



دانشگاه گیلان

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و هشتم، شماره دوم، ۱۴۰۰

۸۵-۹۹

<http://jopp.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jopp.2021.17874.2658

تنش شوری ملایم و تأثیر آن بر افزایش ظرفیت حفظ آب برگ گیاهان کشت بافتی گردوی ایرانی در طول پسابدگی

زینب ملکی آسایش^۱، کورش وحدتی^{۲*} و ساسان علی‌نیایی‌فرد^۳

^۱دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران،

^۲استاد گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران،

^۳استادیار گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۷

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به این‌که گیاهان کشت بافتی به مدت طولانی در درون شیشه در شرایط محیطی غیرمعمول قرار می‌گیرند، این شرایط متفاوت (رطوبت نسبی بالا، غلظت کم CO₂ در طول دوره نوری، غلظت بالای اتیلن و جریان هوای محدود) باعث توسعه برگ‌های ضعیف (دارای لایه اپی‌کوتیکولی بسیار نازک) و کاهش عملکرد روزنه شده که منجر به افزایش تلفات گیاهچه‌ها پس از انتقال به شرایط برون‌شیشه‌ای می‌شود. از آن‌جایی‌که تنظیم اسمزی می‌تواند واکنش روزنه را بهبود ببخشد، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر تنش شوری به‌ویژه تنش شوری ملایم، در شرایط درون‌شیشه‌ای بر کاهش پسابدگی برگ گیاهان کشت بافتی گردو در شرایط برون‌شیشه‌ای طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به‌صورت آزمایشگاهی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. برای اعمال تیمار شوری از نمک NaCl در سه غلظت ۰، ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر استفاده شد، پس از پایان یافتن دوره تنش، صفات مربوط به مورفولوژی روزنه، میزان نرخ تعرق و میزان نسبی آب (RWC)، صفات ریخت‌شناسی (ارتفاع ساقه، سطح ویژه برگ، شاخص آسیب شوری، سطح وزنی برگ و میزان آبدار بودن برگ) و صفات فیزیولوژیکی (شاخص کلروفیل، پتانسیل اسمزی، مقدار پرولین و گلاسیسین بتائین) در گیاهچه‌های کشت بافتی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: طبق نتایج به‌دست آمده از آزمایش حاضر، در اثر تنش شوری، غلظت پایین تنش شوری (۵ دسی‌زیمنس)، منجر به کاهش میزان نرخ تعرق و افزایش RWC در گیاهچه‌های کشت بافتی گردو شد. هم‌چنین خصوصیات روزنه‌ای از جمله طول و عرض روزنه و طول و عرض شکاف روزنه کاهش یافت و منجر به بسته‌تر شدن روزنه‌ها شد. شاخص آسیب شوری و اسمولیت‌های پرولین و گلاسیسین بتائین با افزایش شدت تنش افزایش نشان دادند و پتانسیل اسمزی منفی‌تر شد. اگرچه ارتفاع ساقه در تیمارهای مختلف شوری و شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت اما برای شاخص کلروفیل و سطح ویژه برگ (SLA) در غلظت‌های ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس NaCl در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌دار و برای سطح وزنی برگ (LMA) و میزان آبدار بودن برگ (LS) افزایش معنی‌دار مشاهده شد.

* مسئول مکاتبه: kvahdati@ut.ac.ir

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش تنش شوری در تنظیم اسمزی، غلظت‌های پایین این تیمار می‌تواند از طریق تأثیر بر ریخت‌شناسی روزنه و بهبود روابط آب منجر به افزایش ظرفیت حفظ آب گیاهان کشت بافتی در شرایط برون‌شیشه‌ای طی مرحله انتقال و سازگارسازی گردد. طبق نتایج این پژوهش غلظت ۵ دسی‌زیمنس تنش شوری، در مقایسه با غلظت ۱۰ دسی‌زیمنس، تأثیر تنش‌زای کم‌تری روی گیاهچه‌های کشت بافتی داشت و هم‌زمان باعث کاهش تعرق و افزایش RWC و در نهایت افزایش ظرفیت حفظ آب و کاهش پسابیدگی گیاهچه‌های کشت بافتی گردو در طول پسابیدگی شد که نشانگر تأثیر مثبت آن در سازگارسازی درون‌شیشه‌ای گیاهان کشت بافتی گردو پیش از انتقال بود.

واژه‌های کلیدی: تعرق، رطوبت نسبی، روزنه، شوری، گردو

مقدمه

رفتن گیاه در طول پسابیدگی^۱ است (۲۳). تکثیر گیاهان در شرایط آزمایشگاهی تحت رطوبت نسبی بالا موجب می‌شود که گیاهان با انتقال به شرایط دارای رطوبت نسبی طبیعی مستعد پژمردگی باشند و در نتیجه اختلال در عملکرد، روزنه‌ها دیگر قادر به بسته شدن در پاسخ به محرک‌های بسته شدن روزنه مانند تاریکی، اسید آبسزیک (ABA)^۲ و افزایش سطح کلسیم نباشند (۵، ۷ و ۲۵). زیرا رطوبت نسبی بالا یکی از اصلی‌ترین عوامل مختل‌کننده عملکرد روزنه در شرایطی مانند استرس، تاریکی و حضور ABA است (۲۱). بنابراین هر عاملی که بتواند در بسته نگه‌داشتن روزنه در شرایط درون‌شیشه‌ای تأثیر داشته باشد، می‌تواند منجر به افزایش میزان موفقیت در مرحله سازگارسازی و انتقال گیاهان کشت بافتی به شرایط برون‌شیشه‌ای شود.

مطالعات متعددی به‌منظور تغییر شرایط محیطی گیاهان کشت بافتی انجام شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به کاهش رطوبت توسط تهویه اجباری و یا جاذب‌های رطوبت در محیط درون شیشه (۱۱ و ۱۷)، و افزایش CO₂ درون ظروف کشت اشاره نمود (۴۲ و ۴۴). هم‌چنین تلاش‌های متعددی برای وادار کردن روزنه برای بسته شدن و کاهش هدررفت آب برگ توسط کاربرد پاکلوبوترازول، ایندول بوتریک‌اسید

ساختار روزنه و اختلال در عملکرد آن یکی از عوامل اصلی مؤثر در اتلاف بیش از حد آب در گیاهان کشت بافتی است (۲۷). اکثر مطالعات میکروسکوپی انجام شده در گیاهان کشت بافتی نشان داده‌اند که ساختار روزنه در گیاهان کشت بافتی تفاوت قابل‌توجهی با گیاهان رشد یافته در گلخانه یا مزرعه دارد (۳۰). چرا که توسعه گیاهان کشت بافتی در شرایط رشدی خاص، موجب شکل‌گیری گیاهانی با ریخت‌شناسی، آناتومی و فیزیولوژی غیرعادی می‌گردد که اغلب دارای کارایی فتوسنتز ضعیف، اختلال در عملکرد روزنه و کاهش در توسعه لایه مومی (کوتیکول) به‌دلیل بالا بودن رطوبت نسبی درون ظروف کشت می‌باشند که در نهایت منجر به هدر رفتن مقدار زیادی از آب درون بافت گیاهی در مرحله انتقال می‌شود (۱۰، ۲۰ و ۲۷). تحت شرایط خاص توانایی بسته شدن روزنه در پاسخ به محرک‌های بستن روزنه کاهش می‌یابد. از جمله این موارد می‌توان به قرارگیری طولانی‌مدت روزنه تحت برخی از شرایط محیطی اشاره کرد که در این میان اختلاف فشار بخار کم از جمله عوامل بسیار مهم است (۶) که نتیجه اصلی آن اختلال در عملکرد روزنه، کاهش ظرفیت برگ در حفظ آب و از بین

