



The effect of pyrazinamide and AgNO₃ as ethylene inhibitors on some growth and biochemical parameters of *in vitro* potato (*Solanum tuberosum* L.) culture

Delavari M^a, Ehsanpour AA^{a*}, Moazzami Farida SH^a

^a Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, 8174673441, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Delavari M, Ehsanpour AA, Moazzami Farida SH. The effect of pyrazinamide and AgNO₃ as ethylene inhibitors on some growth and biochemical parameters of *in vitro* potato (*Solanum tuberosum* L.) culture. Journal of Cell and Tissue. 2024; 15(2):130-112.

[https:// 10.61186/JCT.15.2.130](https://10.61186/JCT.15.2.130)

KEY WORDS

Ethylene
Potato
Pyrazinamide

ABSTRACT

Aim: Potato (*Solanum tuberosum* L.) is a key crop within the Solanaceae family and ranks as the most significant non-cereal crop globally following major staples such as wheat, rice, and corn. Potatoes can reproduce sexually and asexually via tubers, and plant tissue culture is emerging as an effective method for vegetative propagation, addressing the increasing global demand for agricultural products. Ethylene, a critical plant growth regulator, influences various physiological processes including growth and development. During *in vitro* culture and due to the wounding of explants, ethylene accumulation can lead to abnormal biological responses, with potato seedlings being susceptible. Thus, investigating the effects of ethylene biosynthesis inhibitors such as pyrazinamide (PZA) and AgNO₃ on potato growth *in vitro* is essential.

Material and Methods: In this study, potato seedlings were cultivated in Murashige and Skoog (MS) medium, with concentrations of PZA ranging from 0 to 6 mg L⁻¹ and AgNO₃ at 2 mg L⁻¹. After four weeks, the seedlings were harvested and stored at -70°C for later analysis. The growth parameters measured included fresh weight (FW), dry weight (DW), stem and root lengths, leaf area, and leaf and root number. In addition, biochemical parameters, such as photosynthetic pigment levels, total phenol content (TPC), total reactive oxygen species (ROS), and proline concentration were analyzed. Statistical evaluations were conducted using SPSS and PAST software

Results: The results showed that the 2 mg L⁻¹ PZA treatment led to the highest FW and DW and increased leaf numbers; however, it was also correlated with a lower number of rooted plants. Conversely, treatments with 6 mg L⁻¹ PZA promoted longer stem growth, whereas control plants exhibited the largest leaf area, and AgNO₃-treated plants produced the longest roots. The accumulation of H₂O₂ in plants treated with ethylene inhibitors was like controls, but total ROS levels soared by 36% in those treated with 6 mg L⁻¹ PZA compared to controls. This suggests a link between reduced ethylene production, oxidative stress mitigation, and enhanced potato growth. Additionally, total ROS was positively correlated with stem length, but negatively correlated with root

* Corresponding author. Tel.: 031- 37934150; Fax: 031- 37934150

E-mail address: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.61186/JCT.15.2.130>

Received: 14 May. 2024; Received in revised form: 6 Jul. 2024; Accepted: 7 Jul. 2024

Original Article

© Author



length.

Plants use several strategies to combat the damaging effects of ROS, such as the production of antioxidant compounds such as phenolics. Although PZA did not significantly alter TPC compared to controls, treatment with AgNO₃ caused a 61% reduction in TPC. Therefore, PZA did not appear to significantly affect phenolics production in the potato seedlings.

Proline, another critical antioxidant in plants, was found to accumulate significantly in the leaves of plants treated with 6 mg L⁻¹ PZA, which was more than 2.3 times higher than that in controls. This accumulation correlated positively with ROS levels at higher PZA concentrations but showed an inverse relationship with photosynthetic pigment levels.

The PCA revealed the relationships between the measured parameters and the applied elicitors. The samples were categorized into four distinct groups:

1. Control group: This group primarily exhibited higher FW, DW, and longer roots compared to the treated plants.
2. Low PZA dose group: These plants displayed elevated levels of photosynthetic pigments, TPC, and leaf area.
3. Medium PZA dose group: Correlations were observed with an increased number of roots.
4. 6 mg L⁻¹ PZA and AgNO₃ group: These samples contained elevated levels of total ROS and proline.

Conclusion: The study concludes that low concentrations of PZA can stimulate growth while inhibiting ethylene production, resulting in fewer growth abnormalities compared to control plants. However, at elevated PZA concentrations, increased ROS levels may lead to oxidative stress, emphasizing the delicate balance in ethylene's role in plant growth and the necessity for further research to optimize conditions for potato cultivation in vitro. The findings contribute to a deeper understanding of how ethylene inhibitors can enhance potato propagation and possibly other crops in controlled agricultural environments.



اثر پیرازینامید و نیترات نقره به‌عنوان مهارکننده‌های اتیلن بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی و رشد گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum*L.) در شرایط کشت در شیشه

مژده دلاوری^۱، علی اکبر احسانپور^{۲*}، سید حامد معظمی فریدا^۳

^۱ کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، mojde.delavari@gmail.com

^۲ استاد، گروه زیست‌شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، ehsanpou@sci.ui.ac.ir
^۳ استادیار، گروه زیست‌شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، moazzami@bio.ui.ac.ir

واژگان کلیدی	چکیده
اتیلن پیرازینامید سیب زمینی	هدف: سیب زمینی (<i>Solanum tuberosum</i> L.) به‌عنوان چهارمین محصول مهم غذایی و اولین محصول غیرغلات تولید شده در جهان است. غده‌های آن حاوی مقادیر قابل توجهی از نشاسته، ویتامین‌ها، پروتئین‌ها، فلاوونوئید و مواد معدنی هستند. بنابراین سیب زمینی پتانسیل بالایی در مبارزه با سوء تغذیه در جهان دارد. کشت در شیشه یکی از روش‌های جایگزین تکثیر رویش گیاهان است. در شرایط کشت درون شیشه‌ای، اتیلن به‌دلایل مختلفی تولید می‌شود که اغلب آثار زیان بار و ناهنجاری‌های زیستی متفاوتی از قبیل کاهش رشد را ایجاد می‌کند. مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، اثر غلظت‌های مختلف پیرازینامید (PZA)، به‌عنوان بازدارنده بیان ژن ACC اکسیداز، و نیترات نقره بر روی برخی شاخص‌های بیوشیمیایی و رشد گیاه سیب زمینی رقم وایت دزیره مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج: داده‌های حاصل نشان داد که PZA از تشکیل ریشه‌های هوایی و نابجا جلوگیری کرده و سبب افزایش سطح برگ شد. همچنین محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، فنل کل، پرولین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل تغییر یافت. علاوه بر این، غلظت‌های بالاتر PZA منجر به افزایش سطح H_2O_2 و ROS کل در گیاهان تحت تیمار شد. نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد غلظت 2 mg L ⁻¹ PZA به‌عنوان غلظت بهینه در بازدارندگی اتیلن بود. رشد گیاه‌چه‌های سیب زمینی در کشت بافت بهبود یافت.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۵	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۴/۱۶	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۱۷	

