Journal of Vegetables Sciences, Spring & Summer 2021, Vol 9, No 5(1), Pages 35-49

doi: 10.22034/iuvs.2021.533888.1169 Article Type: Research Online ISSN: 2676-4822

Improving the Growth of Ooctoploid Asparagus Embryos under Osmotic Conditions

Aghileh Lotfi[1], Yousef Hamid-Oghli[2] and Seyyed Javad Mousavizadeh[3*]

1- M.Sc. Student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Guilan University, Rasht, Iran
2- Associated Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Guilan University, Rasht, Iran
3- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Gorgan University of agricultural sciences and natural resources, Gorgan, Iran

[*]**Corresponding author:** mousavizadeh@gau.ac.ir

(**Received:** 14 July 2021 **Revise:** 25 July 2021 **Accepted:** 16 August 2021)

Extended Abstract

1. Introduction: Micropropagation of plants in *in vitro* condition with high relative humidity causes plants to wilt by transfer to *in vivo* condition. High relative humidity is one of the main factors disrupting stomatal function in the stress condition, darkness and the presence of ABA. Therefore, any factor that can affect the closure of the stomatal in *in vitro*, can lead to increased success in adaptation and transfer of tissue culture plants to *in vivo* condition. Embryogenesis is a technique in which bipolar structures are formed from somatic cells. During the cell differentiation process, the explant responds to endogenous stimuli and, as a result, directs the cell program. The induction and growth of somatic embryos are affected by the composition of the medium, especially sugar and osmotic conditions. In the present study, the effect of osmotic conditions was investigated on somatic embryo number, relative growth rate, photosynthetic pigments and proline of octoploid asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenesis.

2. Materials and Methods: *Asparagus officinalis* L., a native Iranian octoploid, was used in this project. The seeds were first washed with water and then immersed in 70% alcohol for 30 seconds. Seed disinfection was performed with 2% sodium hypochlorite for 15 minutes. The seeds were then washed three times with sterile distilled water and then dried with filter paper and placed on culture media. The B5 liquid medium containing 2 mg L^{-1} 2, 4-D was used for induction of somatic embryogenesis. Sucrose with two concentrations of 40 and 60 gL^{-1}, polyethylene glycol (PEG) with three concentrations of 30, 15 and 60 gL^{-1}, abscisic acid (ABA) of 5 and 10 µM, 4 and 6 dSm^{-1} of salinity using NaCl were used to apply osmotic stress to asparagus somatic embryos. The cultured media were kept in a growth chamber with 3000 lux light at 25 ±2°C for 16 hours. Four weeks after culture, embryos were examined and recorded for regenerative capacity.

3. Results and Discussion: According to the results, the highest number of spherical embryos (3.16) was related to PEG60 g, which was not statistically significantly different from 6 dS m^{-1} NaCl (2.16). The highest number of bipolar embryos (13.16) was related to 6 dS m^{-1} NaCl. PEG 60 g with 6.16 showed the highest number of bipolar embryos. The highest relative growth rate was observed in PEG 15 g (11.37 mg day^{-1}) and 4 dS m^{-1} of NaCl (11.23 mg day^{-1}). The lowest relative growth rate was recorded in 10 µM ABA (3.47 mg day^{-1}). Based on the comparison results, the highest mean of chlorophyll a (0.077 mg FW^{-1}) was related to 60 g PEG and the lowest (0.028 mg FW^{-1}) was related to sucrose 60 g. The highest amount of chlorophyll b (0.103 mg kg^{-1}FW) was related to 60 PEG g and the lowest amount (0.01 and 0.007 mg kg^{-1} FW) was related to 10 µM ABA. The highest amount of total chlorophyll (0.180 mg kg^{-1} FW) was related to PEG 60 g and the lowest amount (0.0199 mg kg^{-1} FW) was related to 10 µM ABA. The highest amount of carotenoids (0.054 and 0.047 mg kg^{-1} FW) were related to PEG 60 g and sucrose 40 g, respectively. The highest amount of anthocyanin (0.184 mg kg^{-1} FW) was obtained in 10 µM ABA and the highest amount of proline (67.66 µmol g^{-1} FW) was obtained in 5 µM ABA.

4. Conclusion: Finally, salinity of 6 dS, PEG 60 g and ABA at a concentration of 5 µM with the least stressful effect compared to sucrose, had the greatest effect on the growth and development of asparagus somatic embryos which is recommended in the production stages of clones in asparagus. By applying high concentrations of polyethylene glycol due to osmotic pressure and stress, the production of oxygen free radicals increases and chloroplast structure destruction occurs. By inhibiting the biosynthesis of new chlorophylls and converting carotenoids to anthocyanins, it reduces the content of chlorophyll, carotenoid and increases anthocyanin. The *in vitro* response of asparagus somatic embryos to increased osmotic pressure with PEG is to increase the concentration of chlorophyll and anthocyanin. Increasing the osmotic pressure of the medium with sucrose led to an increase in proline in somatic embryos. Proline synthesis increases with increasing stress, which indicates the embryos effort to increase resistance to stressful conditions.

Keywords: Anthocyanins, Octaploid Asparagus, Osmotic substances, Photosynthetic pigments.

Citation: Lotfi, A., Hamid-Oghli, Y. & Mousavizadeh, S. J. (2021). Improving the growth of Ooctoploid Asparagus embryos under osmotc conditions. *Journal of Vegetables Sciences*, 5(1), 35-49. doi: 10.22034/iuvs.2021.533888.1169

Copyrights:
Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted to Journal of Vegetables Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/ by/4.0).

دوفصلنامه علمی علوم سبزی‌ها، سال ۵، دوره ۹، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۰، صفحات (۴۹-۳۵)

شاپا الکترونیکی: ۴۸۲۲-۲۶۷۶ نوع مقاله: پژوهشی doi: 10.22034/iuvs.2021.533888.1169

بهبود رشد جنین‌های رویشی مارچوبه اکتاپلوئید در شرایط اسمزی

عقیله لطفی[۱]، یوسف حمیداوغلی [۲] و سید جواد موسوی‌زاده [۳*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[*]نویسنده مسئول: mousavizadeh@gau.ac.ir

(**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۰/۰۴/۲۳ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۰/۰۵/۰۳ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۰۵/۲۵)