1- Desiccation
2- Abscisic acid

برداشت که میزان تبخیر بالا می‌باشد قرار می‌گیرند، طول عمر گیاهان و یا محصول کاهش می‌یابد (۲۲)، از طرف دیگر در مراحل اولیه قرارگیری ریشه در معرض شوری، جذب آب مختل شده و باعث تنش فیزیولوژیکی خشکی می‌شود که منجر به بسته شدن روزنه و کاهش رشد گیاهان می‌شود (۳۵). کاروالهو و همکاران (۲۰۱۷) برای اولین بار اثر متقابل رطوبت نسبی و شوری بر عملکرد روزنه و آناتومی برگ در طول رشد را مورد بررسی قرار داده و با فرض این‌که شوری متوسط در طول رشد می‌تواند منجر به واکنش استرسی و تحریک عملکرد روزنه به‌علت افزایش غلظت ABA شود، نشان دادند که هنگامی که این دو عامل محیطی که بر واکنش‌پذیری روزنه اثر متضاد دارند با هم ترکیب می‌شوند، شوری متوسط قادر خواهد بود پاسخ‌دهی روزنه به پسابدگی برگچه‌های رشد یافته در رطوبت نسبی بالا را بهبود دهد که به‌علت افزایش ABA در برگ می‌باشد (۱۶). بنابراین با توجه به این‌که تکثیر گیاهان کشت بافتی در رطوبت نسبی نزدیک به ۱۰۰ درصد باعث از بین رفتن بسیاری از گیاهان کشت بافتی در اثر پسابدگی و هدررفت آب در مرحله انتقال به شرایط برون‌شیشه‌ای می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر اسمزی غلظت‌های مناسب شوری بر فیزیولوژی روزنه‌های تشکیل شده در رطوبت نسبی بالای درون‌شیشه‌ای و برخی خصوصیات مورفو-فیزیولوژیکی گیاهان کشت بافتی گردو به منظور بهبود واکنش روزنه‌ای و افزایش ظرفیت نگهداری آب آن در طول پسابدگی بدون ایجاد تنش شوری شدید می‌باشد که می‌تواند در مقایسه با سایر عوامل مانند PEG هزینه‌های کم‌تری داشته باشد.

(IBA^۱)، بنزیل آمینوپورین (BAP^۲)، ABA (۲۹) و استفاده از ترکیباتی مانند پلی اتیلن گلیکول (PEG^۳) برای کاهش پتانسیل اسمزی صورت گرفته است (۳). در واقع از جمله روش‌های مهم جهت سازگاری گیاهان کشت بافتی کاهش سرعت تعرق از طریق کاهش رطوبت نسبی محیط کشت، افزایش غلظت آگار و قند و استفاده از عوامل اسمزی مانند PEG است (۲۷). از آنجا که تنظیم اسمزی می‌تواند واکنش روزنه را بهبود بخشد، عواملی مانند NaCl و PEG می‌توانند در تنظیم اسمزی و بهبود واکنش روزنه‌ای گیاهان درون‌شیشه‌ای نقش داشته باشند. PEG که القاکننده تنش خشکی در گیاهان از طریق کاهش پتانسیل در نتیجه حل شدن در محلول‌های غذایی بدون ایجاد سمیت می‌باشد (۳۱)، در کشت بافت جهت ایجاد شرایط تنش آب پیش از انتقال گیاهان به شرایط برون‌شیشه‌ای، با اهداف کاهش اتلاف آب (۴۰) افزایش توسعه کوتیکول و تحریک بسته شدن روزنه‌ها (۳) مورد استفاده قرار می‌گیرد. این در حالی است که استفاده از NaCl در کشت بافت و سایر مطالعات به‌عنوان القاکننده تنش شوری، با هدف بررسی پاسخ گیاهان به تنش شوری (۲۳ و ۳۱)، غربالگری ارقام مقاوم به شوری (۱۹ و ۲۸)، ارزیابی میزان مقاومت ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف به مقادیر مختلف تنش شوری خاک و آب آبیاری (۱۴) و موارد دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. اما استفاده از NaCl به‌منظور تنظیم اسمزی در گیاهان و با هدف افزایش توسعه کوتیکول و تحریک بسته شدن روزنه‌ها، مورد توجه نبوده است. از آنجایی‌که رطوبت نسبی زیاد در طول رشد گیاهان، منجر به از دست رفتن کنترل نشده آب می‌شود، گیاهان زمانی که در معرض شرایطی مانند انتقال نشا از گلخانه به مزرعه و یا شرایط پس از

- 1- Indole-3-Butyric Acid
- 2- 6-Benzylaminopurine
- 3- Polyethylene glycol

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این پژوهش، از گیاهان کشت بافتی گردو رقم چندلر (*Juglans regia* L. cv. Chandler) استفاده شد. گیاهچه‌های درون شیشه‌ای مورد استفاده، در مرحله پرآوری بودند که هر سه الی چهار هفته یکبار مورد واکشت قرار می‌گرفتند. برای تکثیر و پرآوری نمونه‌های گیاهی، محیط کشت پایه DKW دارای ۲/۱ گرم در لیتر ژلرایت، ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۳۰ گرم در لیتر شکر به کار برده شد. تیمار شوری در آخرین مرحله واکشت، توسط نمک کلرید سدیم (NaCl) در سه غلظت ۰، ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر اعمال شد (۲ و ۱۹) و گیاهچه‌های مشابه دارای 3 ± 0.3 سانتی‌متر ارتفاع مورد استفاده قرار گرفتند، برای هر تیمار چهار شیشه که هر شیشه حاوی دو گیاهچه بود به عنوان تکرار در نظر گرفته شد. pH محیط کشت نیز پیش از افزودن ژلرایت و اتوکلاو کردن محیط (به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد)، روی ۵/۵ تنظیم و گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۱۵ روز با ظهور علائم ناشی از تنش شوری، از جمله کاهش رشد و زردی حاشیه برگ‌ها در گیاهچه‌های

تحت تنش بالا، گیاهچه‌ها از درون شیشه خارج شده و در طول پس‌آبیدگی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور ارزیابی شاخص آسیب ناشی از شوری (SI) در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای، از فرمول $SI = \sum(n_i \times i)/N$ استفاده شد، که n_i تعداد شاخه دریافت‌کننده مقیاس‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ مقیاس‌ها (۱-۴) و N تعداد کل شاخه در هر غلظت نمک می‌باشد و امتیازدهی به ترتیب به صورت بدون آسیب (مقیاس ۱)، زردی حاشیه برگ‌ها و نوک شاخه‌ها (مقیاس ۲)، نکروز و زردی کل برگ یا قسمتی از شاخه (مقیاس ۳) و مرگ گیاهچه (مقیاس ۴) بود (۱۹). طول ساقه (SL) توسط خط کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک برگ، نمونه‌های گیاهی بعد از اندازه‌گیری وزن تر به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از خشک شدن وزن خشک آن‌ها تعیین شد، هم‌چنین برای اندازه‌گیری سطح برگ گیاهچه‌ها، برگ تمامی تکرارها اسکن شده و توسط نرم‌افزار U. S. National Institutes of Health, ImageJ (Bethesda, MD) سطح برگ آن‌ها محاسبه شد. در نهایت شاخص‌های سطح ویژه برگ (SLA)، سطح وزنی برگ (LMA) و میزان آبدار بودن برگ (LS) با استفاده از روابط زیر محاسبه شد:

$$(SLA) = \frac{\text{سطح برگ در گیاه}}{\text{وزن ماده خشک برگ}} \quad (1)$$

$$(LMA) = \frac{\text{وزن خشک برگ}}{\text{سطح برگ}} \quad (2)$$

$$(LS) = \frac{\text{وزن خشک برگ} - \text{وزن تر برگ}}{\text{سطح برگ}} \quad (3)$$