۱- مقدمه

سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) گیاهی متعلق به تیره سیب زمینی (Solanaceae) از گیاهان غده‌ای با عمر کوتاه است. در سراسر جهان، حدود ۵۰۰۰ نوع سیب زمینی کشت می‌شود و رقم وایت دزیره یکی از ارقام کشت شده در ایران است. این گیاه به دلیل ارزش غذایی بالای آن، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و حاوی مقادیر قابل توجهی از نشاسته، مواد معدنی، پروتئین‌ها و ویتامین‌ها می‌باشد. بنابراین منبع کلیدی کربن برای انسان محسوب می‌شود. این گیاهان همچنین به واسطه حضور فلاونوئید و ویتامین C دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانسی می‌باشد (۳-۱). سیب زمینی مهم‌ترین محصول غیرغلات و یکی از چهار محصول غذایی راهبردی بعد از گندم، برنج و ذرت می‌باشد (۴). در حال حاضر، کل سطح زیر کشت این گیاه ۲۰/۷ میلیون هکتار بوده و با تولید تخمینی ۴۳۷ میلیون تن کشت می‌شود (۵). برای کشت سیب زمینی از روش‌های متنوع و متعددی استفاده می‌شود. این گیاه را می‌توان از طریق جنسی (با دانه) و یا به صورت غیرجنسی (رویشی) از طریق غده تکثیر کرد. تکثیر از طریق دانه دارای معایبی مانند سرعت کم تکثیر و خطر بالای ابتلا به بیماری‌های مختلف است. در سال‌های اخیر، روش‌های کشت بافت به روش‌های جایگزین و رایج برای تکثیر رویشی گیاهان تبدیل شده‌اند. کشت بافت گیاهی، به عنوان یک فناوری نوظهور، منجر به افزایش تولید گیاهان زراعی شده، بنابراین می‌توان اظهار داشت که این تکنیک اثرات قابل توجهی بر میزان تولید غذا در جهان داشته است. سیب‌زمینی یکی از اولین محصولات زراعی است که جهت تولید هیبریدهای سوماتیک در شرایط کشت در شیشه مورد استفاده قرار گرفته است (۶).

اتیلن یکی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بوده و نقش‌های مهمی در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف از جمله رشد و نمو گیاهان دارد (۷-۹). اثر آن بر رشد گیاه شامل مهار رشد ریشه اولیه (۱۰) و تشکیل ریشه جانبی (۱۱) و اثر مثبت در تشکیل و رشد تارهای کشنده است (۱۲). همچنین، اتیلن به دلیل تنظیم تقسیم سلولی در مهار رشد برگ نیز نقش دارد (۱۳). علاوه بر این، این هورمون می‌تواند با فعال کردن سیستم مهارکننده‌ی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، تنش‌های غیرزیستی را کاهش دهد. اتیلن می‌تواند با فعال‌سازی ژن‌های مرتبط با پیری یا تخریب کلروفیل از رشد گیاه جلوگیری کند (۱۴). در گیاهان، دو آنزیم کلیدی ACC سنتاز و ACC اکسیداز در مسیر بیوسنتز اتیلن دخیل می‌باشند. تنظیم بیان ژن‌های این آنزیم‌ها هم در سطح رونویسی و هم در سطح پس از رونویسی منجر به تنظیم سطح تولید اتیلن می‌شود. در طی کشت در شیشه و در نتیجه زخمی شدن گیاه حین کاشت قطعات برای انجام واکشت، اتیلن تولید می‌شود (۱۵). تجمع اتیلن در کشت بافت گیاهی، می‌تواند اثرات زیان باری را در پی داشته و منجر به بروز ناهنجاری‌های زیستی از جمله مهار رشد گیاهان، کاهش سطح برگ، افزایش طول میان‌گره و ایجاد ریشه‌های مویین شود (۵، ۱۸-۱۶). برخی از گیاهان مانند سیب زمینی به اتیلن بسیار حساس بوده و تجمع اتیلن در داخل ظرف کشت می‌تواند رشد گیاهچه‌ها را به شدت کاهش دهد، در نتیجه گیاهچه‌ها دارای ساقه‌های باریک و برگ‌های کوچک می‌شوند (۸، ۱۸، ۱۹).

استفاده از مهارکننده‌های اتیلن می‌تواند راه‌کار مناسبی برای کاهش اثرات منفی این هورمون روی گیاهان کشت شده در شیشه باشد. پیرازینامید (PZA) به عنوان داروی درمان بیماری سل شناخته شده است. یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana* L) این ماده به عنوان یک مهارکننده بیوسنتز اتیلن عمل می‌کند. در بافت‌های گیاهی، PZA به پیرازین کربوکسیلیک اسید که فرم فعال آن است، تبدیل می‌شود. این ماده، فعالیت آنزیم ACC اکسیداز که کاتالیز کننده‌ی مرحله نهایی تولید اتیلن می‌باشد، را متوقف می‌کند (۹). Zarei و Ehsanpour (۲۰) نشان دادند که در حضور $AgNO_3$ و PZA، وزن تر و خشک و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان گوجه فرنگی رشد یافته در شرایط آزمایشگاهی افزایش یافت. با توجه به نقش مهارکنندگی PZA و مشتقات آن، Sun و همکاران (۲۱) پیشنهاد دادند که این ترکیبات، تنظیم‌کننده‌های موثری در مسیر متابولیسمی گیاه و به ویژه بیوسنتز اتیلن می‌باشند، بنابراین می‌توان از آن‌ها با اهداف بهبود محصولات کشاورزی استفاده کرد. علاوه بر PZA، $AgNO_3$ بازدارنده دیگر اتیلن است که با ایجاد یک کمپلکس غیرعملکردی با گیرنده اتیلن، در مسیر علامت‌دهی این هورمون تداخل ایجاد می‌کند. با دخالت در مسیرهای مرتبط با اتیلن، این بازدارنده‌ها می‌توانند پاسخ‌های ناشی از اتیلن را سرکوب کنند.

با توجه به این‌که سیب زمینی یکی از مهم‌ترین محصولات غذایی است و از اهمیت اقتصادی و تغذیه‌ای بسیار بالایی برخوردار است و تاکنون مطالعات اندکی در زمینه عمل‌کرد PZA در مهار هورمون اتیلن در گیاهان انجام شده است و همچنین هیچ گزارشی در رابطه با تاثیر آن بر گیاه سیب زمینی در شرایط کشت در شیشه ارائه نشده است و از طرف دیگر کاملاً شناخته شده است که قطعه جدا کشت از بافت و سلول گیاهی در درون ظرف کشت بافت ایجاد اتیلن می‌نماید و این هورمون در بسیاری از موارد موجب کاهش رشد و تمایز و رشد سلول و بافت گیاهی می‌شود و از سیب زمینی از جمله گیاهان نسبتاً حساس به اتیلن موجود در ظرف کشت بافت می‌باشد، بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثر PZA و AgNO₃، به‌عنوان بازدارنده‌های تولید و عمل اتیلن، بر برخی شاخص‌های رشدی و بیوشیمیایی از قبیل محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، تولید رادیکال‌های آزاد، فنل کل و پرولین در گیاه سیب زمینی، به‌عنوان یک گیاه حساس به اتیلن، در شرایط کشت در شیشه می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این مطالعه از گیاهان سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) رقم وایت دزیره که قبلاً در شرایط کشت بافت در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی گیاهی دانشگاه اصفهان کشت داده شده بود، استفاده شد. جوانه‌های این گیاهان روی محیط کشت موراشیگ-اسکوگ (Murashige and Skoog = MS) (۲۲) حاوی غلظت‌های بهینه ۰ mg L⁻¹ PZA، ۲، ۴ و ۶ (آزمایش‌های اولیه برای تعیین غلظت‌های موثر PZA انجام شد، داده‌های مذکور در این مقاله گزارش داده نشد) رشد داده شدند. جوانه‌های مورد استفاده، از نظر شرایط فیزیولوژیکی بیشترین شباهت را به هم داشتند. از آنجایی‌که تنها گزارش‌های اندکی از اثر PZA به‌عنوان مهارکننده بیوسنتز اتیلن در گیاهان ارائه شده، از غلظت ۲ mg L⁻¹ AgNO₃ (ممانعت‌کننده فعالیت اتیلن در گیاهان) در محیط کشت MS به‌عنوان شاهد دوم در مقایسه با PZA استفاده شد (این غلظت بر اساس مطالعات اولیه به‌دست آمد). سپس، شیشه‌های حاوی جوانه‌ها به مدت ۵ هفته به اتاق کشت (دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی) ۵۰ μM phot. m⁻² s⁻¹ (و ۸ ساعت تاریکی) منتقل شدند. پس از گذشت ۴ هفته از زمان تیماردهی، گیاهچه‌های سیب زمینی برای بررسی و سنجش شاخص‌های مختلف، برداشت و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شاخص‌های رویشی: وزن تر گیاهان شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف PZA و AgNO₃ بلافاصله پس از برداشت نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت اندازه‌گیری وزن خشک، بخش هوایی گیاهچه‌های سیب زمینی پس از ۵ هفته رشد، جدا شده و به مدت ۴۸ ساعت درون آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس، وزن خشک نمونه‌های مورد مطالعه گزارش شد.