چکیده

جنین‌زایی رویشی، روشی است که در آن ساختارهای دوقطبی، از سلول بدنی ایجاد می‌شود. در طی فرآیند تمایز سلول، ریزنمونه به محرک‌های درون‌زا پاسخ می‌دهد و در نتیجه، برنامه سلول را جهت می‌دهد. در این پژوهش بررسی تأثیر شرایط اسمزی بر تعداد جنین، سرعت رشد نسبی جنین، رنگیزه‌های فتوسنتزی و پرولین جنین‌های رویشی مارچوبه (*Asparagus officinalis* L.) اکتاپلوئید مورد بررسی قرار گرفته است. برای القای جنین رویشی از محیط کشت مایع B5 حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر D-۲،۴ استفاده شد و در ادامه از ساکارز با دو غلظت ۴۰ و ۶۰ گرم در لیتر، پلی‌اتیلن‌گلایکول (PEG) با سه غلظت ۱۵، ۳۰ و ۶۰ گرم در لیتر، پنج و ۱۰ میکرومولار آبسیزیک‌اسید و برای اعمال تنش اسمزی چهار و شش دسی‌زیمنس بر متر شوری با کاربرد نمک کلرید سدیم بر جنین‌های رویشی مارچوبه استفاده شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، بیشترین تعداد جنین کروی (۳/۱۶ عدد) با کاربرد ۶۰ گرم PEG به‌دست آمد که با تیمار شش دسی‌زیمنس کلرید سدیم (۲/۱۶ عدد) تفاوت معنی‌داری نداشت. بالاترین تعداد جنین دوقطبی (۱۳/۱۶ عدد) مربوط به تیمار شش دسی‌زیمنس کلرید سدیم بود. بعد از آن ۶۰ گرم PEG با ۶/۱۶ عدد بیشترین تعداد جنین دوقطبی را نشان داد. بالاترین سرعت رشد نسبی جنین در تیمارهای ۱۵ گرم PEG (۱۱/۳۷ میلی‌گرم در روز) و چهار دسی‌زیمنس کلرید سدیم (۱۱/۲۳ میلی‌گرم در روز) مشاهده شد. کمترین سرعت رشد نسبی جنین در ۱۰ میکرومولار آبسیزیک‌اسید (۳/۴۷ میلی‌گرم در روز) ثبت شد. در تیمارهای ۶۰ گرم PEG و ۱۰ میکرومولار آبسزیک‌اسید با ۰/۱۸۰ و ۰/۰۱۹ میلی‌گرم بر وزن تر به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان کلروفیل کل ثبت شد. بیشترین مقدار کاروتنوئید (۰/۰۵۴ و ۰/۰۴۷ میلی‌گرم بر وزن تر) مربوط به تیمارهای ۶۰ گرم PEG و ۴۰ گرم ساکارز بود. بیشترین مقدار آنتوسیانین (۰/۱۸۴ میلی‌گرم بر وزن تر) در ۱۰ میکرومولار آبسزیک‌اسید و بیشترین میزان پرولین (۶۷/۶۶ میکرومول بر گرم وزن تر) در پنج میکرومولار آبسزیک‌اسید به‌دست آمد. در نهایت شوری شش دسی‌زیمنس بر متر، ۶۰ گرم PEG و پنج میکرومولار آبسزیک‌اسید با کمترین اثر تنش‌زا در مقایسه با ساکارز، بیشترین تأثیر را در رشد و بهبود تکامل جنین‌های رویشی مارچوبه داشته است که در مراحل تولید کلون در مارچوبه قابل‌توصیه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، رنگیزه‌های فتوسنتزی، مارچوبه اکتاپلوئید، مواد اسمزی.

استناد: لطفی، ع.، حمیداوغلی، ی. و موسوی‌زاده، س. ج. (۱۴۰۰). بهبود رشد جنین‌های رویشی مارچوبه اکتاپلوئید در شرایط اسمزی. *علوم سبزی‌ها*، ۵(۱)، ۴۹-۳۵.

حق چاپ:

حق چاپ برای نویسنده (گان) این مقاله محفوظ است. بر اساس قوانین انتشارات با دسترسی آزاد، تمام مطالعات چاپ شده در این مجله به‌صورت آزاد در وب سایت مجله برای عموم بدون پرداخت هزینه قابل‌دسترس است.

مقدمه

مارچوبه (*Asparagus officinalis* L.) گیاهی چندساله، علفی، دوپایه، با بیش از یک متر ارتفاع از تیره Asparagaceae است که برای ساقه خوراکی، ترد و بدون انشعابش که اصطلاحاً اسپیر (Spear) نامیده می‌شود، کشت می‌گردد. گونه‌های خودرو مارچوبه در ایران از سواحل دریای خزر با کمترین ارتفاع تا مناطق کوهستانی با بیشترین ارتفاع از سطح دریا یافت می‌شوند (Mousavizadeh *et al*., 2015; 2016). سطوح مختلف پلوئیدی از دیپلوئید تا دکاپلوئید در مارچوبه‌های بومی ایران شناسایی شده است (Mousavizadeh *et al*., 2016).

تکنیک کشت بافت شامل کشت سلول یا قطعات جدا شده بافت گیاهی در یک محیط کشت غذایی است. در مواردی تولید گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای از طریق جنین‌زایی رویشی انجام می‌شود. جنین حاصل از بافت‌های غیرجنسی را جنین‌زایی رویشی می‌گویند. چندین عامل می‌تواند جنین‌زایی رویشی را القا کند از جمله؛ شرایط محیط کشت، غلظت زیاد هورمون‌ها و زخمی شدن ریزنمونه انواع دیگری از عواملی هستند که می‌تواند باعث تغییر برنامه‌های سلولی و مولکولی سلول‌های گیاهی شود. نوع ریزنمونه، سن و ژنوتیپ گیاه مادری، شرایط فیزیولوژیکی و تراکم سلولی در مورد کشت‌های سوسپانسیون عواملی هستند که جنین‌زایی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Mashayekhi, 2007). 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 نتیجه‌ی اختلال در عملکرد، روزنه‌ها دیگر قادر به بسته شدن در پاسخ به محرک‌های بسته شدن روزنه مانند تاریکی، آبسیزیک‌اسید (ABA) و افزایش سطح کلسیم نباشند (Giday *et al*., 2014)؛ چرا که رطوبت نسبی بالا یکی از اصلی‌ترین عوامل مختل‌کننده عملکرد روزنه در شرایطی مانند تنش، تاریکی و حضور ABA است (Fanourakis *et al*., 2016). بنابراین هر عاملی که بتواند در بسته نگهداشتن روزنه در شرایط درون شیشه‌ای تأثیر داشته باشد، می‌تواند منجر به افزایش میزان موفقیت در مرحله سازگارسازی و انتقال گیاهان کشت بافتی به شرایط برون شیشه‌ای شود.

القا و رشد جنین‌های رویشی تحت تأثیر ترکیبات محیط کشت به‌خصوص قندها و ترکیبات اسمزی قرار می‌گیرد. از ساکارز به‌عنوان یکی از منابع کربوهیدرات در کشت بافت گیاهی استفاده می‌شود، غلظت‌های مختلف ساکارز بر سلول‌های رویشی ریزنمونه‌ها اثرگذار است. به‌طور کلی تنش اسمزی سبب تولید پرولین و کاهش پتانسیل اسمزی سلول‌ها شده و گیاه نسبت به تنش مقاومت بیشتری خواهد داشت. گزارش شده است که اضافه نمودن قندها و نمک‌ها اثر منفی بر پایداری آنتوسیانین دارد. تنش خشکی همچنین سبب صدمه به کلروپلاست و کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌شود (Khalid *et al*., 2010). کاروتنوئیدها به‌عنوان محافظ کلروفیل عمل می‌کنند به همین دلیل کاروتنوئیدها می‌توانند نشانگر خوبی برای تنش باشند (Sircelj *et al*., 2007). نوع قند و غلظت آن‌ها در موفقیت کشت در شرایط آزمایشی نقش دارند. در مطالعه‌ای، تأثیر سه منبع کربن دکستروز، ساکارز و سوربیتول در محیط MS در چهار غلظت (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ گرم در لیتر) برای ریزازدیادی موز (*Musa sapientum* L.) استفاده شد و بیان شد که نتیجه قابل‌توجهی در ۳۰ گرم در لیتر ساکارز در مقایسه با دکستروز و سوربیتول به‌دست آمد (Memon *et al*., 2019).