- 1- Salt injury index
- 2- Specific leaf area
- 3- Leaf mass area
- 4- Leaf succulence

شد. تیوپ‌های دارای بافت گیاهی درون تیوپ‌های بزرگ‌تر (۲ میلی‌لیتری) قرار گرفتند و چند عدد ساچمه فلزی درون تیوپ‌ها انداخته شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند و عصاره به دست آمده برای اندازه‌گیری پتانسیل اسمزی برگ مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور ۵۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده در تیوپ‌های مخصوص قرار گرفت و میزان اسمولاریته آن توسط دستگاه اسمومتر (Osmomat 030- gonatec Germany) قرائت شد و پتانسیل اسمزی برگ توسط معادله (Vant Hoff) محاسبه شد:

$$\Psi_s(\text{MPa}) = -C (\text{mosmoles kg}^{-1}) \times 2.58 \times 10^{-3} \quad (4)$$

روی آن‌ها انجام شد و میزان جذب نور در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتری (Lambda 25- UV/VIS Spectrometer) قرائت شد و از تولوئن به عنوان شاهد دستگاه استفاده شد. در نهایت منحنی استاندارد رسم و میزان پرولین محلول در یک گرم بافت گیاهی توسط رابطه زیر به دست آمد:

$$X = [(A.B)/C] / (D/5) \quad (5)$$

گریو و گراتان (۱۹۸۳) انجام شد و برای تهیه منحنی استاندارد، محلول‌هایی با غلظت صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گلاسیسین بتائین خالص تهیه شد و همه مراحل فوق روی هر کدام از آن‌ها انجام داده شد. در نهایت مقدار گلاسیسین بتائین بافت برگ بر حسب میکرومول در گرم بافت خشک برای هر نمونه محاسبه شد (۲۶).

به منظور ارزیابی شاخص کلروفیل از دستگاه کلروفیل سنج قابل حمل (SPAD, Konika Minolta) استفاده شد. در تمام تکرارهای هر تیمار آزمایشی برای سه برگچه اول، دوم و سوم میزان کلروفیل اندازه‌گیری و در نهایت میانگین سه عدد به عنوان میزان کلروفیل هر تکرار در نظر گرفته شد. برای اندازه‌گیری پتانسیل اسمزی برگ، از روش مارتینز و همکاران (۲۰۰۴) استفاده شد، بدین صورت که بافت تازه برگ‌ها بلافاصله پس از جدا شدن از گیاه به قطعات کوچک تقسیم شد و در تیوپ‌های کوچک ۱/۵ میلی‌لیتری که در ته آن‌ها از قبل سوراخ‌هایی ایجاد شده بود قرار گرفت و توسط نیتروژن مایع فریز

که در آن، Ψ_s پتانسیل اسمزی بر حسب مگاپاسگال و C میلی اسمولاریته در کیلوگرم بافت گیاهی است که توسط دستگاه اسمومتر قرائت شد (۳۴).

برای اندازه‌گیری میزان پرولین بافت برگ از روش بتیس و همکاران (۱۹۷۳) و برای تهیه منحنی استاندارد، از محلول پرولین استفاده شد. بدین منظور محلول‌های استاندارد صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار تهیه و تمامی مراحل کار

که در آن، X مقدار پرولین بافت بر حسب میکرومول در گرم بافت خشک، A مقدار پرولین به دست آمده از نمودار استاندارد بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر، B مقدار تولوئن استفاده شده بر حسب میلی‌لیتر، C عدد مولکولی پرولین و D مقدار نمونه گیاهی توزین شده بر حسب گرم می‌باشد (۱۳). همچنین اندازه‌گیری میزان گلاسیسین بتائین در بافت برگ بر اساس روش

اندازه‌گیری میزان تعرق به صورت اندازه‌گیری تعرق کل (روزنه‌ای و کوتیکولی) صورت گرفت به این ترتیب که برگ‌ها از هر یک از گیاهان مورد مطالعه جدا شده و بلافاصله روی ترازوی دیجیتال دارای محفظه به منظور جلوگیری از تأثیرات محیطی، قرار گرفت و وزن نمونه‌ها هر پنج دقیقه یادداشت شد (۱). سطح برگ و وزن تر اولیه نمونه‌های برگ‌ها مورد نظر اندازه‌گیری شد سپس برگ‌ها به طوری که سطح زیرین برگ بالا باشد روی ترازو قرار گرفتند و میزان از دست دادن آب آن‌ها از طریق یادداشت وزن تر برگ هر پنج دقیقه به مدت ۹۰ دقیقه اندازه‌گیری شد و در نهایت پس از خشک کردن نمونه‌های برگ‌ها توسط آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، وزن خشک نیز محاسبه شد و میزان تعرق گیاهان (نرخ تعرق (E)) توسط رابطه ۶ (V) و مقدار آب نسبی برگ (RWC) توسط رابطه ۷ (E) محاسبه شد.

برای بررسی تفاوت ریخت‌شناسی روزنه بین گیاهان کشت بافتی تحت تیمار تنش شوری درون‌شیشه‌ای، اپیدرم سطح زیرین دومین برگچه جانبی برگ با یک لایه نازک لاک بی‌رنگ پوشانده شد. پس از خشک شدن لاک روی اپیدرم، با استفاده از نواری چسب شفاف اپیدرم برگ جدا و روی لام شیشه‌ای چسبانده شد. خصوصیات روزنه‌ای با استفاده از تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ نوری (مدل Olympus) با بزرگنمایی 40X مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه تصاویر روزنه، به‌طور تصادفی از ۵-۶ برگ گرفته شده از چهار تکرار برای هر تیمار استفاده شد. همچنین برای اندازه‌گیری صفات مربوط به روزنه از تعداد ۲۵۰-۱۵۰ روزنه استفاده شد و صفاتی از جمله طول روزنه، عرض روزنه، طول شکاف روزنه، عرض شکاف روزنه، تراکم روزنه، مساحت روزنه و نسبت طول به عرض روزنه توسط نرم‌افزار Image J مورد ارزیابی قرار گرفت (۵).

$$E = \left\{ \left\{ \frac{\Delta \text{fresh weight (g)}}{\text{molar mass water} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)} \right\} \times 1000 \left(\frac{\text{mmol}}{\text{mol}} \right) \right\} / \text{measurment frequency (s)} / \text{leaf area (m}^2) \quad (6)$$

$$\text{RWC} = \frac{\text{وزن خشک} - \text{وزن تر برگ در هر زمان}}{\text{وزن خشک} - \text{وزن تر اولیه برگ}} \times 100 \quad (7)$$

سطح احتمال پنج درصد ($P \leq 0.05$) برای بررسی عدم معنی‌داری در نظر گرفته شد. برای بررسی داده‌های مربوط به نمودارهای آزمایش، معادله مناسب برای داده‌های موردنظر از طریق برازش منحنی داده‌ها انتخاب شد. با استفاده از معادله خطی منقطع تحلیل شد و برای مقایسه شیب منحنی‌ها از آزمون F-test استفاده شد.

