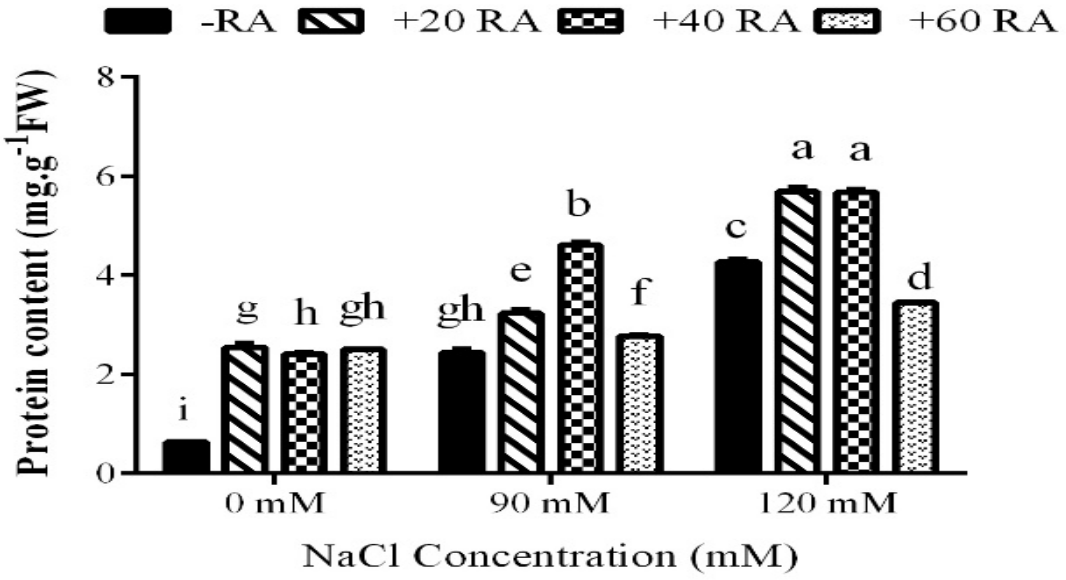
افزایش میزان شوری به‌طور معناداری کاهش یافت؛ درحالی‌که در حضور رزمارینیک اسید و نمک، در غلظت‌های ۹۰ میلی‌مولار نمک حاوی ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک



شکل ۵- میزان پتاسیم (A)، سدیم (B) و نسبت پتاسیم به سدیم (C) در کالوس‌های رشدیافته در تیمار نمک سدیم کلرید برحسب میلی‌مولار و رزمارینیک اسید (RA) برحسب میلی‌گرم بر لیتر- مقادیر میانگین سه تکرار ± StD هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن هستند.

حاوی ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید، میزان عنصر پتاسیم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به‌هرحال نسبت پتاسیم به سدیم در حضور رزمارینیک اسید (۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) بدون نمک افزایش یافت؛ درحالی‌که این نسبت در حضور نمک تغییر معنی‌داری نشان نداد (شکل ۵-C).

میزان پروتئین‌های محلول: پس از سه هفته، میزان پروتئین کالوس‌های سیب‌زمینی رشدیافته در محیط حاوی نمک و رزمارینیک اسید اندازه‌گیری شد. همان‌طورکه در شکل ۶ ملاحظه می‌شود حضور رزمارینیک اسید (۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط‌کشت افزایش ۲/۵ برابری را در میزان پروتئین کالوس‌ها نسبت به نمونهٔ شاهد باعث شد. میزان پروتئین در کالوس‌های قرارگرفته در تنش با افزایش میزان شوری از ۹۰ به ۱۲۰ میلی‌مولار به‌طور معناداری افزایش پیدا کرد. قرارگرفتن 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.