تنش اسمزی از طریق تأثیر بر فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی و رشد گیاه مانند فتوسنتز و تنفس سلولی منجر به کاهش جذب یون‌ها، کاهش تولید کربوهیدرات‌ها و اختلال در متابولیسم رشد می‌شود. طبق پژوهش‌ها رنگدانه‌های فتوسنتزی که نقش اساسی در ساختار و تأمین انرژی گیاه به جهت جذب نور و تولید ATP و NADPH ایفا می‌کنند، تحت تأثیر خشکی قرار می‌گیرند (Taiz & Zeiger, 2002). در گیاهان، تنش خشکی ناشی از تفاوت فشار اسمزی بین

خاک و گیاه است. تنظیم اسمزی سازوکاری است که منجر به نگهداری آب و حفظ تورژسانس سلول‌ها در اثر بروز تنش می‌گردد. این فرآیند ناشی از تجمع مولکول‌ها و ترکیبات فعال اسمزی از جمله قندهای محلول و پرولین در محیط سلول می‌باشد (Taiz & Zeiger, 2002).

اسید آبسیزیک (ABA: Abssisic acid) یک بازدارنده رشد گیاهی است که اثرات فیزیولوژیکی زیادی بر رشد و تمایز گیاه دارد. این ماده به‌عنوان یک پیام‌رسان، در پاسخ به تنش‌های خشکی و سایر تنش‌های محیطی و نیز در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی از قبیل فتوسنتز و تنظیم باز و بسته شدن روزنه‌ها نقش دارد (Zeevart *et al*., 2003). پژوهش‌های زیادی مبنی بر تأثیر ABA در رفع اثرات تنش خشکی در گیاهان در مرحله قبل از برداشت و پس از برداشت وجود دارد (John & Jones, 2010; Sharma *et al*., 2006). در مطالعه‌ای روی گیاه جعفری زینتی (*Tagetes patula* L.) مشخص شد که افزودن ABA به محیط کشت درون شیشه‌ای، درصد زنده‌مانی و میزان رشد را بعد از انتقال به شرایط مزرعه افزایش و میزان از دست‌دهی آب را کاهش می‌دهد (Aguilar *et al*., 2000). زیرا ABA هورمون تنش بوده که در مقابل تنش باعث ایجاد مقاومت در گیاهان شده و باعث تعدیل اثرات خشکی می‌گردد (Bolli & Dalmear, 2010).

پلی‌اتیلن‌گلایکول (PEG: Polyethylene glycol) یک پلیمر با وزن مولکولی بالا، جذب‌کننده آب، قابل‌انعطاف، غیرسمی و غیریونی است و باعث ایجاد فشار اسمزی منفی می‌شود. PEG با وزن مولکولی بالا نمی‌تواند به دیواره سلولی نفوذ کند و مثل خاک خشک عمل می‌کند، تأثیر سمیت بر گیاهان ندارد و با جلوگیری از ورود آب به داخل سلول باعث ایجاد تنش خشکی می‌شود (Rock & Quatrano, 1995). تحقیقات زیادی در مورد استفاده از پلی‌اتیلن‌گلایکول برای اعمال تنش خشکی در شرایط درون شیشه‌ای وجود دارد. گزارش شده است که بررسی برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در شرایط تنش خشکی اعمال شده با پلی‌اتیلن‌گلایکول در محیط درون شیشه‌ای، می‌تواند در انتخاب گونه‌های متحمل کمک کند و همچنین به‌عنوان روشی برای ارزیابی پاسخ‌های گیاهان به تنش خشکی باشد (Salma *et al*., 2016). جنین‌های رویشی القا شده از کشت میکروسپور کلزا (*Brassica napus* L.) در مرحله کوتیلدونی با کاربرد PEG تحت تنش اسمزی قرار داده شده‌اند و تجمع آبسیزیک‌اسید در گیاهچه‌ها و به‌دنبال آن افزایش مقاومت به تنش گزارش شده است (Urban *et al*., 2021).

در این تحقیق، با ایجاد شرایط اسمزی با کلرید سدیم، پلی‌اتیلن‌گلایکول، ساکارز و آبسیزیک‌اسید، اثرات اسمزی بر تکامل رشد جنین‌زایی رویشی مارچوبه اکتاپلوئید در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

ابتدا نمونه‌های بذر مارچوبه با سطح پلوئیدی اکتاپلوئید (Mousavizadeh *et al*., 2016) از شهرستان بلده استان مازندران جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. از محیط کشت جامد پایه B5 (Gamburg *et al*., 1968) برای جوانه‌زنی بذور استفاده گردید. پس از آماده‌شدن محیط‌های کشت و توزین آن‌ها در شیشه‌های مربایی، در اتوکلاو (Reyhan Teb, RT-2, IRAN) دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. جهت کشت، ابتدا بذور با آب معمولی شسته و سپس به‌مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد شست‌وشو گردیدند. ضدعفونی بذور با هیپوکلرید سدیم دو درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. سپس بذور سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو شده و بعد با کاغذ صافی اتوکلاو شده، خشک شده و روی محیط‌های کشت استقرار یافتند.

آماده‌سازی محیط کشت

ابتدا استوک محیط‌های کشت پایه B5 تهیه شد. در این تحقیق از اکسین 2,4-D با غلظت‌های دو پی‌پی‌ام

در محیط مایع B5 برای القای جنین استفاده گردید (Mousavizadeh *et al*., 2017). pH محیط‌های کشت با استفاده از دستگاه pHمتر (Labtron, pH Meter-Thermometer, pHT 110, IRAN) و با کاربرد سود (NaoH) یا اسیدکلریدریک (HCl) در محدوده ۵/۷ تنظیم شد. پس از آماده کردن محیط‌های کشت و اعمال تیمارها، محلول‌ها در ظروف T شکل توزیع شدند. در هر ظرف، ۲۵ میلی‌لیتر از محلول مایع محیط کشت توزین شد. آنگاه درب ظروف با سه لایه فویل بسته و با اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۳ اتمسفر استریل شدند. سپس ظروف محتوی گیاهچه‌های استریل و ابزار مورد نیاز جهت کشت که قبلاً استریل شده بود، بعد از اسپری با الکل ۷۰ درصد به زیر هود (Laminar Flow Hood) منتقل و آنگاه لامپ UV هود به‌مدت ۳۰ دقیقه روشن گردید.