برای تجزیه و تحلیل نتایج آزمایش‌های صورت گرفته در پژوهش حاضر از نرم‌افزار SAS 9.2 و GraphPad Prism 5 استفاده شد. تجزیه واریانس صفات ریخت‌شناختی در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد توسط نرم‌افزار SAS 9.2 صورت گرفت. داده‌های مربوط به خصوصیات ریخت‌شناختی روزنه توسط GraphPad Prism 5 مورد ارزیابی قرار گرفت و

1- Transpiration rate ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
2- Relative water content

نتایج و بحث

در پژوهش حاضر نتایج مربوط به بررسی خصوصیات مورفولوژی روزنه (جدول ۱)، نشان داد که تغییرات چندانی در خصوصیات مرتبط با مساحت و تراکم روزنه‌ای تحت تیمار غلظت‌های مختلف شوری در برگ گیاهان کشت بافتی گردو مشاهده نشد؛ به طوری که نسبت طول به عرض روزنه، تراکم روزنه‌ای و مساحت روزنه اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف شوری نشان ندادند. با این حال تیمار ۵ دسی‌زیمنس بر متر NaCl، اگرچه اختلاف معنی‌دار نداشت اما دارای تراکم روزنه‌ای بیش‌تر و مساحت روزنه‌ای کم‌تر بود که نشان‌دهنده افزایش تعداد روزنه و کاهش اندازه آن با اعمال تیمار شوری در مقایسه با شاهد بود. مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که بالا بودن رطوبت نسبی (نزدیک به ۱۰۰ درصد و VPD نزدیک به صفر) درون محیط رشدی گیاهان کشت بافتی عامل اصلی اختلال در ریخت‌شناسی و عملکرد روزنه است (۶ و ۲۷)، همچنین قرارگیری طولانی مدت گیاهان در حال رشد در معرض رطوبت نسبی بالا موجب تغییر در مورفولوژی روزنه و پاسخ بسته شدن آن می‌شود (۵ و ۳۹).

با توجه به این‌که طول و عرض روزنه و طول و عرض شکاف روزنه نشان‌دهنده تغییر در میزان باز و بسته شدن دهانه روزنه می‌باشد، طول روزنه، عرض روزنه و طول شکاف روزنه در تیمار ۵ دسی‌زیمنس بر متر NaCl به ترتیب حدود ۱۰، ۸ و ۱۷ درصد نسبت به تیمار شاهد با اختلاف معنی‌دار کاهش داشت. عرض شکاف روزنه نیز به‌طور معنی‌داری در تیمار ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر شوری در مقایسه با شاهد کاهشی حدود ۳۹ درصد و ۲۰ درصد نشان داد که بیانگر بسته شدن روزنه و کاهش میزان تعرق به‌ویژه تحت تنش ملایم شوری (۵ دسی‌زیمنس بر متر) بود (جدول ۱ و شکل ۱ الف)، چرا که تغییر در عرض روزنه و عرض شکاف روزنه از مهم‌ترین خصوصیات روزنه‌ای تأثیرگذار در کاهش تعرق و حفظ آب برگ می‌باشند. کاروالهو و همکاران (۲۰۱۷) نیز نشان دادند که در گل رز شاخه بریده که در رطوبت نسبی بالا رشد یافته بود افزایش EC محیط کشت تا ۶ دسی‌زیمنس بر متر منجر به بسته شدن روزنه در پاسخ به پسابیدگی برگچه‌ها می‌شود (۱۶) که می‌تواند همان‌طور که در برگ‌های جداشده گوجه‌فرنگی و آرابیدوبسیس گزارش شده است نتیجه افزایش ABA همراه با کاهش هدایت روزنه‌ای باشد (۸ و ۳۳).

جدول ۱- خصوصیات روزنه‌ای برگ گیاهان کشت بافتی گردو (رقم چندلر) تحت تنش شوری (۰، ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر).

Table 1. Stomatal traits of the leaves of *in vitro* walnut plants (cv. Chandler) under salinity stress (0, 5 and 10 ds.m⁻¹).

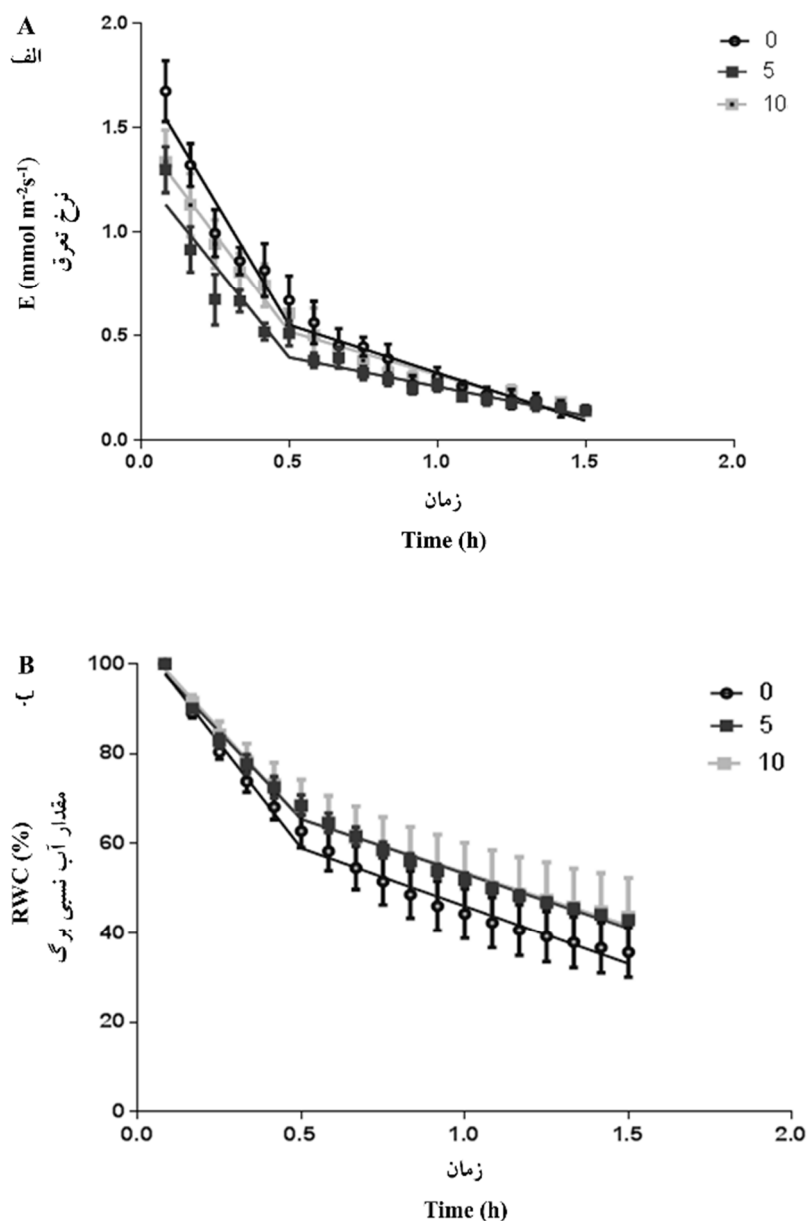
معنی‌داری Significance	سدیم کلرید ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl 10 ds.m ⁻¹	سدیم کلرید ۵ دسی‌زیمنس بر متر NaCl 5 ds.m ⁻¹	سدیم کلرید ۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl 0 ds.m ⁻¹	خصوصیات روزنه‌ای Stomatal traits
0.01*	26.28±0.46 ^{ab}	25.8±0.25 ^b	28.53±0.71 ^a	طول روزنه (میکرومتر) Stomatal length (μm)
0.05*	22.01±0.3 ^{ab}	21.13±0.35 ^b	23.01±0.73 ^a	عرض روزنه (میکرومتر) Stomatal width (μm)
0.002**	16.44± 0.48 ^{ab}	15.75±0.46 ^b	18.99±0.53 ^a	طول شکاف روزنه (میکرومتر) Pore length (μm)
<0.0001**	5.38±0.16 ^b	4.06±0.13 ^b	6.96±0.15 ^a	عرض شکاف روزنه (میکرومتر) Pore aperture (μm)
0.359 ^{ns}	1.20±0.01	1.23±0.01	1.24±0.01	طول/عرض روزنه (میکرومتر) Stomatal length/ width (μm)
0.923 ^{ns}	332.92±8.06	334.83±7.35	331.92±7.7	تراکم روزنه‌ای (تعداد در میلی‌متر مربع) Stomatal density (no.mm ⁻²)
408 ^{ns}	561.4±19.5	528.13±17.8	560.21±25.5	مساحت روزنه (میکرومتر) Stomatal area (μm)

