مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۲ شماره ۱ صفحه های ۶۵ تا ۷۴ (۱۴۰۰)
مقاله پژوهشی

ارزیابی درون شیشه‌ای برخی ویژگی‌های مورفولوژیک گردوهای تراریخت دارای ژن *Fld* در سطح‌های مختلف NaCl[1]

In Vitro Evaluation of Some Morphological Traits in Transgenic Persian Walnuts Harboring *Fld* Gene under Different Levels of NaCl

منصوره نظری، مسعود توحیدفر، حسین رامشینی و کورش وحدتی[2]*

چکیده

در ریزانداموارهای فتوسنتزکننده در پی کاهش فردوکسین در شرایط تنش، ناقل‌های الکترونی (نظیر فلاودوکسین) با عملکرد مشابه فردوکسین بیان می‌شوند. ژن کنترل‌کننده ناقل فلاودوکسین اختلال‌های ناشی از تنش‌های غیرزیستی در نقل و انتقال الکترون در فرآیند فتوسنتز را کاهش می‌دهد. به منظور بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک گردوهای تراریخت دارای ژن *Fld* در شرایط تنش شوری، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح به‌طورکامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. در این آزمایش، گردوهای ایرانی تراریخت دارای ژن *Fld* (رگه‌های ۲، ۳، ۱۳و ۱۷) و رقم چندلر به عنوان گیاه شاهد در سطح‌های مختلف تنش شوری ناشی از NaCl (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتیجه‌های به دست آمده، رگه ۱۳ دارای بیشترین تعداد برگ سالم (۱/۱۴)، قطر پینه (۱/۳۶ میلی‌متر) و تعداد برگ‌های بازیابی شده (۱/۱۳) در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl بود. رگه‌های تراریخت، ۳۵ روز در تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار با یک بار زیرکشت رشد کردند، در حالی‌که گیاهان شاهد چند روز پس از قرارگیری در محیط دارای ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl از بین رفتند. با انتقال ژن *Fld* به گردوی رقم چندلر مورد مطالعه که یک گیاه حساس به شوری است، ویژگی‌های رشدی آن در مواجه با تنش بهبود یافت.

واژه‌های کلیدی: تنش شوری، فردوکسین، فلاودوکسین، پینه، *Juglans regia* L.

مقدمه

تنش‌های غیرزیستی شامل الگوهای متغیر اقلیمی و خاک، باعث کاهش ۶۹/۱ درصدی عملکرد گیاهان می‌شوند (۱۶). شوری یک مشکل عمده برای عملکرد محصول‌های گیاهی است (۱۳). میزان زمین‌های زراعی در جهان، حدود ۱/۵ میلیارد هکتار است که از این مقدار، ۷۷ میلیون هکتار به دلیل شوری، برای کشت محصول‌های کشاورزی مناسب نیستند (۱۵). بیش از ۲۵ درصد از کشورهای خاورمیانه از مشکل شوری رنج می‌برند (۴). مشکل شوری در ایران ۱۵٪ از کل زمین‌های زراعی کشور ما را در بر می‌گیرد (۲۲).

گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) یکی از ارزشمندترین محصول‌های باغبانی در نواحی مرکزی، شمال غرب و شمال شرق ایران می‌باشد. گسترش طبیعی این‌گونه به‌طورکامل حساس به کیفیت آب آبیاری می‌باشد (۱۱). بر اساس آمار سازمان جهانی خواربار و کشاورزی (فائو) در سال ۲۰۱۸، سطح زیر کشت گردو در ایران ۱۴۶۵۶۵هکتار است که بعد از چین در رتبه دوم قرار دارد و با تولید ۴۰۹۵۶۲ تن گردو، بعد از چین و آمریکا، سومین تولیدکننده گردو در سطح جهان می‌باشد (۷)؛ بنابراین، رفع چالش‌های پیش روی این محصول در کشور از اهمیت زیادی برخوردار است و شناسایی و معرفی پایه‌های متحمل به خشکی و

۱- تاریخ دریافت: ۹۸/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۲۰

۲- به ترتیب دانشجوی پیشین کارشناسی ارشد، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، استاد، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، دانشیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات و استاد گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (kvahdati@ut.ac.ir).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.1.11.2]

شوری ضرورتی اجتناب‌ناپذیر می‌باشد (۱۷). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که در شوری‌های بالاتر از ۱/۵ دسی زیمنس بر متر، به ازای هر ۱ دسی زیمنس بر متر افزایش شوری در محل ریشه، میزان رشد و عملکرد درخت گردو ۱۸ تا ۲۱ درصد کاهش می‌یابد (۹). مهندسی ژنتیک می‌تواند راهکار مناسبی برای برطرف نمودن مشکل‌های کاشت و توسعه محصول‌های کشاورزی در زمین‌های شور باشد. کاربرد بیوتکنولوژی زراعی می‌تواند توسعه انواع گیاهان جدید که به تنش‌های محیطی مثل شوری و خشکی متحمل باشند را تسریع کند (۱). به تازگی، پژوهش‌های قابل ملاحظه‌ای برای شناسایی، جداسازی و تشخیص چندین ژن انجام شده است که می‌توانند تحمل به شوری را با مکانیسم‌های متفاوت بهبود بخشند (۸). توسعه گیاهان تراریخت با کمک مهندسی ژنتیک یکی از موفقیت‌های اصلی در علوم گیاهی است (۱۰).