القای جنین‌زایی رویشی

برای القای جنین از ریزنمونه‌های تک گره (حاوی یک جوانه) گیاهچه‌های رشد کرده درون شیشه استفاده شد (Mousavizadeh *et al*., 2017). برای تهیه ریزنمونه‌های تک گره، اندام هوایی گیاهچه به قطعاتی با طول یک سانتی‌متر حاوی یک گره تقسیم شده، آنگاه با پنس بزرگ استریل، به ظروف حاوی محیط کشت مایع فاز القا، منتقل گردیدند. در هر ظرف سه ریزنمونه قرار داده و سپس درب ظروف توسط فویل استریل پوشانده و با پارافیلم کاملاً درزگیری شد. سپس در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت نور (۳۰۰۰ لوکس توسط لامپ‌های فلورسنت) به‌مدت ۵-۴ هفته در دستگاه آکسوفیتون (Auxophyton Steward) نگهداری شدند (Mashayekhi, 2007). بعد از گذراندن فاز القا (چهار هفته) نمونه‌ها وارد فاز رئالیزاسیون شدند. عمل واکشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های قبل اما با هدف ظهور جنین‌ها (فاز رئالیزاسیون) در حالی‌که هورمون 2,4-D از آن‌ها حذف شده، انجام گرفت. جهت حذف کامل هورمون، ریزنمونه‌ها در محیط کشت مایع، در سه مرحله به فواصل پنج، ۱۰ و ۱۵ دقیقه شست‌وشو شدند. پس از گذشت چهار هفته، جنین‌های رویشی در مراحل کروی شکل و دوقطبی قابل‌مشاهده هستند.

محیط کشت تنش اسمزی جنین‌های رویشی

به‌منظور تکامل و باززایی جنین‌ها در محیط‌های کشت مایع B5 هورمون کینتین با غلظت دو میلی‌گرم بر لیتر به محیط اضافه شد. در همین هنگام جهت غربالگری جنین‌ها به شرایط اسمزی از تیمارهای خشکی، شوری، قند و آبسیزیک‌اسید استفاده شد. دو تیمار شوری نمک سدیم کلرید بر اساس آستانه شوری مارچوبه (چهار دسی‌زیمنس بر متر) اعمال شدند. بر این اساس شوری چهار و شش دسی‌زیمنس بر متر برابر با ۴۳/۷۶ و ۶۵/۶۴ میلی‌مولار نمک کلریدسدیم در محیط‌های کشت تیمار شدند (Mousavizadeh *et al*., 2017). همچنین پلی‌اتیلن‌گلایکول (PEG-6000) با غلظت‌های ۱۵، ۳۰، ۶۰ گرم بر لیتر به‌ترتیب معادل ۰/۳-، ۰/۶- و ۱/۲ - مگاپاسکال (Bittencourt *et al*., 2004)، آبسیزیک‌اسید (پنج و ۱۰ میکرومولار) و ساکارز (۴۰ و ۶۰ گرم در لیتر) اعمال شدند (Mashayekhi, 2007)، سپس جنین‌ها در مرحله کروی و دوقطبی به محیط‌های کشت منتقل شدند. محیط‌های کشت شده در اتاقک رشد با نور ۳۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۶ ساعت نگهداری شدند. چهار هفته بعد از کشت، جنین‌ها از نظر ظرفیت باززایی به‌صورت تشکیل شاخه و ریشه مورد بررسی و ثبت قرار گرفتند. همچنین صفت‌های آنتوسیانین (Wanger, 1979)، کلروفیل و کاروتنوئید (Lichtenthalr *et al*., 1987) و پرولین (Bates *et al*., 1973) اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری قطر اسپیر و ریشه توسط کولیس، اندازه‌گیری طول اسپیر و ریشه توسط خط‌کش، اندازه‌گیری وزن تر با استفاده از ترازو (Sartorious, Germany, TE313S) انجام شد.

سرعت رشد نسبی جنین‌ها (Relative Growth Rate: RGR) بر مبنای وزن تر جنین تعیین شد (Shah *et al*., 1990). بدین صورت که جنین‌ها از محیط‌های کشت دارای تیمار برداشت شدند و وزن تر

آن‌ها (W_2) اندازه‌گیری گردید. وزن تر اولیه (W_1) نیز در ابتدای کشت به‌دست آمده بود. با استفاده از رابطه ۱ سرعت رشد نسبی جنین محاسبه گردید.

رابطه (۱) $RGR: [Log (W_2) – Log (W_1)/$روز

طرح آماری

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با نُه تیمار در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار SAS var 9.1 (۲۰۰۱) و مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد انجام گرفت. داده‌های حاصل از تعداد جنین کروی شکل و جنین دوقطبی با استفاده از تبدیل جذری $\sqrt{X+0.5}$ نرمال شدند.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج مقایسه میانگین بیشترین میزان کلروفیل a (۰/۰۷۷ میلی‌گرم بر وزن تر) مربوط به تیمار ۶۰ گرم PEG و کمترین میزان آن (۰/۰۲۸ میلی‌گرم بر وزن تر) مربوط به تیمار ۶۰ گرم ساکارز بود که البته از لحاظ آماری با تیمارهای پنج میکرومولار آبسزیک‌اسید، ۳۰ و ۱۵ گرم PEG تفاوت معنی‌داری نداشت. بیشترین میزان کلروفیل b (۰/۱۰۳ میلی‌گرم بر وزن تر) مربوط به تیمار ۶۰ گرم PEG و کمترین میزان آن (۰/۰۱ و ۰/۰۰۷ میلی‌گرم بر وزن تر) مربوط به تیمارهای ۱۰ میکرومولار آبسزیک‌اسید بود. بیشترین میزان کلروفیل کل (۰/۱۸۰میلی‌گرم بر وزن تر) مربوط به تیمار ۶۰ گرم PEG و کمترین مقدار آن (۰/۰۱۹ میلی‌گرم بر وزن تر) مربوط به ۱۰ میکرومولار آبسزیک‌اسید بود (جدول ۱).

بیشترین مقدار کاروتنوئید (۰/۰۵۴ و ۰/۰۴۷ میلی‌گرم بر وزن تر) مربوط به تیمارهای ۶۰ گرم PEG و ۴۰ گرم ساکارز بود. کمترین مقدار کاروتنوئید (۰/۰۰۳ میلی‌گرم بر وزن تر) مربوط به تیمارهای ۱۰ میکرومولار آبسزیک‌اسید و شش دسی‌زیمنس کلرید سدیم بود (جدول ۱).

بیشترین مقدار آنتوسیانین (۰/۱۸۴ میلی‌گرم بر وزن تر) مربوط به تیمار ۱۰ میکرومولار آبسزیک‌اسید بود که از لحاظ آماری با تیمار چهار دسی‌زیمنس کلرید سدیم تفاوت معنی‌داری نداشت. کمترین مقدار آنتوسیانین مربوط به ۴۰ گرم ساکارز (۰/۰۳۱ میلی‌گرم بر وزن تر) و ۶۰ گرم PEG (۰/۰۳۳ میلی‌گرم بر وزن تر) بود. با افزایش ABA میزان آنتوسیانین کل به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. بیشترین میزان آنتوسیانین در غلظت ۱۰ مایکرومولار ABA مشاهده شد. (جدول ۱).