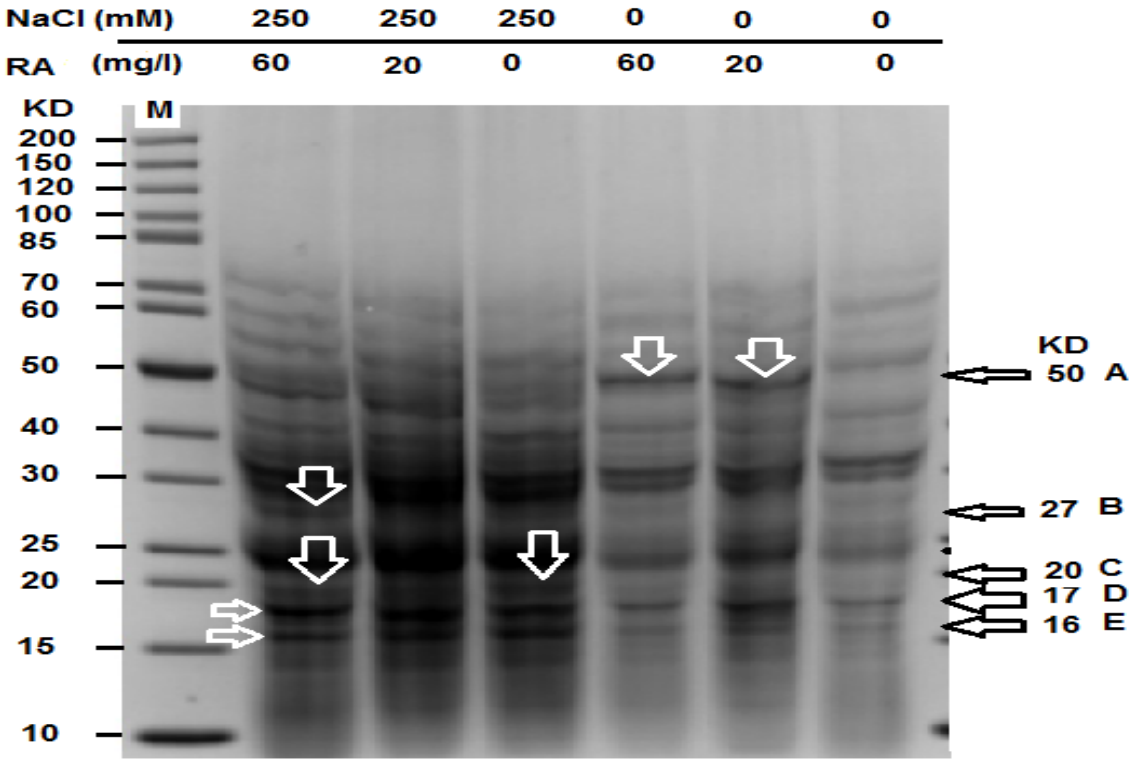


شکل ۶ – میزان پروتئین‌های محلول در کالوس‌های سیب‌زمینی شاهد، در تیمار نمک سدیم کلرید برحسب میلی‌مولار و رزمارینیک اسید (RA) برحسب میلی‌گرم بر لیتر- مقادیر میانگین سه تکرار ± StD هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن هستند.