طول ساقه و ریشه اصلی گیاه سیب زمینی پس از قطع از محل مشخص، با واحد سانتی‌متر (Cm) (اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری سطح برگ گیاه سیب‌زمینی نیز با واحد میلی‌متر مربع (mm²) گزارش شد. همچنین، تعداد برگ‌های موجود در هر ساقه اصلی و فرعی و تعداد ریشه در هر گیاه نیز شمارش شد.

شاخص‌های بیوشیمیایی

تعیین محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی: برای اندازه‌گیری محتوای کلروفیل و کاروتنوئید برگ گیاهان سیب‌زمینی تیمار شده با غلظت‌های مختلف PZA و AgNO₃ به‌ترتیب از روش‌های Arnon (1949) و Lichtenthaler (1987) استفاده شد. تقریباً ۱۰۰ میلی‌گرم از برگ‌های تازه در هاون در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد (v/v) آسیاب شد. سپس عصاره حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شده و در نهایت جذب نوری محلول‌های به‌دست آمده به‌کمک دستگاه طیف سنج نوری

رنگیزه‌های فتوسنتزی اندازه‌گیری شده با واحد میلی‌گرم بر گرم وزن تر (mg g⁻¹ FW) گزارش شد. محتوای (Synergy HTX Multi-Mode Reader, Biotek) در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۷، ۶۶۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای

تعیین محتوای H₂O₂، ROS کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتهی کل: محتوای H₂O₂ با استفاده از واکنش یدید پتاسیم (۲۵) به‌دست آمد و به‌صورت μM g⁻¹ FW بیان شد. همچنین برای اندازه‌گیری ROS کل از روش Mahalingam و همکاران (۲۶) استفاده شد. به‌طور خلاصه، بافت تازه برگ (۱۰۰ میلی‌گرم) با ۱ میلی‌لیتر از بافر 10 Tris-HCl میلی‌مولار (pH= ۷/۲) همگن شد. محلول رویی پس از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (14000 g) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، برای اندازه‌گیری ROS کل استفاده شد. فلورسانس نمونه‌ها به‌کمک دستگاه طیف‌سنج نوری در طول موج برانگیختگی ۴۸۰ نانومتر و طول موج نشری ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. مقدار فلورسانس نمونه‌ها با واحد نسبی فلورسانس بر میلی‌گرم پروتئین (RFU.mg⁻¹.Protein) گزارش شد. مقدار پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد تعیین شد.

جهت اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانتهی کل ابتدا ۸ میلی‌گرم از پودر DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد حل شد. سپس در محیط تاریکی به ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH، 50 میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه و مخلوط شد. از محلول ۱ میلی‌گرم آسکوربیک اسید در یک میلی‌لیتر اتانول به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جهت انجام واکنش، نمونه‌ها به‌مدت نیم ساعت در تاریکی قرار داده شدند. در نهایت میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه طیف‌سنج نوری در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد.

تعیین محتوای فنل کل: برای اندازه‌گیری محتوای فنل کل (TPC) گیاهان سیب زمینی تیمار شده با غلظت‌های مختلف PZA و AgNO₃، بافت تر گیاه (۱۰۰ میلی‌گرم) از هر نمونه با ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد همگن شد. سپس عصاره حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه در 12000 g سانتریفیوژ شد. محلول رویی به‌منظور اندازه‌گیری TPC به‌روش Folin-Ciocalteu مورد استفاده قرار گرفت (۲۷). کمی‌سازی TPC در نمونه‌ها بر اساس منحنی استاندارد ترسیم شده در ۷۶۵ نانومتر با غلظت‌های مختلف (۰/۵ - ۰ میلی‌گرم در لیتر) محلول‌های اسید گالیک (GAE) انجام شد. TPC در عصاره‌ها به‌صورت mg GAE g⁻¹ DW گزارش شد.

تعیین محتوای پرولین: محتوای پرولین موجود در برگ گیاهان سیب زمینی تیمار شده با غلظت‌های مختلف PZA و AgNO₃ به‌روش Bates و همکاران (۲۹) اندازه‌گیری شد. مطابق این روش، ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت تر گیاه با سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد (w/v) ساییده و به‌طور کامل همگن شد. سپس عصاره حاصل به‌مدت ۲۰ دقیقه در 14000 g سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۱ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین اضافه و بعد از ۱ ساعت انکوبه کردن در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد ترکیبی صورتی رنگی به‌دست آمد. در مرحله بعد، پس از سرد شدن محلول حاصل، به هر نمونه ۲ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد. جذب نوری محلول رویی هر نمونه در طول موج ۵۲۰ نانومتر، توسط دستگاه طیف‌سنج نوری خوانده شد. مقدار پرولین بر حسب μ mol g FW⁻¹ بیان شد.

۳- آنالیز آماری

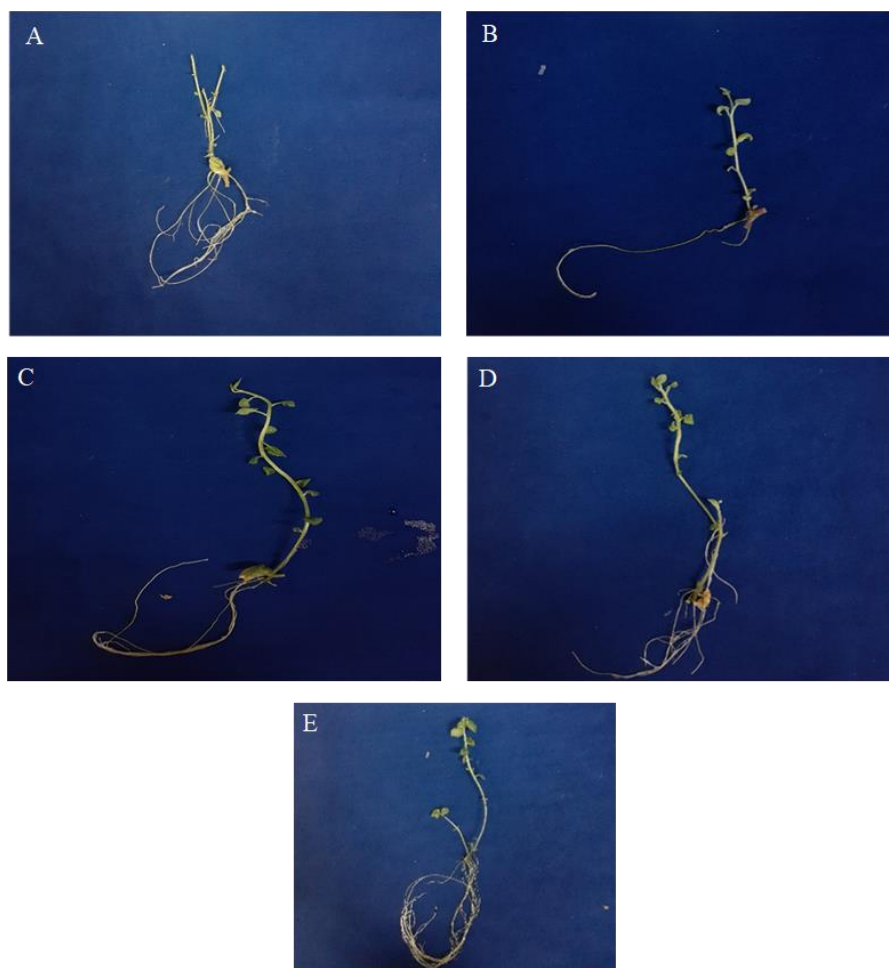
تمامی آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با حداقل سه تکرار در هر تیمار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به کمک نرم افزار SPSS (version 26) و براساس آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه ANOVA، در سطح احتمال $p > 0/05$ و به‌دنبال آن آزمون دانکن انجام شد. برای رسم نقشه حرارتی روابط بین تمام پارامترهای اندازه‌گیری شده، ضرایب همبستگی پیرسون با

استفاده از نرم افزار PAST (نسخه ۴/۱۳) محاسبه شد. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA)، برای نشان دادن الگو و رابطه بین تیمارهای مورد استفاده و شاخص‌های رشدی و بیوشیمیایی، با استفاده از همین نرم افزار انجام شد (۲۸). مقادیر نشان داده شده در جداول و شکل‌ها میانگین \pm انحراف استاندارد است.