جدول ۱- تأثیر مواد اسمزی بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی جنین‌های رویشی مارچوبه

Table 1- Effect of osmotic materials on the amount of photosynthetic pigments in asparagus germ embryos

مواد اسمزی Material osmotic	مقدار Counent	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll	کاروتنوئید Carotenoid	آنتوسیانین Anthocyanin
		(میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) (mg g^{-1}FW)				
ساکارز (گرم) Sucrose (g)	40	0.053^{bc}	0.081^{b}	0.136^{b}	0.047^{a}	0.031^{e}
	60	0.028^{d}	0.046^{de}	0.074^{d}	0.021^{cd}	0.069^{d}
پلی‌اتیلن‌گلایکول (گرم) PEG (g)	15	0.039^{cd}	0.062^{cd}	0.110^{bc}	0.031^{b}	0.078^{d}
	30	0.035^{d}	0.042^{e}	0.079^{d}	0.028^{bc}	0.166^{b}
	60	0.077^{a}	0.103^{a}	0.180^{a}	0.054^{a}	0.033^{e}
اسید آبسزیک (میکرومولار) ABA (µM)	5	0.035^{d}	0.078^{bc}	0.094^{cd}	0.019^{de}	0.124^{c}
	10	0.009^{e}	0.010^{f}	0.019^{e}	0.003^{f}	0.184^{a}
نمک (دسی‌زیمنس بر متر) NaCl (dS $m^{-1)}$	4	0.055^{b}	0.007^{f}	0.071^{d}	0.012^{e}	0.173^{ab}
	6	0.056^{b}	0.048^{de}	0.110^{bc}	0.003^{f}	0.078^{d}

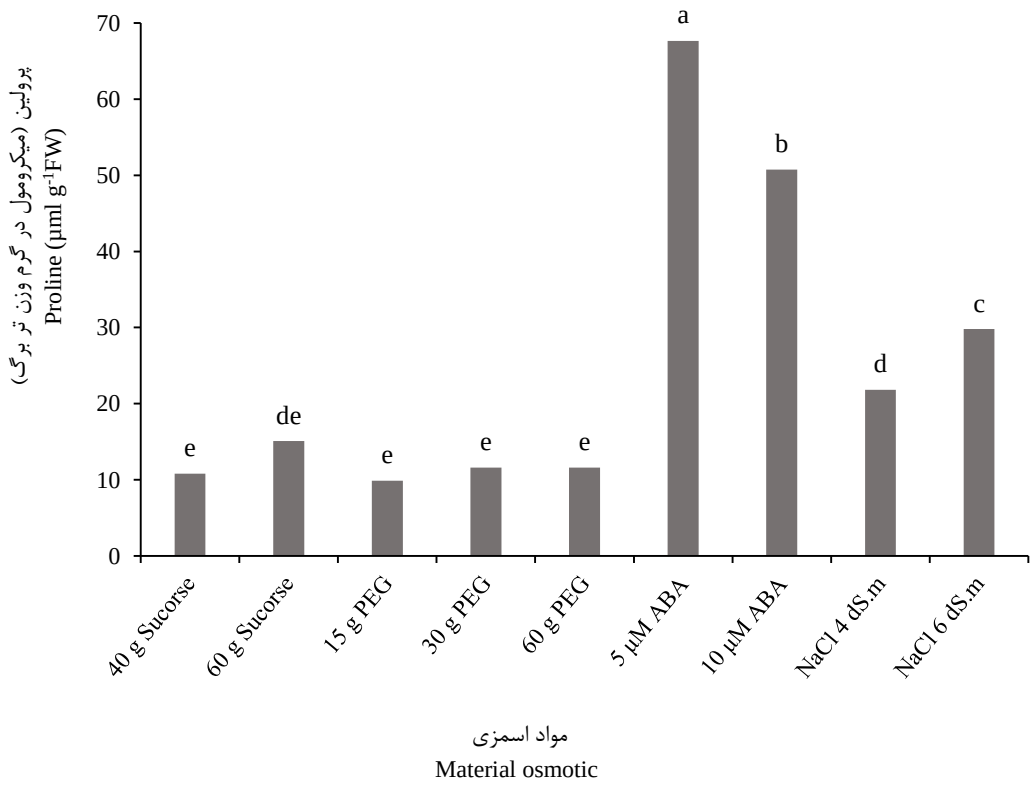
اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی داری بر اساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد ندارند.

Numbers with similar letters do not have a significant difference at the 5% level based on Duncan's test.

گزارش شده است که ABA باعث افزایش سنتز آنتوسیانین در کشت درون شیشه‌ای انگور (*Vitis vinifera* L.) گردید. به‌نظر می‌رسد این ماده در تنظیم ژن‌های دخیل در مسیر سنتز آنتوسیانین، نقش مهمی را ایفا می‌کند (Yan-Lun *et al*., 2016).

بیشترین میزان پرولین (۶۷/۶۶ میکرومول بر گرم وزن تر) مربوط به تیمار پنج میکرومولار آبسیزیک‌اسید بود و کمترین میزان پرولین (۹/۸۸ میکرومول بر گرم وزن تر) مربوط به ۱۵ گرم PEG بود (شکل ۱).

بر اساس نتایج به‌دست آمده، بالاترین تعداد جنین کروی (۳/۱۶ عدد) مربوط به تیمار ۶۰ گرم PEG بود که از لحاظ آماری با تیمار شش دسی‌زیمنس کلرید سدیم (۲/۱۶ عدد) تفاوت معنی‌داری نداشت. بالاترین تعداد جنین دوقطبی (۱۳/۱۶ عدد) مربوط به تیمار شش دسی‌زیمنس کلرید سدیم بود. بعد از آن ۶۰ گرم PEG با ۶/۱۶ عدد بیشترین تعداد جنین دوقطبی را نشان داد (جدول ۲). بیشترین قطر اسپیر مربوط به ۶۰ گرم PEG (۵/۰۳ میلی‌متر)، شش دسی‌زیمنس کلرید سدیم (۴/۳۰ میلی‌متر) و ۴۰ گرم ساکارز (۳/۶۳ میلی‌متر) بود. بیشترین طول اسپیر (۱۹/۶۶ و ۱۸ میلی‌متر) مربوط به ۶۰ و ۱۵ گرم PEG بود (جدول ۲). بالاترین سرعت رشد نسبی جنین در تیمارهای ۱۵ گرم PEG (۱۱/۳۷ میلی‌گرم در روز) و چهار دسی‌زیمنس کلرید سدیم (۱۱/۲۳ میلی‌گرم در روز) مشاهده شد. کمترین سرعت رشد نسبی جنین در ۱۰ میکرومولار آبسزیک‌اسید (۳/۴۷ میلی‌گرم در روز) ثبت شد (جدول ۲).