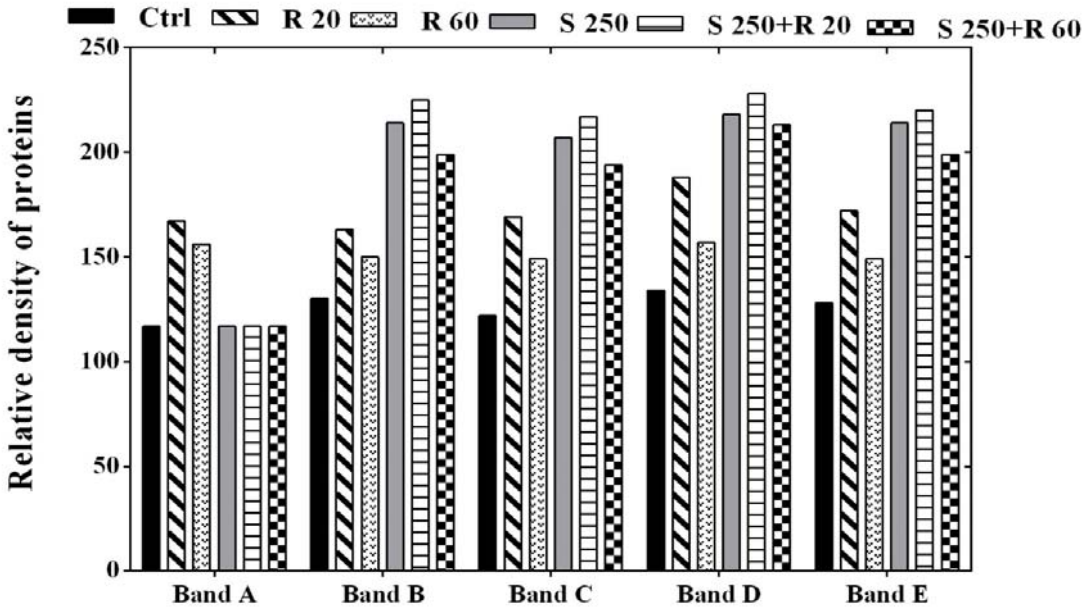
بررسی تغییر الگوی پروتئینی کالوس‌ها با روش SDS-PAGE: تغییرات الگوی پروتئینی کالوس‌های تیمارشده با ژل SDS-PAGE بررسی شدند. باتوجه‌به‌اینکه نتایج غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید تقریباً یکسان بود، غلظت ۲۰، کمترین و ۶۰، غلظت زیاد رزمارینیک اسید برای الکتروفورز انتخاب شد. همان‌گونه‌که در 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

اسید به‌طور چشمگیری دو پروتئین جدید نشان‌داده‌شده با پیکان با وزن مولکولی حدود ۵۰ کیلودالتون مشاهده شد. علاوه‌براین، میزان بیان ۳ پروتئین نیز در محدودهٔ وزن مولکولی تقریبی ۱۶، ۱۷ و ۲۵ کیلودالتون کاهش محسوس نشان داد (شکل ۷)؛ درحالی‌که همین پروتئین‌ها در تیمار نمک با غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار با رزمارینیک اسید و بدون رزمارینیک اسید افزایش بیان درخورتوجهی نشان دادند (شکل ۷). برای بررسی تغییرات باندهای پروتئینی در تیمارهای مختلف نمک و رزمارینیک اسید، شاخص‌ترین تغییرات محسوس در باندهای پروتئینی شناسایی و با حروف A تا E نام‌گذاری شدند (شکل ۸)؛ سپس میزان تراکم نسبی این باندها با برنامهٔ Image J تحلیل شد.

در باندهای ردیف A در مقایسه با شاهد، افزایش تراکم پروتئین تنها در غلظت ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید بدون تنش نمک مشاهده شد؛ درحالی‌که همهٔ باندهای ردیف‌های B تا E افزایش تراکم نسبی در تیمار رزمارینیک اسید به‌تنهایی یا با نمک ۲۵۰ میلی‌مولار نشان دادند. بیشترین میزان تراکم پروتئین در باندهایی مشاهده شد که نمک و رزمارینیک اسید به‌طور هم‌زمان به محیط‌کشت اضافه شده بودند.



شکل ۷- الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های کالوس سیب‌زمینی در تیمار نمک سدیم کلرید و رزمارینیک اسید (RA): M (نشانگر پروتئینی، ۲۵۰ میلی‌مولار نمک و ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید) و پیکان‌ها (نشان‌دهندهٔ تغییرات محسوس‌ترین باندهای پروتئینی)



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

بحث

توسعهٔ 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 ازجمله شوری به‌ویژه در سطح سلولی بسیار ضروری است (Hussain *et al.* 2009). ازسوی‌دیگر، 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 شیوهٔ پاسخ‌دهی گیاه و احتمالاً راهکارهای استفاده‌شدهٔ گیاه در این پاسخ‌ها پی برده می‌شود (Hernández 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

(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 همهٔ غلظت‌ها مشاهده شد که یکی از سازوکارهای تحمل به شوری به شمار 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 تورژسانس سلول و درنتیجه سازگاری گیاه به تنش خشکی همراه است. افزایش قند که منبع انرژی و تنظیم‌کنندهٔ اسمزی است در پاسخ به تنش شوری منطقی به نظر می‌رسد.