تنش‌های محیطی باعث کاهش انتقال الکترون در مسیر فتوسیستم می‌شوند، فردوکسین یک ناقل الکترون در گیاهان می‌باشد که فعالیت آن در پاسخ به محرک‌های مختلف محیطی کاهش می‌یابد (۲۱). ریزانداموارهای فتوسنتزکننده در هنگام کاهش نامطلوب فردوکسین، بیان ناقل‌های الکترونی همانند فلاودوکسین که عملکرد مشابه فردوکسین را دارند، القا می‌کنند (۱۳). فردوکسین‌ها در همه موجودات اعم از پروکاریوت‌ها تا جانوران موجودند، اما فلاودوکسین‌ها تنها در بعضی از باکتری‌ها و جلبک‌های اقیانوسی یافت می‌شوند. فلاودوکسین در این موجودات می‌تواند القا کننده عملکرد فردوکسین در شرایط فقر آهن و تنش‌های محیطی باشد (۲۸). مزایای بیان فلاودوکسین می‌تواند به‌وسیله مهندسی ژنتیک به گیاهان نیز منتقل شود. گیاهان توتون تراریخت دارای ژن *Fld*[۱] در شرایط تنش، فلاودوکسین سیانوباکتریایی را جایگزین فردوکسین کردند و از این راه تحمل به چند تنش غیرزیستی را نشان دادند. این تنش‌ها شامل خشکی، شدت نور بالا، گرما، سرما، تابش اشعه فرابنفش و علفکش پاراکوات بود (۲۴). با انتقال این ژن به سیب‌زمینی مشاهده شد که پدیدگان‌های تراریخت حاصله نسبت به علف‌کش پاراکوآت و تنش‌های خشکی و اکسیداتیو تحمل بیشتری نشان دادند (۲۸). تاکنون گزارشی از انتقال این ژن به درختان منتشر نشده است.

در پژوهشی که مربوط به انتقال ژن *Fld* به رویان‌های رویشی گردوی ایرانی بود، مشخص شد که رویان‌های رویشی گردوی ایرانی دارای ژن *Fld* در محیط دارای تنش شوری و خشکی نسبت به رویان‌های گیاهان شاهد تحمل بیشتری داشتند. هم‌چنین تحمل رگه شماره ۴ گردوهای تراریخت دارای ژن *Fld* در محیط درون شیشه دارای ۲۰۰ میلی مولار NaCl به ثبت رسید (۱۹)، اگرچه شاخص‌های رویشی گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در شرایط اعمال و عدم اعمال تنش مورد بررسی قرار نگرفت.

هم‌چنین، در پژوهش دیگری، ژن *BADH*[۲] به رویان‌های رویشی گردو منتقل شد و نتیجه‌های این پژوهش نشان داد که گیاهان تراریخت دارای این ژن در شرایط تنش شوری و خشکی رشد مناسبی داشتند در حالی‌که گیاهان شاهد در محیط های تنش از بین رفتند (۱۸).

هدف از پژوهش حاضر، بررسی درون شیشه‌ای برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی رگه‌های باززایی شده (رگه‌های ۲، ۳، ۱۳ و ۱۷) گردوهای تراریخت دارای ژن *Fld* درشرایط تنش شوری ناشی از NaCl و مقایسه آن با گیاهان شاهد بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت گروه باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران در سال ۹۲-۱۳۹۱ اجرا شد. در این پژوهش از شاخساره‌های باززایی شده از رویان‌های رویشی گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) که در آزمایش‌ها و پژوهش‌های مقدماتی با پلاسمید دارای ژن *Fld* توسط اگروباکتریوم غیر بیماری‌زای C_{58} با ناقل دوتایی p6u-ubi-FVTI تراریخت شده بودند، استفاده شد (۲۱). ماده‌های گیاهی شامل ۴ رگه (L17,L13,L3,L2) بود. شاخساره‌های به دست آمده، طی چند بار زیرکشت و ریزافزایی روی محیط کشت DKW[۳] در اتاقک های رشد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت محیط تکثیر شدند (۳).

۱- Flavodoxin ۲- Betaine aldehyde dehydrogenase ۳- Driver and Kuniyuki Walnut

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.1.11.2]

محیط کشت DKW شامل سه دسته اصلی ترکیب‌ها، ماده‌های غذایی پرمصرف[1] ماده‌های غذایی کم مصرف[2] و ویتامین‌ها بود. در این محیط کشت هورمون‌های IBA به غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر و BAP با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. عنصرهای تشکیل‌دهنده این محیط کشت در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- عنصرهای غذایی لازم برای تهیه محلول‌های ذخیره محیط کشت DKW.