۴- نتایج

اثر PZA در رشد ظاهری گیاه سیب زمینی

شکل ۱، رشد ظاهری گیاهچه‌های سیب زمینی رشد یافته در محیط کشت MS (به عنوان نمونه‌های شاهد)، محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف PZA و محیط کشت MS با غلظت $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۱، غلظت $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ PZA}$ منجر به بهبود ظاهری رشد و عدم بروز ناهنجاری‌های ناشی از تجمع اتیلین نسبت به غلظت‌های $4 \text{ mg L}^{-1} \text{ PZA}$ و $6 \text{ mg L}^{-1} \text{ PZA}$ شد. کاهش رشد و تغییر خصوصیات مورفولوژی و ظاهری همچون کاهش سطح پهنک برگ‌ها، زرد شدن برگ‌ها، ریزش برگ‌ها، افزایش طول میان‌گره‌ها، ضخیم شدن ساقه و افزایش قطر آن، ظهور و رشد ریشه‌های موئین نابجا بر اندام هوایی گیاه در نوساقه‌های رشد یافته در محیط کشت MS ساده (A) مشاهده شد. همچنین، ریشه‌های موئین نابجا بر روی اندام فرعی گیاهچه‌ها در غلظت‌های $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ PZA}$ ، 4 ، 6 گزارش نشد.



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف PZA و AgNO_3 بر رشد ظاهری گیاهچه‌های سیب زمینی. (A) محیط کشت MS، (B) محیط کشت MS + $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ PZA}$ ، (C) محیط کشت MS + $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ PZA}$ + $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ ، (D) محیط کشت MS + $4 \text{ mg L}^{-1} \text{ PZA}$ + $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ ، (E) محیط کشت MS + $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ AgNO}_3$.

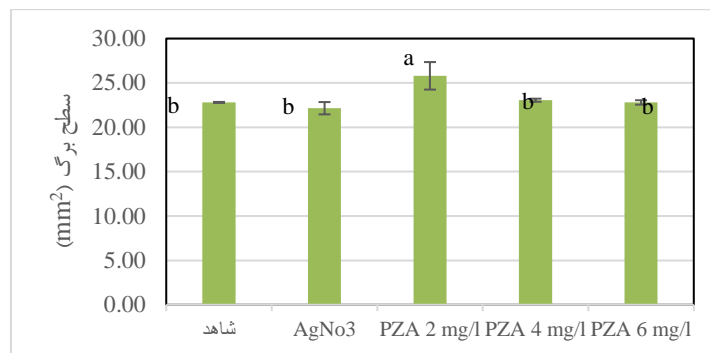
اثر PZA روی شاخص‌های رویشی

در پژوهش حاضر، شاخص‌های رشدی گیاهچه‌های سیب زمینی تیمار شده با غلظت‌های مختلف PZA و AgNO_3 مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های مربوط به وزن تر و خشک، طول ساقه و ریشه، تعداد برگ و ریشه و تاثیر تیمارهای به کار رفته در ریشه‌دهی سیب زمینی در جدول ۱ نشان داده شده است. تیمارهای اعمال شده بر روی گیاهان مورد آزمایش تغییرات معنی‌داری ($P < 0.05$) را نشان دادند. در بین گیاهان مورد مطالعه، بیش‌ترین میزان وزن تر (2.38 g)، وزن خشک (0.10 g)، تعداد برگ‌ها ($40/67$) در نمونه‌های تیمار شده با 2 mg L^{-1} PZA مشاهده شد. همچنین طول‌ترین ساقه (58 cm) در گیاهان تیمار شده با بالاترین غلظت از PZA (6 mg L^{-1}) قابل مشاهده بود. علاوه‌براین، طول‌ترین ریشه‌ها ($66/43 \text{ cm}$) نیز در گیاهان تیمار شده با AgNO_3 گزارش شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیش‌ترین و کمترین نسبت طول ساقه به طول ریشه به ترتیب در گیاهانی برآورد شد که در معرض غلظت‌های 6 mg L^{-1} PZA و 2 mg L^{-1} PZA بودند. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، تمام گیاهان کشت شده در غلظت‌های مختلف PZA و AgNO_3 ریشه‌دار بودند و بیش‌ترین تعداد ریشه در گیاهان کشت شده در محیط حاوی 2 mg L^{-1} PZA و 6 mg L^{-1} PZA مشاهده شد.

جدول ۱: اثر غلظت‌های مختلف PZA و AgNO_3 بر شاخص‌های رشدی گیاه سیب زمینی. داده‌ها به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. حروف متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) براساس آزمون دانکن است.

تیمارها	شاهد	PZA		
		6 mg L^{-1}	2 mg L^{-1}	4 mg L^{-1}
وزن تر (g)	$2.26 \pm 0.02b$	$2.38 \pm 0.02a$	$2.38 \pm 0.02a$	$1.98 \pm 0.05c$
وزن خشک (g)	$0.09 \pm 0.005a$	$0.10 \pm 0.001a$	$0.10 \pm 0.001a$	$0.07 \pm 0.007ab$
طول ساقه (cm)	$48/70 \pm 7/1ab$	$58/00 \pm 4/61a$	$42/33 \pm 0/72b$	$38/43 \pm 2/31b$
طول ریشه (cm)	$57/90 \pm 1/21abc$	$66/43 \pm 1/70a$	$59/33 \pm 1/92ab$	$50/15 \pm 6/35bc$
نسبت طول ساقه به طول ریشه	0.84	0.71	0.71	0.77
تعداد برگ‌ها	$54/67 \pm 2/02a$	$40/67 \pm 1/91b$	$34/00 \pm 2/60c$	$37/00 \pm 2/02bc$
تعداد ریشه	$5/33 \pm 0.58b$	$6/33 \pm 1/56ab$	$5/00 \pm 0.20b$	$10/00 \pm 1/08a$
تعداد نمونه ریشه‌دار	$3/67 \pm 0.57ab$	$3/33 \pm 0.56ab$	$3/00 \pm 0.15b$	$3/33 \pm 0.18ab$
نسبت سطح برگ به طول ساقه	0.47	0.91	0.61	0.60

همچنین، شکل ۲ اثر غلظت‌های مختلف PZA و AgNO_3 بر اندازه سطح برگ سیب زمینی را نشان می‌دهد. بیش‌ترین مساحت برگ‌ها در گیاهان تیمار شده ($54/67 \text{ mm}^2$) با کم‌ترین غلظت PZA گزارش شد که تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد و سایر نمونه‌های تحت تیمار داشتند. همچنین، یافته‌های حاضر نشان دادند که با افزایش غلظت PZA به کار برده شده در محیط کشت، نسبت سطح برگ به طول ساقه نیز کاهش یافت (جدول ۱). این نسبت در گیاهان تیمار شده با غلظت 2 mg L^{-1} PZA ۶ کاهش معنی‌داری در حدود ۵۳ درصد نسبت به گیاهان رشد یافته در محیط کشت حاوی 2 mg L^{-1} PZA داشتند. نسبت سطح برگ به ساقه در گیاهان قرار گرفته در معرض 2 mg L^{-1} AgNO_3 حدود ۲ برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود و نسبت به سایر غلظت‌های PZA نیز افزایش معنی‌داری نشان دادند.



شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف PZA و AgNO₃ بر اندازه سطح برگ گیاه سیب زمینی. داده‌ها به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) براساس آزمون دانکن است.

اثر PZA بر روی برخی شاخص‌های بیوشیمیایی

جدول ۲، اثر تیمارهای AgNO₃ و PZA بر روی برخی شاخص‌های بیوشیمیایی نظیر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل *a* و *b* و کاروتنوئیدها، H₂O₂، ROS، کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل، فنل کل و پرولین را نشان می‌دهد. بررسی اثر بازدارنده‌های اتیلین بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی به‌طور غیرمستقیم می‌تواند اثر این هورمون بر روی میزان فتوسنتز را نشان دهد. با توجه به یافته‌های این مطالعه، به‌دنبال بهبود شاخص‌های رشدی گیاهان سیب زمینی تیمار شده با غلظت PZA ۲ mg L⁻¹، محتوای کلروفیل *a* (0.62 mg g⁻¹ FW)، کلروفیل *b* (0.16 mg g⁻¹ FW) و کلروفیل کل (0.78 mg g⁻¹ FW) در گیاهان تیمار شده با این غلظت قابل مقایسه با سطوح کلروفیل‌ها در گیاهان شاهد بود (جدول ۲). علاوه بر این، داده‌های حاصل نشان داد که محتوای کاروتنوئیدها به‌عنوان یک رنگیزه پاداکسیدانتی در گیاهان تحت تیمار با غلظت PZA ۲ mg L⁻¹ (1/80 mg g⁻¹ FW) افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد (حدود ۱/۴ برابر) و تیمار شده با سایر غلظت‌های PZA و همچنین AgNO₃ داشت.

جدول ۲: اثر غلظت‌های مختلف PZA و AgNO₃ بر شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه سیب زمینی. داده‌ها به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. حروف متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) براساس آزمون دانکن است.

PZA		شاهد	تیمارها
۶ mg L ⁻¹	۲ mg L ⁻¹		
0/14 \pm 0/02b	0/25 \pm 0/01b	0/62 \pm 0/01a	کلروفیل <i>a</i> (mg g ⁻¹ FW)
0/04 \pm 0/01a	0/07 \pm 0/01b	0/08 \pm 0/01b	کلروفیل <i>b</i> (mg g ⁻¹ FW)
0/18 \pm 0/03a	0/32 \pm 0/02b	0/78 \pm 0/02a	کلروفیل کل (mg g ⁻¹ FW)
0/56 \pm 0/09c	0/81 \pm 0/12c	1/80 \pm 0/08a	کاروتنوئید (mg g ⁻¹ FW)
0/0034a	0/0031a	0/0034a	H ₂ O ₂ (μ M g ⁻¹ FW)
2470/00 \pm 110a	1053/00 \pm 294/63bc	856/00 \pm 151c	کل ROS (RFU.mg ⁻¹ .Protein)
271/49 \pm 9/40b	275/78 \pm 18/81b	289/80 \pm 8/67b	فنل کل (mg GAE g ⁻¹ DW)
139/56 \pm 7/56a	60/92 \pm 3/40bc	37/51 \pm 1/21d	پرولین (μ mol g FW ⁻¹)
116/34 \pm 3/41a	119/74 \pm 3/95a	106/47 \pm 3/23b	ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل

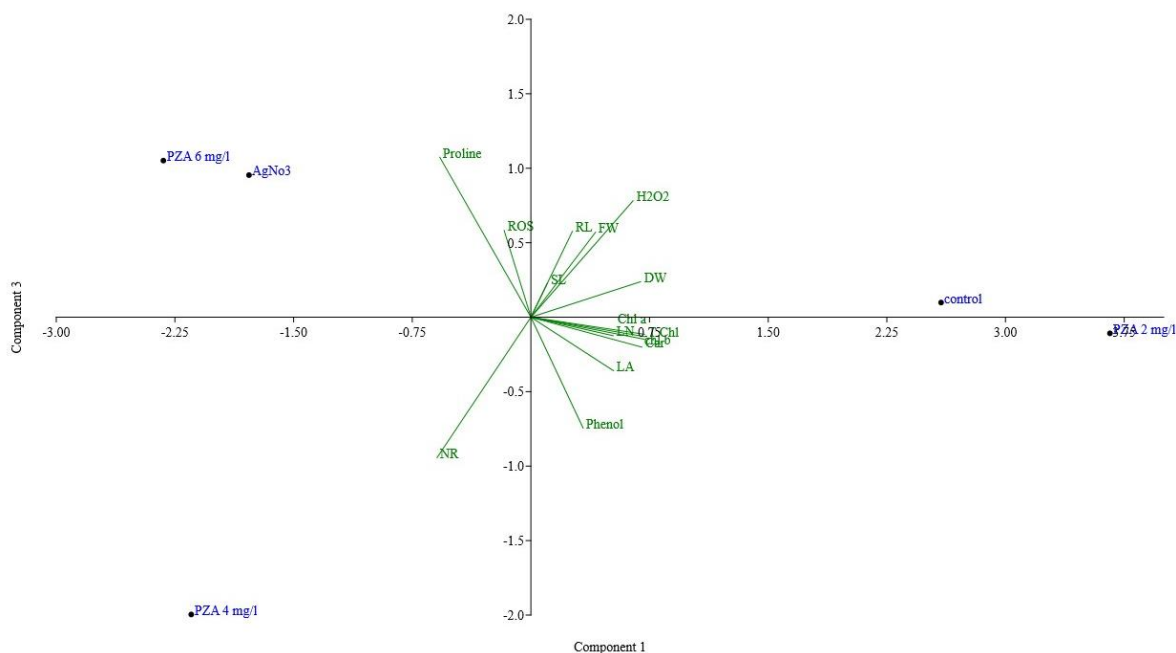
از آنجائی که تیمار گیاهان سیب زمینی با بازدارنده‌های اتیلن می‌تواند منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و در نتیجه ایجاد تنش اکسیداتیو شود. بنابراین اندازه‌گیری محتوای ROS کل و H_2O_2 در گیاهان تیمار شده با بازدارنده‌های اتیلن ضروری به نظر می‌رسد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که محتوای H_2O_2 تولید شده در گیاهان تیمار شده با بازدارنده‌های اتیلن تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد نداشتند.

با افزایش مقدار PZA، محتوای ROS کل در گیاهان مورد مطالعه افزایش می‌یابد، به طوری که مقدار ROS کل در گیاهان تیمار شده با بالاترین غلظت به کار برده شده از PZA (6 mg L^{-1}) ۳۶ درصد بیش‌تر از گیاهان شاهد بود (جدول ۲). نکته جالب توجه این بود که غلظت‌های PZA 2 mg L^{-1} و ۴ و $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ منجر به کاهش محتوای ROS کل نسبت به گیاهان شاهد شد.