شکل ۱- تأثیر مواد اسمزی بر مقدار پرولین جنین‌های رویشی مارچوبه

Figure 1- Effect of osmotic substances on the proline content of asparagus embryos

جدول ۲- تأثیر مواد اسمزی بر خصوصیات رویشی جنین‌های رویشی مارچوبه

Table 2- Effect of osmotic materials on the amount of vegetative characteristics in asparagus germ embryos

مواد اسمزی Material osmotic	مقدار Countent	تعداد جنین کروی Globular embryo number	تعداد جنین دوقطبی Bipolar embryo number	قطر اسپیر (میلی‌متر) Spear diameter (mm)	طول اسپیر (میلی‌متر) Spear length (mm)	سرعت رشد نسبی جنین (میلی‌گرم در روز) Embryo relative growth rate (mg day^{-1})
ساکارز (گرم) Sucrose (g)	40	1.16^{b}	4.50^{b}	3.63^{ab}	12.40^{bc}	6.37^{bc}
	60	1.16^{b}	1.83^{b}	1.43c^{d}	7.33^{cd}	6.03^{bc}
پلی‌اتیلن‌گلایکول (گرم) PEG (g)	15	1.16^{b}	4.50^{b}	1.06^{d}	18.00^{ab}	11.37^{a}
	30	2.50^{ab}	6.16^{b}	1.30^{cd}	19.66^{a}	5.53^{bc}
	60	3.16^{a}	1.83^{b}	5.03^{a}	4.23^{d}	6.77^{b}
اسید آبسزیک (میکرومولار) ABA (µM)	5	1.50^{b}	1.50^{b}	2.83^{bc}	2.66^{d}	3.65^{bc}
	10	1.16^{b}	2.83^{b}	1.66^{cd}	1.76^{d}	3.47^{c}
نمک (دسی‌زیمنس بر متر) NaCl (dS m^{-1})	4	1.83^{b}	5.83^{b}	2.76^{bcd}	4.16^{d}	11.23^{a}
	6	2.16^{ab}	13.16^{a}	4.30^{ab}	2.23^{d}	4.13^{bc}

اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی داری بر اساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد ندارند.

Numbers with similar letters do not have a significant difference at the 5% level based on Duncan's test.

اعمال تنش اسمزی در مرحله کوتیلدونی جنین‌های رویشی حاصل از کشت میکروسپور کلزا با استفاده از PEG نشان داد که تجمع زیست‌توده در ژنوتیپ Cadeli بیشتر از ژنوتیپ Viking می‌باشد که نشان‌دهنده مقاومت ژنوتیپ Cadeli به شرایط اسمزی می‌باشد (Urban *et al*., 2021). گزارش شده است که NaCl بر سرعت رشد نسبی کالوس مارچوبه از طریق تجمع انتخابی سدیم تأثیر می‌گذارد. با افزایش شوری تا ۱۰۹/۴ میلی‌مولار سرعت رشد نسبی کالوس مارچوبه روند یکسانی داشته است و با افزایش شوری، سرعت رشد نسبی کاهش یافت (Mousavizadeh *et al*., 2017). در معرض خشکی قرار دادن یک ساعته جنین‌های رویشی هویج (*Daucus carota* L.) سبب افزایش زادآوری جنین‌ها و با افزایش میزان خشکی تعداد تبدیل جنین به گیاهچه کاهش یافت (Sundararajan *et al*., 2019). شاخص عملکرد پیاز به‌عنوان شاخصی مناسب برای غربالگری رقم‌های متحمل به شوری معرفی شده است (Hosseini *et al*., 2020).

منابع کربن در رشد و نمو گیاهان بسیار مهم هستند. ساکارز یکی از این منابع کربن است. در شرایط اسمزی که به‌وسیله ساکارز به جنین اعمال می‌شود، منابع کربن در محیط کشت به‌مقدار قابل‌توجهی افزایش پیدا کرده و میزان تولید پرولین بالا می‌رود. همان‌طور که در شکل ۱ نتایج به‌دست آمده در ۶۰ گرم ساکارز، پرولین بیشترین مقدار را دارد و البته غلظت بالای پرولین در تیمار ۶۰ گرم ساکارز، سبب کاهش کلروفیل کل نیز شده است (جدول ۱). در شرایط تنش‌زا، گیاهان میزان کربوهیدرات خود را با کاهش سرعت انتقال مواد، توقف رشد و افزایش میزان سنتز ساکارز به‌دلیل فعال‌سازی آنزیم ساکارز فسفات سنتاز، افزایش می‌دهند تا با تبدیل کردن آن‌ها به عوامل دفاعی، خود را در برابر شرایط تنش‌زا، مقاوم کنند (Hashemi *et al*., 2018). بیان شده است که سه درصد ساکارز بیشترین تأثیر را در

القای جنین‌زایی هویج دارد (Sundararajan *et al*., 2019). در مطالعه‌ای، غلظت‌های مختلف ساکارز برای باززایی گیاهچه‌های چهار هفته‌ای *Riccia fluitans* L. در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و بیان شد که بیشترین سطح باززایی در محیط MS شامل ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به‌دست آمد که ۷۶/۸۸ درصد بیشتر از شاهد است (Dogan *et al*., 2020).

طبق نتایج به‌دست آمده بیشترین مقدار آنتوسیانین در ۳۰ گرم PEG تولید شد. در شرایط تنش خشکی ، گیاه برگ‌های خود را کاهش داده اما مقدار کلروفیل آن افزایش پیدا می‌کند و کاروتنوئید در تنش خشکی با نقش آنتی‌اکسیدانی خود می‌تواند از گیاه تحت تنش محافظت کند. کاروتنوئیدها از ترکیبات دفاعی هستند که تحت شرایط تنش اثرات رادیکال‌های آزاد اکسیژن را خنثی می‌کنند و به‌عنوان محافظ کلروفیل‌ها نیز عمل می‌کنند (Sircelj *et al*., 2007). طبق نتایج به‌دست آمده بیشترین مقدار کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید متعلق به ۶۰ گرم PEG بر لیتر است که بیشترین مقدار فشار اسمزی را بر جنین اعمال می‌کند.