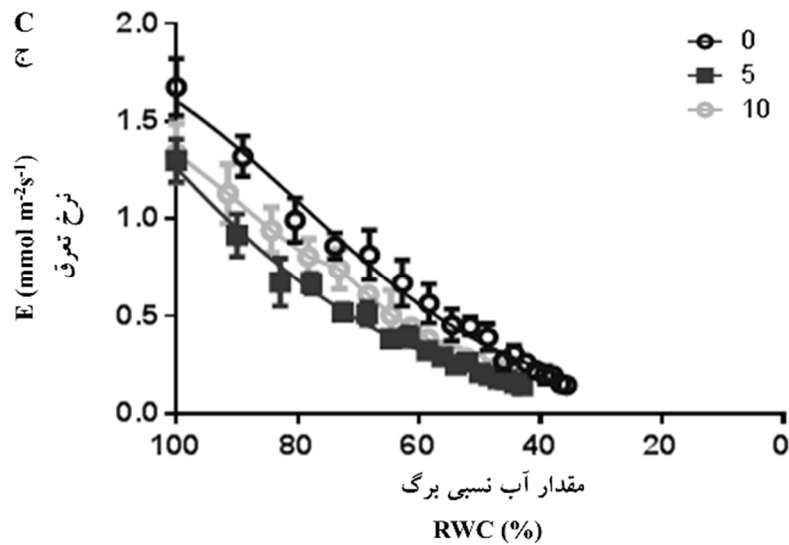
به‌علت افزایش غلظت ABA شود (۱۶). بسیاری از مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که رطوبت نسبی بالا از جمله ساده‌ترین متغیرهای محیطی می‌باشد که سیستم باز و بسته شدن روزنه را مختل می‌کند، این می‌تواند در نتیجه کاهش سطح ABA باشد که در نهایت موجب افزایش میزان تعرق در اثر اختلال روزنه و عدم توسعه مناسب کوتیکول می‌شود (۶، ۷، ۸ و ۲۳). زیرا عملکرد روزنه در ارتباط با ریخت‌شناسی روزنه می‌باشد به‌طوری‌که افزایش عرض شکاف روزنه که می‌تواند نتیجه افزایش اندازه روزنه در اثر رطوبت نسبی بالا باشد موجب افزایش هدایت روزنه‌ای و نرخ تعرق می‌گردد (۵ و ۳۸). منحنی RWC نیز نشان داد که کاهش آب برگ در اثر پسابیدگی در گیاهان شاهد بیش‌تر از گیاهان تیمار شده با NaCl می‌باشد (شکل ۱ ب). اگر چه اختلاف معنی‌داری برای شیب اول و دوم منحنی RWC مشاهده نشد با این حال کم‌ترین مقدار این کاهش آب برگ در شیب اول منحنی RWC در گیاهان تیمار ۵ دسی‌زیمنس بر متر NaCl و در شیب دوم منحنی به‌ترتیب در تیمار ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl مشاهده شد (جدول ۳)، که نشان‌دهنده بالا بودن RWC و تأثیر بیش‌تر تنش ملایم شوری در مقایسه با شاهد و تنش ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر شوری بر ظرفیت نگهداری آب برگ در طول پسابیدگی بود که نتیجه تغییر موفولوژی و بسته شدن روزنه با اعمال تنش شوری می‌باشد. مقایسه منحنی رابطه بین تعرق و میزان آب برگ ($E \times RWC$) بین گیاهان رشد یافته تحت تیمار NaCl و شاهد نیز نشان داد که قابلیت حفظ آب گیاهان تیمار شده با NaCl در رابطه با میزان تعرق آن‌ها بیش‌تر از گیاهان شاهد بود که نشان می‌داد با کاهش تعرق در اثر پسابیدگی، قابلیت حفظ آب برگ افزایش می‌یابد (شکل ۱ ج). مطابق با نتایج پژوهش حاضر، مطالعه کاروالهو و همکاران (۲۰۱۷)

با توجه به این‌که روزنه ناکارآمد و لایه کوتیکولی ضعیف تشکیل شده در گیاهان رشد یافته در رطوبت نسبی بالا، به عنوان عوامل اصلی هدررفت آب در طول پسابیدگی در این گیاهان شناخته می‌شود (۱ و ۸)، آزمایش مربوط به پسابیدگی در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که نرخ تعرق در گیاهان تیمار شده با NaCl در مقایسه با گیاهان شاهد در اثر پسابیدگی کاهش یافت (شکل ۱ الف). گیاهان شاهد دارای بیش‌ترین شیب منحنی تعرق (جدول ۲ شیب اول و دوم) بوده و با افزایش غلظت NaCl، شیب منحنی تعرق به طور معنی‌داری کاهش یافت. به‌طوری‌که شیب اول تعرق در تیمار شاهد نسبت به تیمار ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl به‌ترتیب ۲۶ و ۲۵ درصد تندتر بود. شیب دوم منحنی تعرق نیز در تیمار ۵ دسی‌زیمنس بر متر شوری با اختلاف معنی‌دار در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر شوری، به ترتیب ۴۰ و ۳۳ درصد کم‌تر مشاهده شد (جدول ۲ شیب دوم). که بیانگر این است که گیاهان شاهد دارای واکنش‌پذیری روزنه پائین‌تری به مقدار آب نسبی بافت برگ خودشان به دنبال پسابیدگی می‌باشند که این امر با بالا بودن مقدار تعرق برگ مشهود است و دلیل آن تأثیر رطوبت نسبی بالا بر گیاهان درون‌شیشه‌ای است (۴، ۱۰، ۱۱ و ۴۴). و بالا بودن میزان تعرق در تیمار ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl در مقایسه با گیاهان تیمار ۵ دسی‌زیمنس بر متر NaCl، نتیجه اثر تنش‌زای غلظت بالای شوری بر گیاهان کشت بافتی گردو می‌باشد، بنابراین طبق نتایج پژوهش حاضر و در تأیید فرضیه پژوهش کاروالهو و همکاران (۲۰۱۷)، در صورتی که غلظت متوسطی از تنش شوری انتخاب شود، شوری متوسط در طول رشد در تقابل با رطوبت نسبی بالای محیط کشت درون شیشه‌ای، می‌تواند منجر به واکنش استرسی و تحریک عملکرد روزنه

رطوبت نسبی بالا منجر به بسته شدن بیش‌تر روزنه‌ها می‌شود (۱۵). در حالی‌که کیوین و همکاران (۲۰۱۰) کاهش معنی‌دار RWC برگ را در گیاهان تیمار شده با NaCl در مقایسه با گیاهان شاهد نشان دادند که می‌توانست نتیجه دهیدارسیون سلولی در اثر بالا بودن شوری باشد (۳۷).

روی گل رز شاخه بریده نشان داد که با افزایش EC در گیاهان رشد یافته در رطوبت نسبی بالا میزان RWC نیز افزایش می‌یابد. زیرا غشای سلولی در اثر آسیب ناشی از سمیت Na^+ و RH بالا نسبت به آب نفوذپذیرتر می‌شود (۱۶). هم‌چنین کاروالهو و همکاران (۲۰۱۶) حضور چندین ژن مرتبط با مسیر بیوستیزی ABA را تأیید کردند که در پاسخ به





شکل ۱- نرخ تعرق (الف)، میزان آب نسبی بافت برگ (ب)، رابطه بین تعرق و میزان آب نسبی بافت برگ (ج) گیاهان کشت بافتی گردو (رقم چندلر) تحت تنش شوری (۰، ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر).