بررسی اثر PZA و AgNO_3 بر محتوای ترکیبات فنل کل (TPC) و پرولین نشان داد که تیمار PZA اثر معنی‌داری بر روی محتوای TPC نسبت به گیاهان شاهد نداشت اما تیمار گیاهان سیب زمینی با AgNO_3 منجر به کاهش ۶۱ درصدی TPC نسبت به گیاهان شاهد شد. همچنین، نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوای پرولین در گیاهان مورد مطالعه نشان می‌دهد که با افزایش غلظت PZA محتوای این آمینواسید نیز افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) داشت. بیش‌ترین مقدار پرولین در گیاهان تیمار شده با PZA 6 mg L^{-1} ارزیابی شد که بیش از $3/2$ برابر مقدار گزارش شده در گیاهان شاهد ($43/25 \mu \text{ mol g FW}^{-1}$) بود. همچنین محتوای پرولین در گیاهان تیمار شده با AgNO_3 ($124/41 \mu \text{ mol g FW}^{-1}$) تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) با محتوای این آمینواسید در گیاهان شاهد نشان داد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل گیاهان سیب زمینی مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. براساس یافته‌های حاضر، ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل در گیاهان تحت تیمار با غلظت‌های PZA 4 mg L^{-1} و ۶ به ترتیب در حدود ۱۲ و ۹ درصد افزایش و گیاهان تیمار شده با AgNO_3 افزایش معنی‌داری در حدود ۶ درصد را نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل اجزای اصلی (PCA)، دسته‌بندی بین گیاهان سیب زمینی تحت تیمار با PZA و AgNO_3 را تایید کرد و روابط بین پارامترهای اندازه‌گیری شده و غلظت الیسیتورهای به کار برده شده را نشان داد (شکل ۴). دو جزء اصلی (PC1 و PC3) به ترتیب ۵۵/۵۰ و ۱۰/۰۳ درصد از کل واریانس در گیاهان شاهد و تحت تیمار را توضیح دادند. گیاهان مورد مطالعه به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول شامل گیاهان شاهد بود که عمدتاً دارای وزن تر و خشک بالاتر و ریشه‌های طویل‌تر نسبت به گیاهان تیمار شده بودند. گیاهان تیمار شده با کم‌ترین غلظت PZA (2 mg L^{-1}) گروه دوم را تشکیل دادند که بیش‌تر به دلیل محتوای بالای رنگیزه‌های فتوسنتزی و TPC و سطح برگ بیشتر کنار هم‌دیگر قرار گرفتند. گیاهان تیمار شده با غلظت متوسط PZA (4 mg L^{-1}) با تعداد بیشتر ریشه همبستگی دارند. در نهایت، گیاهان تیمار شده با PZA 6 mg L^{-1} و $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ از گیاهان شاهد و تیمار شده با سایر غلظت‌های PZA جدا شدند، زیرا حاوی مقادیر بالایی از ROS کل و پرولین بودند (شکل ۳).



شکل ۳: PCA biplot شاخص های رشدی و بیوشیمیایی گیاهان شاهد و تیمار شده با AgNO_3 و SNP: وزن تر؛ DW: وزن خشک؛ SL: طول ساقه؛ RL: طول ریشه؛ LA: سطح برگ؛ LN: تعداد برگ؛ NR: تعداد ریشه؛ Chl a: کلروفیل a؛ Chl b: کلروفیل b؛ T Chl: کلروفیل کل؛ Car: کاروتنوئید.

۳- بحث

اثر PZA روی رشد ظاهری و شاخص های رویشی

بر اساس نتایج به دست آمده، گیاهچه های سیب زمینی رشد کرده در محیط کشت حاوی 2 mg L^{-1} PZA از نظر ظاهری رشدی مشابه با گیاهچه های رشد کرده در محیط MS (شاهد) داشتند. افزایش سطح برگ و عدم ریشه زایی بخش های هوایی از مهم ترین نمودهای ظاهری بازدارندگی اتیلن بود که در نمونه های مورد مطالعه مشاهده شد. می توان اظهار داشت که PZA، به عنوان مهارکننده بیان ژن ACC اکسیداز، همانند AgNO_3 ، منجر به توقف یا کاهش تولید این فیتوهورمون و در نتیجه سبب بهبود رشد و نمو گیاه سیب زمینی شد. Ehasanpour و Rostami (۳۰) نشان دادند که استفاده از بازدارنده های اتیلن مانند AgNO_3 و PZA اثرات مطلوبی بر شاخص های رشدی گیاه گوجه فرنگی تحت تنش شوری داشته و اثرات منفی تنش شوری را به طور چشمگیری کاهش داده است.

گیاهچه های رشد یافته در غلظت های بالاتر PZA رشد کمتری نسبت به گیاهچه های رشد یافته در محیط کشت حاوی غلظت بهینه از PZA (2 mg L^{-1}) را نشان دادند که احتمالاً به دلیل افزایش تولید و تجمع اتیلن در شیشه بود. همچنین، گیاهان رشد یافته در غلظت بهینه PZA به طور معنی داری ($P < 0.05$) سطح برگ بزرگتری نسبت به گیاهان شاهد و تیمار شده با غلظت های بالاتر PZA و AgNO_3 داشتند (شکل ۲). مشابه نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، تیوسولفات نقره، به عنوان بازدارنده فعالیت و عملکرد اتیلن، نیز اثر افزایشی بر سطح برگ سیب زمینی داشت (۰۳).

با توجه به کاهش وزن خشک در گیاهان تیمار شده با غلظت های 4 mg L^{-1} PZA و ۶ نسبت به گیاهان شاهد (جدول ۲)، احتمال می رود این کاهش به علت بروز سمیت ناشی از افزایش غلظت PZA باشد. همچنین، تغییر معنی داری ($P < 0.05$) در

طول ساقه گیاهان رشد یافته در غلظت بهینه PZA با گیاهان شاهد مشاهده نشد. به طور مشابه یون کبالت هم که به عنوان ممانعت کننده بیوسنتز اتیلن شناخته می شود، تغییر معنی داری در طول ساقه سیب زمینی نسبت به گیاهان شاهد ایجاد نکرد (۱۸).

احتمالا PZA با ممانعت از بیان ژن ACC اکسیداز و کاهش تولید اتیلن در شرایط کشت در شیشه می تواند بر روند تقسیم سلولی اثر گذاشته و با افزایش سرعت تقسیم سلولی و افزایش تعداد سلول در واحد سطح می تواند رشد سیب زمینی را بهبود بخشیده و برگ های بزرگ تری را تولید نماید. بر اساس نتایج حاصل، بیشترین افزایش سطح برگ در گیاهان تیمار شده با 2 mg L^{-1} PZA مشاهده شد. داده های به دست آمده در این پژوهش با نتایج گزارش شده در مطالعات پیشین در رابطه با کاربرد بازدارنده های فعالیت و عملکرد اتیلن نظیر سدیم تیوسولفات (۳۰) و نانوقره (۳۱) روی گیاه سیب زمینی مطابقت داشت.

اثر PZA بر روی برخی شاخص های بیوشیمیایی

با توجه داده های بدست آمده در این مطالعه می توان اظهار داشت که، مهارکننده های اتیلن مانند PZA می توانند بر محتوای رنگیزه های فتوسنتزی از جمله کلروفیل ها اثر داشته باشند. Cefola و همکاران (۳۲) نشان دادند که بین انباشت اتیلن در ظروف کشت بافت و محتوای کلروفیل ها ارتباط عکس وجود دارد. بنابراین، افزایش مشاهده شده در محتوای کلروفیل ها را شاید بتوان به کاهش تولید اتیلن در این غلظت مرتبط دانست. همچنین، افزایش غلظت PZA و غلظت $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ منجر به کاهش محتوای رنگیزه های کلروفیلی شد. براساس مطالعات پیشین، افزایش مقدار اتیلن می تواند منجر به تحریک کاتابولیسم، افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز و تخریب این رنگیزه ها و در نتیجه کاهش محتوای آن ها شود.

علاوه بر این، داده های حاصل نشان داد که محتوای کاروتنوئیدها نیز تحت تاثیر غلظت های مختلف از PZA و AgNO_3 است.