همان‌طور که شکل ۲ نشان می‌دهد، حضور کلروفیل در جنین‌های رویشی در غلظت ۶۰ (شکل ۱ ف) و به‌خصوص در ۴۰ گرم ساکارز (شکل ۱ ج) قابل‌مشاهده است. یکی از اثرات قندها در محیط کشت جنین‌زایی، اثر آن‌ها بر روی سنتز کلروفیل در سلول‌های نمونه مورد کشت می‌باشد که باعث اتوتروف شدن آن‌ها می‌گردد (Mashayekhi, 2007). جنین‌زایی رویشی تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله ترکیب مواد و عناصر غذایی موجود در محیط‌های کشت مانند قند و ساکارز قرار می‌گیرد. گزارش شده است که در زمان بلوغ جنین‌های رویشی، افزایش ساکارز در محیط باعث افزایش طول جنین‌ها شده و قبل از اینکه در معرض نور قرار گیرند، سبز می‌شوند که این از لحاظ اتوتروف شدن جنین‌ها بسیار مهم است (Jain *et al*., 1995). وجود ارتباط بین وضعیت قند و تشکیل جنین رویشی به اثبات رسیده است به این صورت که افزایش قندهایی چون ساکارز منجر به افزایش پتانسیل جنین‌زایی می‌گردند. قندها دارای عملکرد سیگنالینگ شبه‌هورمونی بوده و به‌عنوان پیام‌رسان اصلی در فرآیندهای انتقال عمل می‌کنند که بسیاری از فرآیندهای مهم را در تمام مراحل چرخه حیات گیاه تنظیم می‌کند. سیگنالینگ قند فرآیندهایی مانند فتوسنتز و متابولیسم مواد مغذی را جهت رشد و ذخیره‌سازی بافت‌ها تنظیم می‌کند (Nowak *et al*., 2004). به‌طور کلی ساکارز در تنظیم فرآیندهای مهم متابولیکی از جمله جذب و انتقال کربن و نیتروژن و پاسخ به آسیب اکسیداتیو نقش اساسی دارد و نقش آن با قندهای دیگر مانند گلوگز جایگزین نمی‌شود (Mousavizadeh *et al*., 2010). نیاز به غلظت بالای کربوهیدرات نه‌تنها به عملکرد تغذیه‌ای ساکارز بلکه به خاصیت آن به‌عنوان تنظیم‌کننده اسمزی نیز مربوط است. با این‌حال، نقش غلظت زیاد قند در جنین‌زایی ممکن است بر پتانسیل اسمزی سلول تأثیر بگذارد. افزایش غلظت ساکارز در محیط ممکن است تنش اسمزی ایجاد کند، اما به رشد جنین‌های رویشی کمک می‌کند (Mashayekhi, 2007). حتی استفاده نکردن از ساکارز در محیط جنین‌زایی گواوا (*Psidium guajava* L.) باعث جلوگیری از تشکیل جنین رویشی می‌شود (Rai *et al*., 2007). به عقیده Neumann (1995) مناسب‌ترین هیدروکربن برای محیط کشت جنین‌زا، ساکارز می‌باشد. محتوای قند محلول، نشاسته و پروتئین در مراحل مختلف جنین‌زایی به‌طور قابل‌توجهی متفاوت است. محتویات قند و نشاسته محلول به‌تدریج با توسعه جنین رویشی کاهش و محتوای پروتئین محلول افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد مواد کربوهیدرات توسط رشد و نمو جنین رویشی مصرف می‌شود در حالی‌که افزایش محتوای پروتئین شرایط مواد را برای بلوغ و جوانه‌زدن جنین‌های رویشی فراهم می‌کند (Wu *et al*., 2021).

در جنین‌های تشکیل در محیط حاوی ۴۰ گرم ساکارز، شکل‌گیری جنین ثانویه (شکل ۲ ج) مشاهده شد. افزایش رشد ریشه‌ها و تولید ریشه‌های موئین در

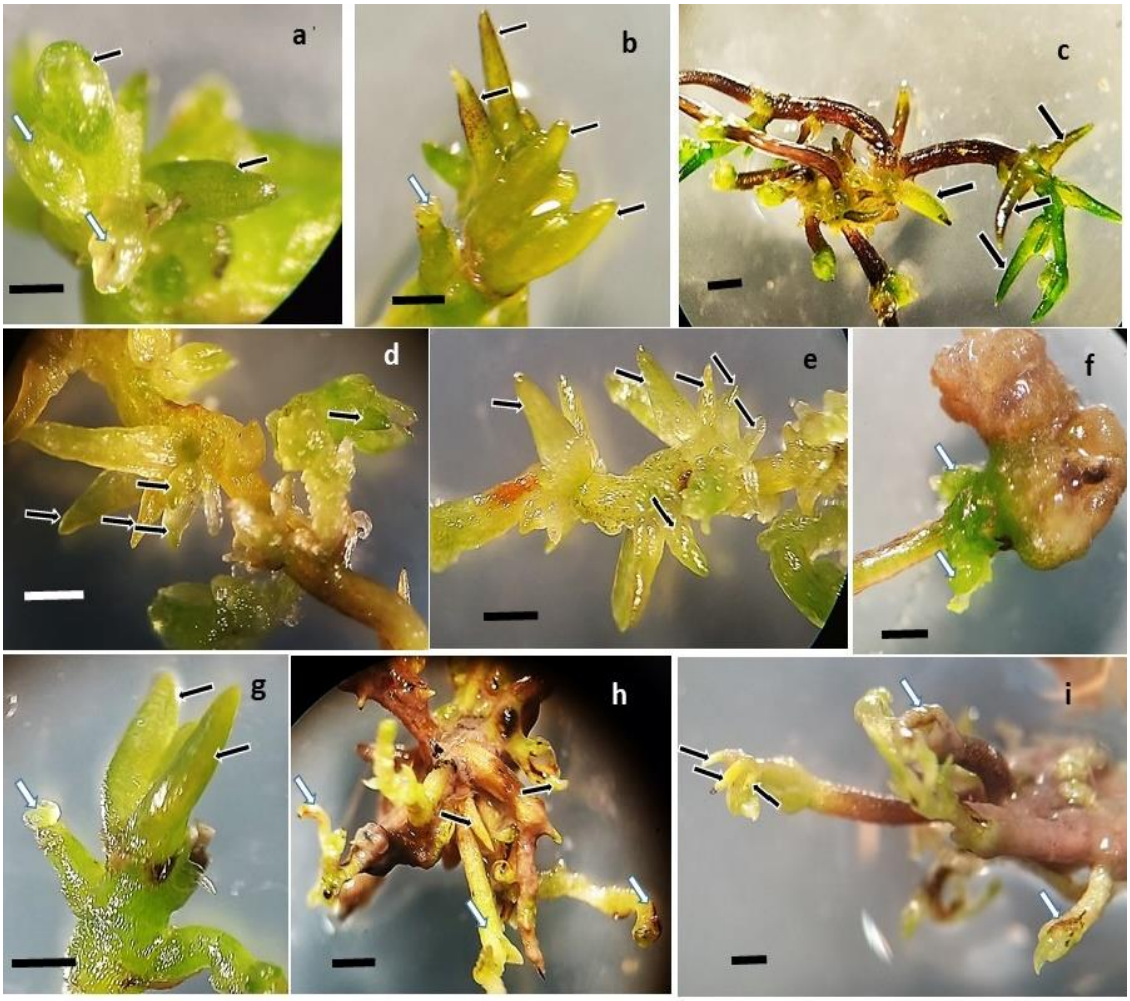
ریزنمونه و بازکشت مکرر مواد جنین‌زا در محیط دارای ساکارز زیاد موجب تشکیل جنین‌های نسل دوم (ثانویه) می‌گردد (Mashayekhi, 2007).