Fig. 1. Leaf transpiration rate (A), RWC (B) and transpiration rate as a function of RWC (C) of *in vitro* walnut plants (cv. Chandler) under salinity stress (0, 5 and 10 ds.m⁻¹).

جدول ۲- عامل‌های متغیر مربوط به برازش منحنی نرخ تعرق (E) گیاهان کشت بافتی گردو (رقم چندلر) تحت تنش شوری (۰، ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر).

Table 2. Parameters of curve fitting for transpiration rate (E) of *in vitro* walnut plants (cv. Chandler) under salinity stress (0, 5 and 10 ds.m⁻¹).

سدیم کلرید ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl 10 ds.m ⁻¹	سدیم کلرید ۵ دسی‌زیمنس بر متر NaCl 5 ds.m ⁻¹	سدیم کلرید ۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl 0 ds.m ⁻¹	
-1.873±0.14 ^{ab} (-1.572 to -2.174)	-1.764±0.13 ^b (-1.489 to -2.025)	-2.378±0.17 ^a (-2.025 to -2.729)*	شیب اول Slope 1
-0.413±0.05 ^a (-0.3028 to -0.5248)	-0.278±0.05 ^b (-0.1717 to -0.2803)	-0.458±0.06 ^a (-0.3286 to -0.5874)	شیب دوم Slope 2

* فاصله اطمینان (۹۵٪) جهت تعیین اختلاف بین تیمارها.

* Confidence Intervals (95%) to determine the difference between treatments.

جدول ۳- عامل‌های متغیر مربوط به برازش منحنی میزان آب نسبی بافت برگ (RWC) گیاهان کشت بافتی گردو (رقم چندلر) تحت تنش شوری (۰، ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر).

Table 3. Parameters of curve fitting for RWC of *in vitro* walnut plants (cv. Chandler) under salinity stress (0, 5 and 10 ds.m⁻¹).

سدیم کلرید ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl 10 ds.m ⁻¹	سدیم کلرید ۵ دسی‌زیمنس بر متر NaCl 5 ds.m ⁻¹	سدیم کلرید ۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl 0 ds.m ⁻¹	
-80.17±12.88 ^a (-54.30 to -106.0)	-77.33±3.45 ^a (-70.39 to -84.27)	-93.44±8.95 ^a (-75.46 to -111.4)*	شیب اول Slope 1
-23.7±4.75 ^a (-14.15 to -33.25)	-24.38±1.27 ^a (-21.81 to -26.94)	25.89±3.30 ^a (-19.25 to -32.53)	شیب دوم Slope 2

* فاصله اطمینان (۹۵٪) جهت تعیین اختلاف بین تیمارها.

* Confidence Intervals (95%) to determine the difference between treatments.

تنش شوری کاهش معنی‌دار و دو برابری SLA در غلظت‌های ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl در مقایسه با شاهد مشاهده شد. با توجه به این‌که در یک گیاه، کاهش SLA با تشکیل برگ‌های ضخیم و افزایش آن با تشکیل برگ‌های نازک همراه است بنابراین برگ گیاهچه‌های کشت بافتی تحت تنش شوری به‌ازای واحد سطح، ضخیم و آبکی شده و ماده خشک برگ کاهش می‌یابد که نتیجه تأثیر NaCl بر کاهش مصرف آب در اثر بسته شدن روزنه‌های گیاهان کشت بافتی می‌باشد (۱۸). LMA نیز با تیمار ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl تا دو برابر افزایش پیدا کرد که نشان‌دهنده کاهش سطح برگ به‌ازای مقدار ماده خشک اختصاص داده شده به برگ در شرایط تنش شوری می‌باشد. بنابراین با کاهش این میزان از سطح برگ افزایش حدود ۶۰ درصدی LS در گیاهان تحت تیمار NaCl دور از انتظار نبود (جدول ۴).

پرولین و گلاسیسین بتائین دو اسمولیت عمده می‌باشند که در بسیاری از گونه‌های گیاهی در پاسخ به تنش‌هایی مانند شوری، خشکی، دمای بالا، اشعه UV و فلزات سنگین تجمع می‌یابند (۱۲). پرولین یک تنظیم‌کننده اسمزی است که در کاهش پتانسیل اسمزی سلول دخالت داشته و موجب افزایش جذب آب می‌شود و از طریق حفظ پایداری پروتئین‌ها و غشای سلولی، سلول‌ها را از اثرات مخرب تنش محافظت می‌کند (۳۶ و ۴۳). نتایج پژوهش حاضر نشان داد مقدار پرولین و گلاسیسین بتائین به‌طور معنی‌داری با تیمار شوری تحت تأثیر قرار گرفت. به‌طورکلی گیاهان جهت حفاظت از خود و تنظیم وضعیت فیزیولوژیکی تحت تنش‌های شوری و خشکی پرولین سنتز می‌کنند و میزان سنتز آن با افزایش تنش افزایش می‌یابد، به طوری که با افزایش غلظت نمک در گیاهان گردو تحت تنش شوری میزان سنتز پرولین نیز افزایش یافت که نشانگر تلاش گیاه

با اعمال تیمار NaCl، خصوصیات ریخت‌شناختی برگ گیاهان کشت بافتی گردو تحت تأثیر قرار گرفت (جدول ۴). ارتفاع ساقه گیاهچه‌ها اگر چه اختلاف معنی‌داری از نظر آماری نداشتند اما با افزایش غلظت NaCl، کاهش در ارتفاع ساقه مشاهده شد، مطالعه کریمی و همکاران (۲۰۰۵) نیز نشان داد که تیمار شوری تا ۱۵۰ میلی‌مولار تأثیری بر ارتفاع ساقه نداشت (۲۸). در پژوهش حاضر این ممکن است ناشی از پایین بودن غلظت نمک (تا ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر) و یا کوتاه بودن طول مدت آزمایش باشد. در حالی‌که پژوهش ارتورک و همکاران (۲۰۰۷) با افزایش غلظت شوری میزان ارتفاع ساقه کاهش یافت (۱۹). با اعمال تیمار شوری میزان کلروفیل در گیاهچه‌های کشت بافتی گردو به‌طور معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد کاهش یافت که این کاهش در گیاهان تحت تیمار حدود ۳۵ درصد بود. به‌علاوه شاخص آسیب ناشی از شوری به طور معنی‌داری با افزایش غلظت شوری افزایش پیدا کرد و بیش‌ترین علائم در تیمار ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl مشاهده شد، که شامل زردی حاشیه برگ‌ها و نکروز برگ یا قسمتی از شاخه بود. مطالعه ارتورک و همکاران (۲۰۰۷) در رابطه با پاسخ رقم گیسلا-۵-گیلاس نسبت به افزایش غلظت شوری نشان داد که افزایش غلظت شوری، میزان رشد، ارتفاع ساقه، وزن خشک و میزان کلروفیل گیاهچه‌های کشت بافتی را کاهش داده اما تأثیری در میزان آب ندارد. این درحالی است که شاخص شوری (SI) نیز نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار از نظر آسیب شوری در غلظت‌های مختلف شوری در گیلاس بود (۱۹). هم‌چنین تأثیر تنش شوری بر کاهش خصوصیات رشدی گیاه از جمله ارتفاع گیاهچه، تعداد برگ و وزن تر و خشک و افزایش میزان آسیب برگی در مطالعات صورت گرفته توسط قالب و همکاران (۲۰۱۰) و کریمی و همکاران (۲۰۰۵) نشان داده شده است (۲۴ و ۲۸). با اعمال

در گیاه *Sesuvium portulacastrum* L. بیش‌تر افزایش یافت. (۳۲) و در مطالعه صورت گرفته بر روی گیاه *Kochia prostrata*، با افزایش غلظت NaCl میزان سنتز اسمولیت‌های پرولین و گلايسين نیز افزایش یافت و در مقابل کاهش پتانسیل اسمزی مشاهده شد (۲۸). هم‌چنین مطالعات مختلف دیگری بیانگر افزایش معنی‌دار در میزان اسمولیت‌های پرولین و گلايسين بتائین به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد در شرایط تنش و کاهش پتانسیل اسمزی در نتیجه اعمال تنش شوری بوده‌اند (۲۴ و ۲۸). که مطابق با نتایج این آزمایش می‌باشد. به‌طور کلی نتایج مربوط به خصوصیات روزنه‌ای و مورفوفیزیولوژیکی بیانگر این بودند که تنش شوری ملایم (۵ دسی‌زیمنس بر متر) با کم‌ترین اثر تنش‌زا در مقایسه با تنش شوری بالاتر (۱۰ دسی‌زیمنس بر متر)، بیش‌ترین تأثیر را نیز در بهبود واکنش روزنه‌ای و متعاقباً کاهش تعرق گیاهان کشت بافتی گردو در طول پسابیدگی داشته است.