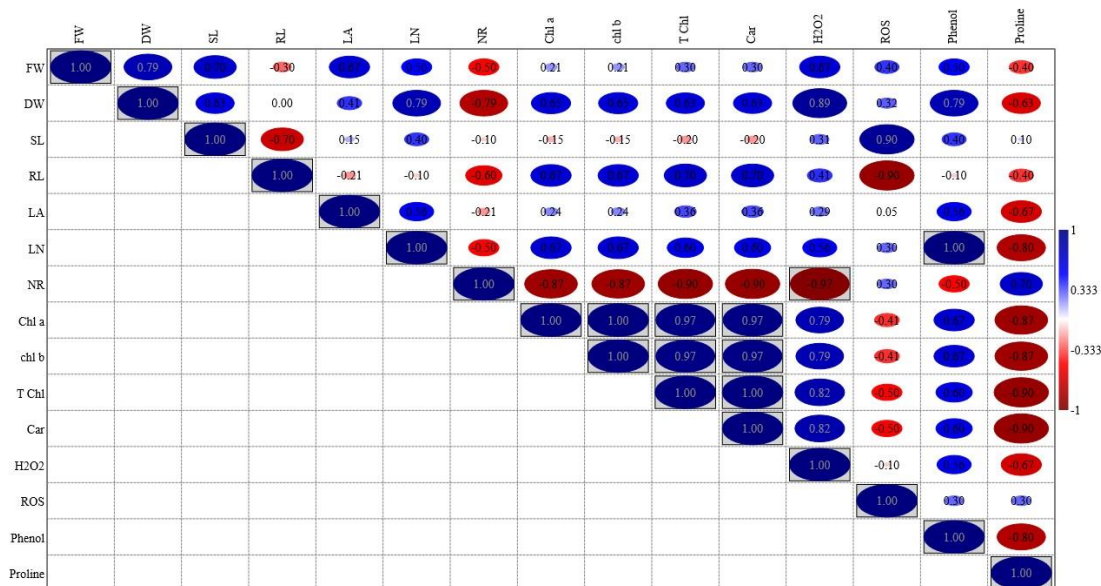
PZA در کمترین غلظت به کار رفته در این پژوهش می تواند با مهار تولید اتیلن موجب افزایش سطوح رنگیزه های فتوسنتزی از جمله کاروتنوئیدها شود. افزایش سطح اتیلن در گیاهان علاوه بر تخریب کلروفیل ها، در تغییر محتوای کاروتنوئیدها نیز نقش ایفا می کند (۳۳).

نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت های 4 mg L^{-1} AZP و 6 mg L^{-1} و $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ سبب کاهش محتوای کاروتنوئیدها نسبت به گیاهان شاهد شد که می تواند ناشی از اثر سمیت این ترکیبات و تحریک تولید اتیلن باشد. شکل ۳، ارتباط بین پارامترهای بررسی شده در این پژوهش را نشان می دهد. براساس این شکل، محتوای رنگیزه های فتوسنتزی با تعداد ریشه گیاهان تحت تیمار همبستگی قوی و منفی ($r^2 = -0/09$) داشت.

گونه های فعال اکسیژن (ROS) مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) معمولاً به دلیل مواجهه گیاه با تنش های مختلف در برگ ها و سایر اندام های گیاهی انباشته می شوند. مقادیر بالای ROS منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو و آسیب به اندام های سلولی و اجزای غشایی می شود (۳۴). براساس نتایج ارائه شده در جدول ۲، تیمارهای AgNO_3 و PZA در غلظت های پایین تاثیر محافظتی قابل توجهی در برابر تنش اکسیداتیو دارند. کاهش تولید اتیلن و کاهش تنش اکسیداتیو می تواند مسئول رشد گیاهچه های سیب زمینی باشد. شکل ۳ نشان می دهد، محتوای ROS انباشته شده در گیاهان سیب زمینی با طول ساقه همبستگی مثبت و معنی دار ($r^2 = +0/09$) و با طول ریشه همبستگی منفی و معنی دار ($r^2 = -0/09$) داشت.

گیاهان برای اجتناب از اثرات سوء ROS از راهبردهای ویژه ای از جمله تولید ترکیبات آنتی اکسیدانت آنزیمی و غیر آنزیمی استفاده می کنند. یکی از مهم ترین ترکیبات آنتی اکسیدانت غیر آنزیمی، ترکیبات فنلی می باشند که یکی از بزرگ ترین گروه های متابولیت های ثانویه بوده و با مهار فعالیت رادیکال های آزاد از آسیب های اکسیداتیو به سلول های گیاهی ممانعت می کنند. آن ها در مکانیسم های دفاعی گیاه نقش ویژه ای را بازی می کنند (۳۵). با توجه به نتایج به دست آمده می توان اظهار داشت PZA اثر

قابل توجهی بر مسیر تولید ترکیبات فنلی در گیاهان سیب زمینی نداشته است. با توجه به اینکه غلظت 2 mg L^{-1} PZA منجر به افزایش تعداد برگ ها شد، کاملاً منطقی به نظر می رسد که TPC در این گیاهان افزایش داشته باشد بنابراین یک همبستگی مثبت و بسیار قوی بین تعداد برگ ها و TPC ($r^2 = 1$) مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴: تجزیه و تحلیل نقشه حرارتی و ضریب همبستگی پیرسون (ρ) برای نمونه های شاهد و تیمار شده با AgNO_3 و SNP. نقشه حرارتی تغییرات در تمام صفات مورد مطالعه را مقایسه می کند. رنگ آبی نشان دهنده همبستگی مثبت و رنگ قرمز نشان دهنده همبستگی منفی بین صفات مورد مطالعه می باشد. FW: وزن تر؛ DW: وزن خشک؛ SL: طول ساقه؛ RL: طول ریشه؛ LA: سطح برگ؛ LN: تعداد برگ؛ NR: تعداد ریشه؛ Chl a: کلروفیل a؛ chl b: کلروفیل b؛ T Chl: کلروفیل کل؛ Car: کاروتنوئید.

پرویلین نقش مهمی در حفظ متابولیسم و رشد گیاهان در شرایط تنش غیرزیستی ایفا می کند. مطالعات پیشین نشان دهنده رابطه مثبت بین انباشت پرویلین و تحمل گیاهان به تنش های غیرزیستی مختلف است. این آمینواسید یک مولکول دفاعی آنتی اکسیدانتی است که گونه های فعال اکسیژن (ROS) را از بین می برد و نقش مهمی در بازیابی گیاهان در تنش ها دارد. تولید بیش از حد پرویلین در سلول های گیاهی به حفظ هم ایستایی سلول، جذب آب، تنظیم اسمزی و تعادل ردوکس برای بازیابی ساختارهای سلولی و کاهش آسیب های اکسیداتیو کمک می کند (۳۶). نکته جالب توجه این بود که تجمع پرویلین در برگ گیاهان با تعداد و سطح برگ در نمونه های تیمار شده همبستگی منفی و با تعداد ریشه های آنها همبستگی مثبت داشت (شکل ۴). همچنین نتایج نشان داد، هر چه مقدار پرویلین در برگ های تیمار شده افزایش یافت، محتوای رنگیزه های فتوسنتزی کاهش پیدا کرد.

علاوه بر این، ظرفیت آنتی اکسیدانتی کل، یکی از نشانگرهای مهم در ارزیابی مقاومت گیاهان در مقابل تنش های محیطی به شمار می رود. افزایش فعالیت سیستم آنتی اکسیدانتی، ترکیبات ROS را حذف کرده و خسارات ناشی از تنش را بهبود می بخشد. به این ترتیب می توان بیان کرد که یکی از راهکارهای دفاعی گیاه سیب زمینی برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط الیستورهای به کار برده شده در این مطالعه، افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانتی کل گیاه بود.