Table 1. Nutrients necessary to prepare stock solutions of DKW culture medium.

عنصرها Elements	فرمول شیمیایی Chemical formula	غلظت (گرم در لیتر) Concentration (g/L)
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	141.60
Calcium nitrate	$Ca(NO_3)_2,4H_20$	196.80
Zinc nitrate	$Zn(NO_3)_2$	1.70
Potassium sulfate	K_2SO_4	1.70
Magnesium sulfate	$MgSO_4,7H_20$	74.00
Manganese sulfate	$MnSO_4,H_20$	3.35
Copper sulfate	$CuSO_4,5H_20$	10 ml pre-stock (1.25 g/500 ml)
Potassium phosphate (monobasic)	KH_2PO_4	26.50
Boric acid	H_3BO_3	0.48
Sodium molybdate	$Na_2MoO_4,2H_2O$	10 ml pre-stock
EDDHA	$C_{18}H_{20}N_2O_6$	8
Thiamine	$C_{12}H_{17}ClN_4OS$	0.2
Nicotinic acid	$C_6H_5NO_2$	0.1
Glycine	$C_2H_5NO_2$	0.2
Myo-inositol	$C_6H_{12}O_6$	10.00

پژوهش حاضر، به منظور بررسی تحمل به تنش شوری شاخساره‌های تراریخت داری ژن *Fld*، در قالب آزمایش فاکتوریل و بر پایه طرح به طورکامل تصادفی با دو فاکتور و در ۴ تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل رگه در پنج سطح (چهار رگه تراریخت L17,L13,L3,L2 و یک رگه شاهد شامل گردوی ایرانی رقم چندلر) و فاکتور دوم شوری ناشی از NaCl در سه سطح (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار) بود. در هر تکرار یک رگه تراریخت در تیمار شوری ناشی از NaCl قرار گرفت. این گیاهان پس از ۸ زیرکشت و تکثیر کافی، روی محیط دارای سطوح مختلف شوری قرار گرفتند. شاخه‌های انتخاب شده برای زیرکشت در محیط‌های دارای شرایط شوری از نظر طول و قطر مشابه بودند. این شاخه‌ها هرکدام دارای دو برگ بودند. گیاهان به مدت ۶۰ روز در محیط تنش قرار داده شدند و در این مدت دو بار زیرکشت شدند. پس از این مدت برای ادامه رشد، به محیط بدون نمک منتقل شدند.

مقدار NaCl مورد نیاز برای تهیه محیط کشت بعد از افزودن محلول‌های ذخیره و پیش از تنظیم pH به محیط کشت اضافه شد. برای هر غلظتی محیط کشت به‌طور جداگانه ساخته شد. ده روز پس از اعمال تنش، ویژگی‌های مورد نظر اعم از تعداد برگ سالم، قطر پینه تشکیل‌شده و تعداد برگ باززایی شده شمارش و ثبت شد.

داده‌ها پیش از انجام تجزیه آماری، توسط آزمون نرمال بودن داده به روش جذری، نرمال شدند. تجزیه آماری داده‌های به دست آمده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ و توسط نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ انجام شد.

نتایج

نتیجه‌های تجزیه واریانس داده‌های اندازه‌گیری شده نشان داد که شاخساره‌های تراریخت و شاهد در هیچ‌کدام از ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در محیط بدون تنش شوری (0 mM) تفاوت معنی‌داری نداشتند (شکل ۱)، اما با افزایش تنش، بین گیاهان شاهد و تراریخت تفاوت رشدی معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۲).

۱- Macronutrients ۲- Micronutrients

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.1.11.2]

Fig.1. Height rate of the transgenic shoot no. 13 (right) and control (left) under no stress conditions.
شکل ۱- میزان ارتفاع شاخساره تراریخت ۱۳(سمت راست) و شاهد (سمت چپ) در شرایط بدون تنش.

Fig. 2. The difference in growth of the transgenic line no. 13 (right) and control (left) under 200 mM NaCl.
شکل ۲- تفاوت رشد رگه تراریخت ۱۳(سمت راست) و شاهد (سمت چپ) در غلظت شوری ۲۰۰ میلی مولار.

تعداد برگ سالم

نتیجه‌های تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری ویژگی‌های مختلف گیاهان تراریخت و غیرتراریخت نشان داد که تنها اثر اصلی سطوح شوری بر ویژگی تعداد برگ سالم در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود.

همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، گیاه شاهد در محیط بدون تنش نسبت به گیاهان تراریخت برگ سالم بیشتری داشت. به طورکلی، تعداد برگ در محیط دارای بالاترین غلظت نمک (۲۰۰ میلی‌مولار) کاهش یافت، این کاهش در گیاهان غیرتراریخت نسبت به تراریخت بیشتر بود (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۳ مشخص است، در شرایط تنش شوری، تعداد برگ سالم نسبت به شرایط بدون تنش کاهش معنی‌داری داشت (شکل ۳)، البته این کاهش بین رگه‌های مختلف معنی‌دار نبود، اما به طورکلی، رگه ۱۳ در شرایط تنش ۲۰۰ میلی مولار NaCl تعداد برگ سالم بیشتری (۱/۱۴) نسبت به شاهد داشت.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.1.11.2]

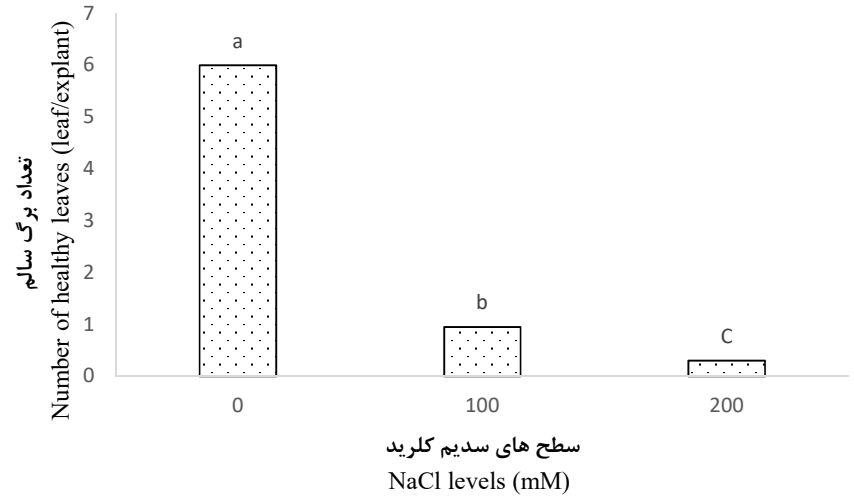

Fig. 3. Effect of different levels of NaCl on the number of healthy leaves.

شکل ۳- اثر سطح‌های مختلف NaCl بر تعداد برگ سالم.

قطر پینه ایجاد شده

براساس نتیجه‌های تجزیه واریانس داده‌ها، اثر اصلی رگه‌ها که شامل رگه‌ها ی تراریخت و غیرتراریخت بود و برهمکنش رگه‌ها × سطوح مختلف NaCl برای ویژگی قطر پینه در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود.

مقایسه میانگین ویژگی قطر پینه ایجاد شده اختلاف معنی‌داری بین قطر پینه در غلظت‌های مختلف نمک بین گیاهان تراریخت و غیر تراریخت نشان داد. همان‌طور که در شکل۴ نشان داده شده است با افزایش غلظت نمک در محیط کشت، قطر پینه گیاهان نسبت به محیط بدون تنش کاهش معنی‌داری داشت و این کاهش در گیاهان غیر تراریخت بیشتر بود، این نتیجه‌های نشان می‌دهد که در شرایط تنش گیاهان گردوی مورد آزمایش، پینه کمتری تولید کردند و این امر می‌تواند دلیل احتمالی از بین رفتن گیاه در شرایط تنش باشد. در تنش ۲۰۰ میلی مولار نمک، رگه ۱۳ نسبت به سایر رگه‌ها بهتر عمل کرد و بیشترین (۱/۳۶ سانتی متر) قطر پینه را داشت و رگه شاهد کمترین (۰/۷ سانتی متر) قطر پینه را دارا بود (شکل۵).

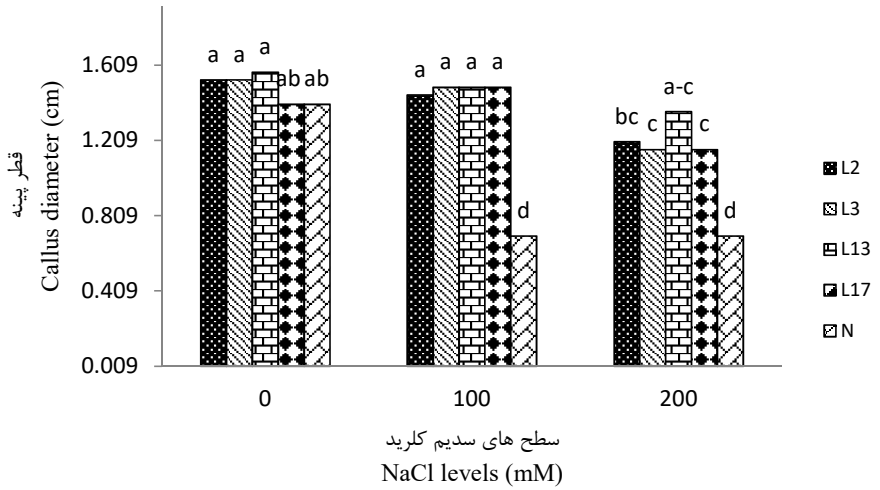

Fig. 4. Effect of different levels of NaCl on the callus diameter in transgenic (L2, L3, L13 and L17) and non-transgenic lines (N - wild type).