برای افزایش مقاومت در برابر شرایط تنش‌زا بود (۲). مقدار این دو اسمولیت در مطالعه حاضر نیز با افزایش غلظت NaCl افزایش یافت و در تیمار ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl دارای بالاترین مقدار بود. هم‌چنین یکی از سازگاری‌های سلول گیاهی به شوری بالا؛ تنظیم اسمزی است. پتانسیل اسمزی در برگ گیاهان تیمار شده با NaCl ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر در مقایسه با تیمار شاهد به ترتیب دارای کاهش ۲۸ و ۴۹ درصدی بود (جدول ۴). این افزایش اسمولیت‌های سازگار و کاهش پتانسیل اسمزی با افزایش میزان شوری در محیط کشت گیاهان، بیانگر این است که گیاهان در حال سازگار شدن به شرایط تنش موجود بودند به‌طوری‌که طبق مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های بهینه و بیش از حد شوری در شرایط درون‌شیشه‌ای بر پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی، اسمولیت‌ها و رشد درون‌شیشه‌ای صورت گرفت، میزان پرولین و گلايسين بتائین با افزایش غلظت شوری

جدول ۴- اسمولیت‌های سازگار، پتانسیل اسمزی و خصوصیات مورفو-فیزیولوژیکی گیاهان کشت بافتی گردو (رقم چندلر) تحت تنش شوری (۰، ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر).

Table 4. Compatible solutes, osmotic potential (ψ_s) and morpho-physiological characteristics of *in vitro* walnut plants (cv. Chandler) under salinity stress (0, 5 and 10 ds.m⁻¹).

معنی‌داری Significance	سدیم کلرید ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl 100 ds.m ⁻¹	سدیم کلرید ۵ دسی‌زیمنس بر متر NaCl 50 ds.m ⁻¹	سدیم کلرید ۰ دسی‌زیمنس بر متر NaCl 0 ds.m ⁻¹	
0.0431*	5.196±0.039 ^a	5.003±0.095 ^{ab}	4.603±0.197 ^b	پرولین Proline (μmol/g D.M)
0.0059**	1.706±0.047 ^a	1.620±0.031 ^a	1.446±0.025 ^b	گلايسين بتائین Glycinebetaine (μmol/g D.M)
<0.0001**	-2.184±0.021 ^c	-1.555±0.027 ^b	-1.136±0.048 ^a	پتانسیل اسمزی برگ Osmotic potential (MPa)
0.0100*	18.64±2.14 ^b	18.74±2.27 ^b	27.24±1.45 ^a	کلروفیل Chl content (SPAD)
0.3256 ^{ns}	3.96±0.68	4.34±0.75	4.58±0.89	ارتفاع ساقه Shoot length (cm)
<0.0001**	230.28±3.37 ^b	236.62±8.46 ^b	471.9±7.76 ^a	سطح برگ ویژه SLA (cm ² .g ⁻¹)
0<0.0001**	3.00±0.00 ^a	2.20±0.66 ^b	1.00±0.00 ^c	شاخص آسیب شوری Salt injury index (SI)
0.0067**	0.0046±0.03 ^a	0.0045±0.03 ^a	0.0021±0.01 ^b	سطح وزنی برگ Leaf mass area (LMA)
<0.0001**	0.038±0.08 ^a	0.035±0.08 ^a	0.014±0.04 ^b	میزان آبدار بودن برگ Leaf succulence (LS)

خصوصیات مورفو- فیزیولوژیکی نشان داد که نه تنها اعمال تنش شوری متوسط در توسعه روزنه‌های کارآمد نقش دارد بلکه اثرات تنش‌زای کم‌تری نیز در مقایسه با غلظت‌های بالای این تیمار دارد که منجر به ایجاد سیگنال تنش و تحریک عملکرد روزنه می‌شود. از آنجایی که گیاهان کشت بافتی بلافاصله پس از قرارگیری در شرایط برون‌شیشه‌ای دچار پس‌آیدگی شده و میزان موفقیت انتقال آن‌ها به شدت کاهش می‌یابد، بنابراین افزایش واکنش‌پذیری روزنه از طریق تنش ملایم شوری به‌عنوان سازگارسازی درون‌شیشه‌ای می‌تواند میزان هدررفت آب برگ و اتلاف گیاهان کشت بافتی در طول پس‌آیدگی را کاهش دهد.

نتیجه‌گیری

گیاهانی که در رطوبت نسبی بالا رشد می‌کنند، در واکنش به بسته شدن روزنه‌ها دچار اختلال می‌شوند، با فرض این‌که تنش ملایم شوری می‌تواند بر بهبود مورفولوژی روزنه و واکنش‌پذیری آن در گیاهان کشت بافتی گردو تأثیر داشته و منجر به افزایش ظرفیت نگهداری آب در طول پس‌آیدگی شود، تنش شوری در سه غلظت صفر، ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر اعمال شد. نتایج این آزمایش نشانگر تأثیر مثبت تنش شوری ملایم (۵ NaCl دسی‌زیمنس بر متر) بر بسته شدن روزنه و کاهش نرخ تعرق بود که منجر به افزایش RWC و ظرفیت نگهداری آب در برگ گیاهان کشت بافتی گردو شد. همچنین بررسی

منابع

1. Aguilar, M., Espadas, F., Coello, J., Maust, B., Trejo, C., Robert, M. and Santamaria, J. 2000. The role of abscisic acid in controlling leaf water loss, survival and growth of micropropagated *Tagetes erecta* plants when transferred directly to the field. *J. Exp. Bot.* 51: 1861-1866.
2. Akça, Y. and Samsunlu, E. 2012. The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, proline and nutrient accumulation, and K/Na ratio in walnut. *Pak. J. Bot.* 44: 1513-1520.
3. Ali-Ahmad, M., Hughes, H.G. and Safadi, F. 1998. Studies on stomatal function, epicuticular wax and stem-root transition region of polyethylene glycol-treated and nontreated *in vitro* grape plantlets. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 34: 1-7.
4. Aliniaiefard, S., Asayesh, Z.M., Driver, J. and Vahdati, K. 2020. Stomatal features and desiccation responses of Persian walnut leaf as caused by *in vitro* stimuli aimed at stomatal closure, *Trees*, 34: 5. 1219-1232.
5. Aliniaiefard, S., Malcolm Matamoros, P. and Van Meeteren, U. 2014. Stomatal malfunctioning under low VPD conditions: induced by alterations in stomatal morphology and leaf anatomy or in the ABA signaling? *Physiol. Plant.* 152: 688-699.
6. Aliniaiefard, S. and van Meeteren, U. 2013. Can prolonged exposure to low VPD disturb the ABA signalling in stomatal guard cells? *J. Exp. Bot.* 64: 3551-3566.
7. Aliniaiefard, S. and van Meeteren, U. 2014. Natural variation in stomatal response to closing stimuli among *Arabidopsis thaliana* accessions after exposure to low VPD as a tool to recognise the mechanism of disturbed stomatal functioning. *J. Exp. Bot.* 65: 6529-6542.
8. Arve, L.E., Kruse, O.M.O., Tanino, K.K., Olsen, J.E., Futsaether, C. and Torre, S. 2015. Growth in continuous high air humidity increases the expression of CYP707A-genes and inhibits stomatal closure. *Environ. Exp. Bot.* 115: 11-19.
9. Arve, L.E., Terfa, M.T., Gisleord, H.R., Olsen, J.E. and Torre, S. 2013. High relative air humidity and continuous light reduce stomata functionality by affecting the ABA regulation in rose leaves. *Plant, Cell Envir.* 36: 382-392.