۶- نتیجه‌گیری

در مقاله حاضر به بررسی اثر مهارکننده‌های اتیلن، PZA و AgNO₃، بر برخی شاخص‌های رشدی و بیوشیمیایی گیاه سیب زمینی پرداخته شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که PZA در غلظت‌های کم به‌عنوان محرکی با توانایی مهار تولید اتیلن در این گیاهان، منجر به کاهش سطح اتیلن شد. از علائم کاهش محتوای این تنظیم‌کننده رشد گیاهی می‌توان به کاهش ناهنجاری‌های رشد نسبت به نمونه‌های شاهد اشاره کرد. همچنین، افزایش سطح برگ نسبت به نمونه شاهد و عدم ریشه‌زایی بخش‌های هوایی در گیاهچه‌های سیب زمینی از آثار مهم بازدارندگی اتیلن بود که در گیاهان تحت تیمار با این غلظت از PZA مشاهده شد. علاوه‌براین، داده‌های حاصل نشان داد که در بالاترین غلظت PZA (6mg L⁻¹) به‌علت افزایش محتوای ROS کل، احتمال بروز تنش اکسیداتیو بالا بود. پاسخ گیاهان تیمار شده با این غلظت از PZA و 2 mg L⁻¹ AgNO₃، افزایش محتوای پرولین بود. به‌نظر می‌رسد این افزایش در مقدار آمینواسید مذکور با هدف کاهش آسیب‌های ناشی از بروز تنش اکسیداتیو بوده است. این بازدارنده‌ها می‌توانند بینشی ارزشمند در رابطه با پاسخ‌های اتیلن در گیاهان و راهبردهای بالقوه برای توسعه گونه‌های گیاهی مقاوم به تنش‌های مختلف را ارائه دهند. بنابراین، تحقیقات بیش‌تری برای بررسی تعاملات بین بازدارنده‌ها و مسیر سیگنال‌دهی اتیلن و تایید کاربرد عملی آن‌ها در کشاورزی مورد نیاز است.

۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از قطب آنتی اکسیدانت‌های گیاهی و دانشگاه اصفهان به‌واسطه حمایت از این پژوهش تشکر می‌نمایند.

۸- منابع

- Koch M, Naumann M, Pawelzik E, Gransee A, Thiel H. The importance of nutrient management for potato production Part I: Plant nutrition and yield. *Potato Research*. 2020;63:97-119.
- Hidayat W, Sufiawati I, Satari MH, Lesmana R, Ichwan S. Pharmacological Activity of Chemical Compounds of Potato Peel Waste (*Solanum tuberosum* L.) in vitro: A Scoping Review. *Journal of Experimental Pharmacology*. 2024;61-69.
- Koch L, Lehretz GG, Sonnewald U, Sonnewald S. Yield reduction caused by elevated temperatures and high nitrogen fertilization is mitigated by SP6A overexpression in potato (*Solanum tuberosum* L.). *The Plant Journal*. 2024;1702-1715.
- Nikolaeva F, Lukina F, editors. *Potato farming biologization as a food security basis*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science; 2022: IOP Publishing.
- FAOSTAT: Food and Agriculture Organization of the United Nations. *World Food and Agriculture – Statistical Yearbook (2022)* Available online: <https://www.fao.org/3/cc2211en/cc2211en.pdf>.
- Mohapatra PP, Batra V. Tissue culture of potato (*Solanum tuberosum* L.): A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2017;6(4):489-495.
- Iqbal N, Khan NA, Ferrante A, Trivellini A, Francini A, Khan M. Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:475.
- Neves M, Correia S, Canhoto J. Ethylene Inhibition Reduces De Novo Shoot Organogenesis and Subsequent Plant Development from Leaf Explants of *Solanum betaceum* Cav. *Plants*. 2023;12(9): 1-16.
- Zarei S, Ehsanpour AA, Javadirad SM. In vitro impact of Pyrazinamide (PZA), AgNO₃ and salinity on the expression of ACS3, ACO1, EIN2, and EIL1 genes in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2024;156(2):1-7.

10. Růžička K, Ljung K, Vanneste S, Podhorská R, Beeckman T, Friml Ji, Benková E. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell*. 2007;19(7): 2197-2212.
11. Lewis DR, Negi S, Sukumar P, Muday GK. Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development*. 2011;138(16):3485-95.
12. Qiu Y, Tao R, Feng Y, Xiao Z, Zhang D, Peng Y, et al. EIN3 and RSL4 interfere with an MYB–bHLH–WD40 complex to mediate ethylene-induced ectopic root hair formation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021;118(51):e2110004118.
13. Dubois M, Van den Broeck L, Inzé D. The pivotal role of ethylene in plant growth. *Trends in Plant Science*. 2018;23(4):311-323.
14. Hasan MM, Liu X-D, Yao G-q, Liu J, Fang X-W. Ethylene-mediated stomatal responses to dehydration and rehydration in seed plants. *Journal of Experimental Botany*. 2024:1-14.
15. Pengelly WL, Su LY. Ethylene and plant tissue culture. *The plant hormone ethylene*. 2018:259-278.
16. Trujillo-Moya C, Gisbert C. The influence of ethylene and ethylene modulators on shoot organogenesis in tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2012;111:41-48.
17. Biddington N. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant growth regulation*. 1992;11:173-187.
18. Taghizadeh M, Ehsanpour A. The in vitro effects of CoCl₂ as ethylene synthesis inhibitor on PI based protein pattern of potato plant (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Cell and Molecular Research*. 2013;5(1):42-46.
19. Adly WM, Mazrou YS, EL-Denary ME, Mohamed MA, Abd El-Salam E-ST, Fouad AS. Boosting polyamines to enhance shoot regeneration in potato (*Solanum tuberosum* L.) Using AgNO₃. *Horticulturae*. 2022;8(2):1-13.
20. Zarei S, Ehsanpour AA. Ethylene inhibition with silver nitrate (AgNO₃) and pyrazinamide (PZA) ameliorates in vitro salt tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2023: 1-9.
21. Sun X, Li Y, He W, Ji C, Xia P, Wang Y, et al. Pyrazinamide and derivatives block ethylene biosynthesis by inhibiting ACC oxidase. *Nature Communications*. 2017;8(1): 15758.
22. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-97.
23. Arnon D. Copper enzymes in isolated chloroplast. *Plant Physiology*. 1949;24:1-15.
24. Lichtenthaler H. Chlorophyll and carotenoids—pigments of photosynthetic biomembrances za Colowick SP, Kaplan NO *Methods in Enzymology*. Vol. 148. Academic Press, San Diego—New York—Berkley—Boston—London—Sydney—Tokyo—Toronto; 1987.
25. Sergiev I, Alexieva V, Karanov E. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*. 1997;51(3):121-124.
26. Mahalingam R, Jambunathan N, Gunjan SK, Faustin E, Weng H, Ayoubi P. Analysis of oxidative signalling induced by ozone in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell & Environment*. 2006;29(7):1357-1371.
27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1-2):248-254.
28. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. 2007;2(4):875-887.

29. Bates LS, Waldren Ra, Teare I. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973;39:205-217.
30. Rostami F, Ehsanpour A. Application of Silver Thiosulfate (STS) on Silver Accumulation and Protein Pattern of Potato under in vitro Culture. *Malaysia Application of Biology*. 2009;38(2):49-54.
31. Ehsan Pour AA, Nejati Z. Effect of nanosilver on chlorophyll, gibberellic acid content and electrophoresis pattern of proteins of potato (*Solanum tuberosum* L.) under in vitro culture. *Applied Biology*. 2013;25(2): 13-26.
32. Cefola M, Amodio ML, Rinaldi R, Vanadia S, Colelli G. Exposure to 1-methylcyclopropene (1-MCP) delays the effects of ethylene on fresh-cut broccoli raab (*Brassica rapa* L.). *Postharvest Biology and Technology*. 2010;58(1):29-35.
33. Liu Y, Lv G, Chai J, Yang Y, Ma F, Liu Z. The Effect of 1-MCP on the expression of carotenoid, chlorophyll degradation, and ethylene response factors in 'Qihong' kiwifruit. *Foods*. 2021;10(12):1-15.
34. Zhao S, Zhang Q, Liu M, Zhou H, Ma C, Wang P. Regulation of plant responses to salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):1-16.
35. Kumar S, Abedin MM, Singh AK, Das S. Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. *Plant phenolics in sustainable agriculture*. 2020:517-532.
36. Ghosh U, Islam M, Siddiqui M, Cao X, Khan M. Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. *Plant Biology*. 2022;24(2):227-239.