شکل ۴- اثر سطوح مختلف NaCl بر قطر پینه در گیاهان تراریخت (L17,L13,L3,L2) و غیر تراریخت (N).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.1.11.2]

Fig. 5. The difference in the callus diameter of transgenic (right) and non-transgenic lines (left) under 200 mM NaCl.

شکل ۵- تفاوت قطر پینه گیاهان تراریخت (سمت راست) و غیر تراریخت (سمت چپ) در ۲۰۰ میلی مولار NaCl.

تعداد برگ باززایی شده

نتیجه‌های تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری ویژگی‌های مختلف گیاهان تراریخت و غیر تراریخت نشان داد که برهمکنش رگه‌ها × سطوح مختلف شوری برای ویژگی تعداد برگ باززایی شده در سطح ۵ درصد معنی دار بود.

با افزایش غلظت نمک، تعداد برگ باززایی شده در تمام رگه‌ها کاهش یافت و این کاهش در گیاهان شاهد نسبت به گیاهان تراریخت بیشتر بود و تفاوت معنی‌داری بین گیاهان شاهد و تراریخت در تنش شدید مشاهده شد (شکل ۶). طبق این نتیجه‌های، رگه ۳ و ۱۳ در شرایط تنش ۲۰۰ میلی مولار NaCl بیشترین (۱/۱۳) تعداد برگ باززایی شده را داشت و رگه ۲ و شاهد کمترین (۰/۸۳) تعداد برگ باززایی شده را نشان دادند. تفاوت تعداد برگ باززایی شده در رگه‌های تراریخت و شاهد می‌تواند ناشی از توان فتوسنتزی بیشتر این رگه‌ها و تحمل بیشتر آن‌ها به شرایط تنش باشد (۲۵) (شکل۷).

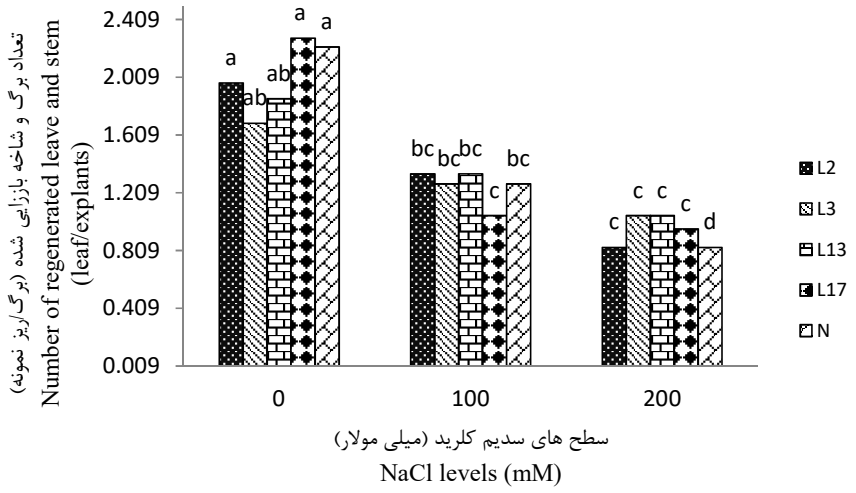

Fig. 6. Effect of different levels of NaCl on the number of regenerated leave and stem in transgenic (L2, L3, L13 and L17) and non-transgenic lines (N - wild type).

شکل ۲۶- اثر سطوح مختلف NaCl بر تعداد برگ و شاخه باززایی شده گیاهان تراریخت (L17,L13,L3,L2) و غیر تراریخت (N)

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.1.11.2]

Fig. 7. The difference in the number of regenerated leaves of transgenic lines (right) and control (left) under 200 mM NaCl.

شکل ۷- تفاوت در شمار برگ در گیاهان تراریخت (سمت راست) و شاهد (سمت چپ) در ۲۰۰ میلی مولار NaCl.

بحث

فلاودوکسین‌ها حامل‌های الکترونی موجود در چند ریزانداموارہ فتوسنتز کننده هستند که در گیاهان وجود ندارند. ویژگی‌های این حامل‌ها مشابه فردوکسین می باشد (۲۷). در سیانوباکترها، هنگام بروز تنش شوری پروتئین‌های تنش مانند فلاودوکسین‌ها بیان می‌شوند و باعث ایجاد تحمل به تنش شوری می‌شوند (۵).