10. Asayesh, Z.M., Vahdati, K. and Aliniaiefard, S. 2017a. Investigation of physiological components involved in low water conservation capacity of *in vitro* walnut plants. *Sci. Hort.* 224: 1-7.
11. Asayesh, Z.M., Vahdati, K., Aliniaiefard, S. and Askari, N. 2017b. Enhancement of *ex vitro* acclimation of walnut plantlets through modification of stomatal characteristics *in vitro*. *Sci. Hort.* 220: 114-121.
12. Ashraf, M. and Foolad, M. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59: 206-216.
13. Bates, L., Waldren, R. and Teare, I. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil.* 39: 205-207.
14. Campanelli, A., Ruta, C., Morone-Fortunato, I. and De Mastro, G. 2013. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) clones tolerant to salt stress: *in vitro* selection. *Cent. Eur. J. Biol.* 8: 765-776.
15. Carvalho, D.R., Vasconcelos, M.W., Lee, S., Koning-Boucoiran, C.F., Vreugdenhil, D., Krens, F.A., Heuvelink, E. and Carvalho, S.M. 2016. Gene expression and physiological responses associated to stomatal functioning in *Rosa* × *hybrida* grown at high relative air humidity. *Plant Sci.* 253: 154-163.
16. Carvalho, D.R., Vasconcelos, M.W., Lee, S., Vreugdenhil, D., Heuvelink, E. and Carvalho, S.M. 2017. Moderate salinity improves stomatal functioning in rose plants grown at high relative air humidity. *Environ. Exp. Bot.* 143: 1-9.
17. Cha-um, S., Mosaleeyanon, K., Kirdmanee, C. and Supaibulwatana, K. 2003. A more efficient transplanting system for Thai neem (*Azadirachta siamensis* Val.) by reducing relative humidity. *Sci. Asi.* 29: 189-196.
18. Chartzoulakis, K. and Klapaki, G. 2000. Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Sci. Hort.* 86: 247-260.
19. Erturk, U., Sivritepe, N., Yerlikaya, C., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. 2007. Responses of the cherry rootstock to salinity *in vitro*. *Biol. Plant.* 51: 597-600.
20. Fabbri, A., Sutter, E. and Dunston, S.K. 1986. Anatomical changes in persistent leaves of tissuecultured strawberry plants after removal from culture. *Sci. Hort.* 28: 331-337.
21. Fanourakis, D., Bouranis, D., Giday, H., Carvalho, D.R., Nejad, A.R. and Ottosen, C.O. 2016. Improving stomatal functioning at elevated growth air humidity: a review. *J. Plant Physiol.* 207: 51-60.
22. Fanourakis, D., Carvalho, S.M., Almeida, D.P., van Kooten, O., van Doorn, W.G. and Heuvelink, E. 2012. Postharvest water relations in cut rose cultivars with contrasting sensitivity to high relative air humidity during growth. *Postharvest Biol. Technol.* 64: 64-73.
23. Fanourakis, D., Heuvelink, E. and Carvalho, S.M. 2013. A comprehensive analysis of the physiological and anatomical components involved in higher water loss rates after leaf development at high humidity. *J. Plant Physiol.* 170: 890-898.
24. Ghaleb, W.S., Sawwan, J.S., Akash, M.W. and Al-Abdallat, A.M. 2010. *In vitro* response of two Citrus rootstocks to salt stress. *Int. J. Fruit Sci.* 10: 40-53.
25. Giday, H., Fanourakis, D., Kjaer, K.H., Fomsgaard, I.S. and Ottosen, C.O. 2014. Threshold response of stomatal closing ability to leaf abscisic acid concentration during growth. *J. Exp. Bot.* 65: 4361-4370.
26. Grieve, C. and Grattan, S., 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant Soil.* 70: 303-307.
27. Hazarika, B. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci. Hort.* 108: 105-120.
28. Karimi, G., Ghorbanli, M., Heidari, H., Nejad, R.K., Assareh, M. 2005. The effects of NaCl on growth, water relations, osmolytes and ion content in *Kochia prostrata*. *Biol. Plant.* 49: 301-304.

29. Khan, P., Evers, D. and Hausman, J. 1999. Stomatal characteristics and water relations of *in vitro* grown *Quercus robur* NL 100 in relation to acclimatization. *Silvae Gen.* 48: 83-86.
30. Kumar, K. and Rao, I. 2012. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in *Ex Vitro* conditions-A Review. *J. Hort. Proc.* 2: 271-283.
31. Lawlor, D. 1970. Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth. *New Phytol.* 69: 501-513.
32. Lokhande, V.H., Nikam, T.D., Patade, V.Y., Ahire, M.L. and Suprasanna, P. 2011. Effects of optimal and supra-optimal salinity stress on antioxidative defence, osmolytes and *in vitro* growth responses in *Sesuvium portulacastrum* L. *Plant Cell Tissue Org.* 104: 41-49.
33. Lovelli, S., Scopa, A., Perniola, M., Di Tommaso, T. and Sofo, A. 2012. Abscisic acid root and leaf concentration in relation to biomass partitioning in salinized tomato plants. *J. Plant Physiol.* 169: 226-233.
34. Martinez, J.P., Lutts, S., Schanck, A., Bajji, M. and Kinet, J.M. 2004. Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus* L? *J. Plant Physiol.* 161: 1041-1051.
35. Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681.
36. Ozden, M., Demirel, U. and Kahraman, A. 2009. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Sci. Hort.* 119: 163-168.
37. Qin, J., Dong, W., He, K., Yu, Y., Tan, G., Han, L., Dong, M., Zhang, Y., Zhang, D. and Li, A. 2010. NaCl salinity-induced changes in water status, ion contents and photosynthetic properties of *Shepherdia argentea* (Pursh) Nutt. Seedlings. *Plant, Soil Environ.* 56: 325-332.
38. Raven, J.A. 2014. Speedy small stomata? *J. Exp. Bot.* 65: 1415-1424.
39. Rezaei Nejad, A. and Van Meeteren, U. 2005. Stomatal response characteristics of *Tradescantia virginiana* grown at high relative air humidity. *Physiol. Plant.* 125: 324-332.
40. Safadi, F. and Hughes, H. 1990. Comparison of the diffusive resistance of Polyethylene glycol treated and non-treated tissue culture tobacco plantlets. *HortScience.* 25: 1105-1105.
41. Slavik, B. 1974. *Methods of Studying Plant Water Relations.* Chapman and Hall, London.
42. Solarova, J. and Pospisilova, J. 1997. Effect of carbon dioxide enrichment during *in vitro* cultivation and acclimation to *ex vitro* conditions. *Biol. Plant.* 39: 23-30.
43. Taylor, C.B. 1996. Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. *The Plant Cell.* 8: 1221-1224.
44. Vahdati, K., Asayesh, Z.M., Aliniaiefard, S. and Leslie, C. 2017. Improvement of ex vitro Desiccation desiccation through elevation of CO₂ concentration in the atmosphere of culture vessels during *in vitro* growth. *Hort. Sci.* 52: 1006-1012.