براساس داده‌های حاضر میزان گلایسین بتائین در غلظت ۹۰ میلی‌مولار نمک حاوی ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر رزمارینیک اسید افزایش معنی‌داری نشان داد؛ درحالی‌که سایر تیمارهای نمک و رزمارینیک اسید تأثیر معنی‌داری بر میزان گلایسین بتایین نداشتند. بی‌اثربودن رزمارینیک اسید بر میزان تجمع گلایسین بتائین شاید به این علت باشد که رزمارینیک اسید خود ترکیبی فنلی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و پلی فنل‌ها در مقابله با تنش‌های مختلف ازجمله 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 گلایسین بتایین باعث شده است. در تأیید این فرضیه، سایر پژوهش‌های قبلی ما افزایش رزمارینیک اسید وگالیک 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 رشدیافته در ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نمک به‌تنهایی کاهش یافت که خود بیان‌کنندهٔ اثر تعدیل‌کنندگی رزمارینیک اسید بر تنش شوری است (داده‌ها ارائه نشده‌اند).

تجمع بیش از حد یون‌های سدیم و کلر به آسیب اکسیداتیو پروتئین‌های سیتوسلی ضروری ازجمله آنزیم‌ها، متابولیت‌های اولیه، نوکلئیک اسیدها، آنزیم‌های فتوسنتزی، کوآنزیم‌های تعرقی 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 نکتهٔ جالب‌توجه 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. ازآنجاکه بهبود نسبت پتاسیم به سدیم در گیاهان قرارگرفته در تنش شوری، سازوکاری برای تحمل به شوری به شمار می‌رود (Rahman *et al.* 2016)، همچنین به‌دلیل

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 - پروتون غشاء یا تأثیر احتمالی اسمولیت‌هایی مانند کربوهیدات‌ها، گلایسین بتایین و پرولین مطرح می‌شوند (Khalvandi *et al.* 2017). بدیهی است اثبات اینکه واقعاً کدام‌یک از فرضیات مطرح‌شده یا پدیده‌های ناشناختهٔ 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 ازجمله گلایسین بتائین و البته بسیاری از ترکیبات دیگر سلول باشند (Kinnersley 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 بیوسنتز و تجمع مخزن پروتئین‌های سلول در کالوس سیب‌زمینی پاسخی مناسب برای مقابله با تنش شوری به شمار می‌رود. مقایسهٔ الگوی پروتئینی کالوس‌ها در شرایط تنش درصورت وجود یا نبودن رزمارینیک اسید تغییرات درخورتوجهی در باندهای پروتئینی تیمارشده با رزمارینیک اسید در حضور نمک نشان می‌دهد؛ برای نمونه، دو باند پروتئینی جدید در حضور رزمارینیک اسید مشاهده شدند که مؤید نقش رزمارینیک اسید در بیوسنتز پروتئین‌ها هستند. درمقابل، تعدادی از باندهای پروتئینی در تیمار رزمارینیک اسید بیان کمتری نشان دادند که این یافته نیز تأکیدی بر دخالت این مادهٔ فنلی در بیوسنتز پروتیئن‌ها 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، درحال‌حاضر پرسشی که باقی می‌ماند این است که این باندهای پروتئینی تغییریافته چه نوع پروتئینی هستند. بدیهی است برای نیل به پاسخ این پرسش مهم، به‌کارگیری روش‌های پیشرفته‌تر ازجمله 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 یک‌سو و کاهش میزان عنصر سدیم، افزایش عنصر پتاسیم و تغییرات نامحسوس میزان

گلایسین بتائین ازسوی‌دیگر، آثار فیزیولوژیک و بیوشیمیایی خود را بر سلول‌های کالوس سیب‌زمینی اعمال می‌کند.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله از دانشگاه اصفهان، دانشگاه کویت و دانشگاه آرهوس دانمارک به‌دلیل حمایت از انجام پژوهش حاضر سپاسگزاری 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 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-Bouzid, 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.

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.

Mirshekari, M., Einali, A. and Valizadeh, J. (2017) Physiological and biochemical responses of *Hibiscus sabadariffa* 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, nutreint accomulation and elctrophoresis 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., Jekni'c, 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.