نتیجه‌های حاصل از پژوهش حاضر، عملکرد ژن *Fld* در شاخساره‌های گردوی تراریخت دارای این ژن را در تحمل به تنش شوری تایید می‌کند. نتیجه‌های آزمایش تنش شوری ناشی از NaCl در این پژوهش نشان داد که شاخساره‌های رگه‌های تراریخت و غیرتراریخت در تیمار شاهد (بدون NaCl) از لحاظ ویژگی‌های اندازه‌گیری شده تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. این عدم تفاوت در رشد ناشی از این است که بیان فلاودوکسین در گیاهانی که در شرایط طبیعی رشد می‌کنند عملکرد مشابهی دارند، یعنی این ژن یک ژن القایی است که تنها در شرایط تنش بیان می‌شود (۲۴). در گیاهان زیر تنش که میزان فردوکسین به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد، بیان این فلاووپروتئین اهمیت حیاتی پیدا می‌کند. پژوهش‌ها پیرامون انتقال این ژن به گیاهان نشان داده است که این ژن در کلروپلاست گیاهان بیان می‌شود نه در سیتوسل (۲۸)، اما این بدان معنا نیست که گیاهان تراریخت پیش از تولید برگ و اندام‌های سبز دارای کلروپلاست از مزایای بیان این ژن برخوردار نیستند. با توجه به اینکه همه اندام‌ها پلاستید (کلروپلاست تمایز نیافته) دارند، پس این ژن در تمام مراحل در گیاهان تراریخت در شرایط تنش بیان می شود (۲۵).

کاهش رشد بافت‌ها در شرایط افزایش تنش شوری یک واکنش معمول برای شروع تحمل به تنش است. نتیجه‌های پژوهش حاضر نشان داد که در غلظت‌های مختلف NaCl در محیط کشت بافت، گیاهان تراریخت از نظر ویژگی‌های رشدی مورد بررسی، بهبود یافته و توانستند بقا و رشد بیشتری داشته باشند؛ در حالی‌که گیاهان شاهد توانا به ادامه رشد و بقا در محیط کشت دارای NaCl نبودند و پس از چند روز از بین رفتند. این یافته‌ها با نتیجه‌های Mohamed و همکاران (۱۲) در گیاهان سیب زمینی تراریخت همخوانی داشت. براساس نتیجه‌های این پژوهشگران رگه‌های تراریخت و شاهد در محیط بدون تنش تفاوت رشد معنی‌داری نداشتند، اما در محیط دارای تنش رگه‌های تراریخت رشد بهتری نشان دادند. افزون بر این، در شرایط تنش، رشد ریشه کاهش یافت و شاخه‌ها زرد شدند، در حالی‌که در شرایط طبیعی هیچ کاهش رشدی در گیاه مشاهده نشد.

هم‌چنین نتیجه‌های Sheikhbeig و همکاران (۲۰) که روی رویان‌های تراریخت گردو انجام شد، نشان داد که رویان‌های رگه‌های تراریخت مورد مطالعه تنش شوری و خشکی را تحمل می‌نمایند و در محیط دارای شوری و PEG زنده ماندند؛ در حالیکه رویان‌های شاهد در این محیط سیاه شده و از بین رفتند و شاخساره‌های تراریخت رگه ۴ توانستند در محیط تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار NaCl زنده بمانند (۱۴). در پژوهش حاضر، نتیجه‌های به دست آمده نشان داد که با افزایش غلظت نمک، تعداد

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.1.11.2]

برگ و قطر پینه و تعداد برگ باززایی شده در تمام رگه‌های مورد مطالعه در شرایط تنش کاهش یافت؛ در حالی‌که تعداد برگ سالم، قطر پینه و تعداد برگ باززایی شده در شاخساره‌های تراریخت رگه‌های ۲، ۳، ۱۳ و ۱۷ در شرایط تنش ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl بیشتر از گیاهان غیرتراریخت بود. کاهش رشد شاخساره در شرایط تنش شوری مربوط به تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن[۱] می‌باشد (۱۹)؛ در حالی‌که آسیب‌های برگی در شرایط تنش به‌دلیل انباشت یون‌های سمی (سدیم و کلر) در گیاه می‌باشد. انباشت مقادیر زیاد یون‌های سمی در واکوئل یاخته برگی تثبیت کربن را کاهش می‌دهد (۲). این نتیجه‌ها با نتیجه‌های Sun و همکاران (۲۳) همخوانی داشت. این پژوهشگران نشان دادند که رگه‌های تراریخت سویا حساسیت کمتری به آسیب‌های ناشی از حضور NaCl داشتند و این رگه‌ها در تنش‌های ملایم توانستند رشد طبیعی خود را حفظ کنند؛ در حالی‌که گیاهان شاهد آسیب‌های برگی را نشان دادند و در غلظت‌های بالای نمک (۲۰۰ و ۳۰۰ میلی مولار) گیاهان شاهد زنده نماندند و رگه‌های تراریخت هم دچار آسیب شدند.

نتیجه‌های پژوهش ما نیز نشان داد که گیاهان غیرتراریخت در شرایط تنش شدید (۲۰۰ میلی مولار NaCl) نتوانستند به‌خوبی رشد کنند و یک هفته پس از اعمال تنش آسیب برگی شدیدی را نشان دادند و در مدت کمی پس از اعمال تنش از بین رفتند. در مقابل، گیاهان تراریخت افزون بر حفظ برگ‌های خود در شرایط تنش، برگ جدید ایجاد نمودند و پینه‌زایی خوبی داشتند. این گیاهان ۳۵ روز پس از اعمال تنش، در شرایط تنش شوری، زنده ماندند و سپس به محیط بدون تنش منتقل شدند.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌های این پژوهش، اثرهای مثبت ژن *Fld* بر برخی پاسخ‌های مورفولوژیکی گردوهای دارای این ژن را در شرایط تنش شوری ناشی از NaCl در محیط درون شیشه‌ای اثبات نمود. براساس نتیجه‌های به دست آمده از این آزمایش، مشخص شد که گیاهان دارای ژن *Fld* غلظت‌های بالای شوری را نسبت به شاهد بهتر تحمل نمودند و در سطوح بالای تنش شوری (غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار ناشی از NaCl) آسیب برگی کمتری نشان دادند و تعداد برگ سالم بیشتری نسبت به گیاهان شاهد تولید کردند. هم‌چنین، این گیاهان در این سطح شوری توانستند پینه‌زایی نمایند، در حالی‌که گیاهان غیرتراریخت در شرایط تنش شوری، حتی در محیط دارای تنش‌های ملایم نیز پینه چندانی تشکیل ندادند که این امر می‌تواند یکی از دلایل احتمالی مرگ این گیاهان در شرایط تنش شوری ناشی از NaCl باشد. براساس این یافته‌ها، ادامه پژوهش‌ها روی رگه‌های متحمل شناخته شده در پژوهش حاضر برای انجام آزمایش‌های بعدی و تکمیلی در شرایط گلخانه یا باغ پیشنهاد می‌گردد.

منابع

References

1. Arzani, A. 2008. Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological view. In Vitro Cell Dev.-Plant, 44:373-383.
2. Barlass, M. and K. Skene. 1981. Relative NaCl tolerances of grapevine cultivars and hybrids"*in vitro*". Z Pflanzen Physiol. 102:147-156.
3. Driver, J.A., and A.H Kuniyuki. 1984. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock (*Juglans hindsii X Juglans regia*, tissue culture). HortScience, 19: 507-509.
4. El-Kader, A., A. Mohamedin and M. Ahmed. 2006. Growth and yield of sunflower as affected by different salt affected soils. Int. J. Agr. Biol. 8:583-587.
5. Erdmann, N., and M. Hagemann. 2001. Salt acclimation of algae and cyanobacteria: a comparison. In Algal adaptation to environmental stresses. Springer Berlin Heidelberg. 323-361.
6. Falk, S., G. Samson, D. Bruce, N. P. Huner and D. E. Laudenbach. 1995. Functional analysis of the iron-stress induced CP 43′ polypeptide of PS II in the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7942. Photosynth. Res. 45(1): 51-60.
7. Faostat, F. 2018. Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Economic and Social Development Department, Rome, Italy. http://faostat3. fao. org/home/E. Accessed, 12.
8. Flowers, T. 2004. Improving crop salt tolerance. J. Exp. Bot. 5: 307-319.

۱- Reactive oxygen species (ROS)

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.1.11.2]

9. Fulton, A.E., J. Oster and B. Nanson. 1988. Salinity Management of Walnut. In: Walnut Production Manual (Eds.): D.E. Ramos and David E. Ramos, University of Califonia. Div. Agr. Nat. Res. pp 54-65.
10. Kumar, K., M. Kumar, S. R. Kim, H.Ryu and Y.G. Cho. 2013. Insights into genomics of salt stress response in rice. Rice, 6(1): 1-9.
11. Lotfi, N., K.Vahdati, B.Kholdebarin, and R. Amiri. 2010. Soluble sugars and proline accumulation play a role as effective indices for drought tolerance screening in Persian walnut (*Juglans regia* L.) during germination. Fruits, 65: 97-112.
12. Mohamed, A.A., M.A. Matter and M.M. Saker. 2010. Effect of salt stress on some defense mechanisms of transgenic and wild potato clones (*Solanum tuberosum* L.) grown in vitro. Nature, 8(12):181-193.
13. Munns, R. and M. Tester. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Ann. Rev. Plant Biol. 59:651-681.
14. Nazari, M., K. Vahdati, M. Tohidfar and H. Ramshini. 2014. Molecular analysis of transgenic Persian Walnut (*Juglans rejia* L.) lines by fld gene and study of their response to salinity stress, Eighth Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran and the 4th National Bio Security Conference. Tehran. (In Persian)
15. Palled, Y. B., A. M. Chandra Shekharaiah and G. D. Radder. 1985. Response of Bengal gram to moisture stress. Indian J. Agron. 30: 104-106.
16. Peleg, Z., P. Maris and B. Eduardo. 2011. Engineering salinity and water-stress tolerance in crop plants: getting closer to the field. Adv. Bot. Res. 57:405-443.
17. Prabhavathi, V. and M. Rajam. 2007. Mannitol-accumulating transgenic eggplants exhibit enhanced resistance to fungal wilts. Plant Sci. 173:50-54.
18. Rezaei Qusheh Bolagh, F., A. Solouki, M. Tohidfar, M. Zare Mehrjerdi, A. Izadi-Darbandi, and K. Vahdati. 2020. Agrobacterium-mediated transformation of Persian walnut using BADH gene for salt and drought tolerance. J. Hort. Sci. Biotechnol. 1-10.
19. Rodriguez, A.A., K.A. Grunberg and E.L. Taleisnik. 2002. Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. Plant Physiol. 129(4):1627-1632.
20. Sheikh Beig Goharrizi, M.A., A. Dejahang, M.Tohidfar, C.Nestor, M. R. Hajirezaei, and K. Vahdati. 2016. Agrobacterium Mediated Transformation of Somatic Embryos of Persian Walnut Using Fld Gene for Osmotic Stress Tolerance. J. Agr. Sci. Tech.18(2):423-435.
21. Singh. A., L. Hong and A. Louis .2004. Microarray analysis and redox control of gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Physiol. Plant. 120:27-35.
22. Soleimani, H., M. Rashidfar and A. Malekian. 2011. Effect of salinity and drought by using NaCl 99.99% and PEG 6000 on some growth factors on *Anabasis aphylla*. In: Proceedings of 2nd International Conference on Environmental Engineering and Applications. 17: 168-172.
23. Sun, W., D. Deng, L.Yang, X. Zhang, J.Yu, H. Pan and Q. Zhuge. 2013. Overexpression of the chloride channel gene (*GmCLC1*) from soybean increases salt in transgenic *Populus deltoides* × *P.euramericana* "Nanlin 895" . Plant Omics. 6(5):347-354.
24. Tognetti-Vanesa, B., F. Javier , F. Palatnik, M. Fillat, M. Melzer, M.R. Hajirezaei, M. Estela Valle and C. Néstor. 2006. Functional replacement of ferredoxin by a cyanobacterial flavodoxin in tobacco confers broad-range stress tolerance. Plant Cell.18:2035-2050.
25. Wani, S.H., S. K. Sah, L. Sági, and K.Solymosi. 2015. Transplastomic plants for innovations in agriculture. A review. Sustainable Agr. 35(4):1391-1430.
26. Yang Y, R. J. Tang, C. M. Jiang, B. Li, T. Kang, H. Liu, N. Zhao, X. J. Ma, L. Yang, S. L. Chen and H. X. Zhang. 2015. Overexpression of the PtSOS2 gene improves tolerance to salt stress in transgenic poplar plants. Plant Biotechnol. J. 13: 962–973.
27. Zurbriggen, D., B. Vanesa, F. María, M. Hajirezaei, M. Estela and C. Néstor. 2008. Combating stress with flavodoxin: a promising route for crop improvement. Trends Biotech. 26:531-537 .

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.1.11.2]

28. Zurbriggen, D., B. Vanesa Tognetti and C. Nestor .2007. Stress-inducible flavodoxin from photosynthetic microorganisms. The mystery of flavodoxin loss from the plant genome. Iubmb Life. 59:355-360 .

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.1.11.2]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 22 (1): 65- 74 (2021)
Research article

In Vitro Evaluation of Morphological Traits in Transgenic Persian Walnut Harboring *Fld* Gene under Different Levels of NaCl

M. Nazari, M. Tohidfar, H. Ramshini and K. Vahdati*[1]

In photosynthetic microorganisms, a series of electron carriers (such as flavodoxin) with the similar function to ferredoxin are expressed following the adverse reduction of ferredoxin under stress conditions. *Fld* gene reduces disorders of abiotic stresses in the electron transfer processes of photosynthesis. In order to investigate the morphological characteristics of transgenic walnuts harboring *Fld* gene under salinity stress, a factorial experiment was conducted based on completely randomized design with four replications. In this experiment, transgenic Persian walnut plants expressing *Fld* (L2, L3, L13 and L17) and 'Chandler' as control under different levels of NaCl (0, 100, and 200 mM) were evaluated under *in vitro* conditions. According to the results, L13 had the maximum number of healthy leaves (1.14), callus diameter (1.36mm) and number of regenerated leaves (1.13) using 200 mM NaCl. Transgenic lines maintained their natural growth in mild stress after 35 days under 200 mM NaCl, while non-transgenic plants showed injury symptoms in this treatment. *In vitro* studies showed that the transfer of *Fld* gene to Persian walnut 'Chandler', which is a salt-sensitive plant, improved its growth traits under salinity stress.

Keywords: Salinity stress, Callus, Ferredoxin, Flavodoxin, *Juglans regia* L.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.1.11.2]

1. Former M.Sc. Student, Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran; Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti University; Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Science and Professor, Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran, respectively.
* Corresponding Author, Email: (kvahdati@ut.ac.ir).