شکل ۲ نشان می‌دهد، جنین‌های توسعه‌یافته، فراوانی جنین‌های دوقطبی و حضور کلروفیل در جنین‌های رویشی در غلظت چهار (شکل ۲ د) و به‌خصوص در شش گرم کلرید سدیم (شکل ۲ ی) قابل‌مشاهده است. نتایج نیز نشان داده است که مقدار کلروفیل در شوری شش دسی‌زیمنس بیشتر از چهار دسی زیمنس می‌باشد (جدول ۱). بیان شده است که کلروفیل نقش ضروری در تنظیم اسمزی در مارچوبه *A. breslerianus* در شرایط تنش شوری دارد. زیرا همبستگی زیادی بین تحمل به نمک و کلروپلاست‌ها وجود دارد. از این‌رو مقدار کلروفیل در گیاهان مقاوم به شوری افزایش یافته است (Madava-Rao *et al*., 2006). مقدار کلروفیل می‌تواند به‌عنوان شاخص حساسیت سلول‌ها در شرایط شوری به‌کار رود. بنابراین کاهش کلروفیل نشان‌دهنده وضعیت سمی بافت‌ها به‌دلیل تجمع سدیم و کلر است (Flowers *et al*., 1977). حتی بر اساس مقدار کلروفیل، مارچوبه گونه *A. breslerianus* به شوری تا سطح ۱۰۹/۴ میلی‌مولار نمک، مقاوم بیان شده است؛ به‌طوری‌که مقدار کلروفیل a، b و کل یک روند کاهشی از ۲۱/۸۸ تا ۴۳/۷۶ میلی‌مولار کلرید سدیم نشان داد و سپس تا سطح ۱۰۹/۴ میلی‌مولار نمک افزایش یافت (Mousavizadeh *et al*., 2017). در محیط درون‌شیشه‌ای نیز واکنش بافت‌های مختلف مارچوبه به صفر تا دو درصد نمک در سیستم کشت بافت توسط Mills (۱۹۸۹) مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های متوسط نمک (۰/۵ تا ۱ درصد) رشد را تحریک کرد و سبب القا تولید فیلوکوئید (phyllocoid) در ریزنمونه‌ها شد. از این‌رو رابطه مثبتی بین فتوسنتز و عملکرد مارچوبه تحت شرایط شوری وجود دارد (Faville *et al*., 1999). در سایر تنش‌ها مانند تنش بی‌کربنات سدیم در آب آبیاری نیز کاهش رنگیزه‌ها، کلروفیل و شاخص سبزینگی اسفناج گزارش شده است و در سطح ۳۰ میلی‌مولار بی‌کربنات کاهش ۳۰ درصدی نرخ فتوسنتز نسبت به گیاهان شاهد ثبت شده است (Bayarash *et al*., 2020).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غلظت‌های بالاتر آبسیزیک‌اسید باعث کاهش جنین‌زایی رویشی مارچوبه شد و فاکتورهای رشدی مانند میزان کلروفیل و سرعت رشد نسبی جنین در مقدار ۱۰ میکرومولار آبسیزیک‌اسید کاهش یافت (جدول ۲). گزارش شده است که غلظت پایین آبسیزیک‌اسید باعث کاهش اثرات منفی تنش خشکی در گندم (*Triticum aestivum* L.) گردیده است (Bano *et al*., 2009). بیشترین سوخ‌دهی سوسن (*Lilium candidum* L.) با یک میکرومولار آبسیزیک‌اسید حاصل شده است (Shimasaki & Fukurnoto, 2013). در آزمایش دیگر Nishiuchi (۲۰۱۲) بیان نمود که با کاربرد هورمون آبسیزیک‌اسید در غلظت یک میکرومولار سوخ‌دهی لاله (*Tulipa gesneriana* L.) نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. در صورتی‌که در غلظت‌های بالای ۵۰ و ۱۰۰ مایکرومولار سوخ‌دهی لاله نسبت به تیمار شاهد کمتر بود. هورمون آبسیزیک‌اسید در غلظت‌های بالاتر به‌دلیل بستن روزنه‌ها و تولید اتیلن خاصیت بازدارندگی دارد ولی در غلظت‌های کم نقش محرک در رشد گیاهچه و رشد ریشه‌های اولیه دارد (Waskiewicz *et al*., 2013). اعمال تنش اسمزی در مرحله کوتیلدونی جنین های رویشی حاصل از کشت میکروسپور کلزا با استفاده از پلی‌اتیلن گلایکول نشان داد که تجمع آبسیزیک‌اسید در گیاهچه‌ها افزایش یافته است که نشان‌دهنده مقاومت به شرایط اسمزی می‌باشد (Urban *et al*., 2021).

نتایج نشان داد که با اعمال آبسیزیک‌اسید، محتوی پرولین جنین افزایش یافت و کمترین میزان پرولین در تیمارهای پلی‌اتیلن گلایکول و ساکارز شاهد مشاهده شد (شکل ۱). گزارش شده است که پرولین به‌عنوان محافظ اسمزی در طول دوره تنش عمل می‌کند و در گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) تحت شرایط تنش محتوای پرولین برگ حدود ۳۰ برابر

حالت عادی بود افزایش پرولین در برگ گیاهان تحت شرایط تنش نشان می‌دهد که پرولین به‌عنوان محافظ اسمزی در طول دوره تنش عمل می‌کند و تجمع پرولین بخشی از پاسخ‌های فیزیولوژیکی به تنش خشکی است (Sharkey & Seemann, 2005). پرولین در تنظیم فشار اسمزی، حفاظت از مولکول‌های پروتیینی و یکپارچگی غشای سلولی، ذخیره کربن و نیتروژن و عمل آنتی‌اکسیدانی نقش دارد (Sharma *et al*., 2006).



شکل ۲- جنین‌های رویشی مارچوبه چهار هفته بعد از قرارگیری در معرض شرایط اسمزی در محیط کشت مایع B5

تشکیل جنین دوقطبی (پیکان سیاه) و توسعه شاخه به‌طور مستقیم از ریزنمونه (پیکان سفید) در محیط‌های حاوی ۶۰ گرم در لیتر پلی‌اتیلن‌گلایکول (a)، پنج (h) و ۱۰ میکرومولار آبسزیک اسید (i)؛ b: تشکیل جنین دوقطبی (پیکان سیاه) در محیط کشت حاوی ۳۰ گرم (b) و ۱۵ گرم در لیتر پلی‌اتیلن گلایکول (c)؛ چهار (d) و شش دسی‌زیمنس بر متر شوری (e)؛ تشکیل جنین کروی (پیکان سفید) در محیط کشت دارای ۶۰ گرم در لیتر ساکارز (f) و تشکیل جنین دوقطبی (پیکان سیاه) و تشکیل جنین ثانویه (پیکان سفید) در محیط کشت دارای ۴۰ گرم در لیتر ساکارز (g). مشاهده کلروفیل در جنین در شکل‌های a، d، e، f، g و مشاهده آنتوسیانین در جنین در شکل‌های b، c، h و i مورد توجه است. مقیاس= ۱ میلی‌متر

Figure 2- Asparagus somatic embryos, four weeks after exposure to osmotic conditions in liquid B5

Bipolar embryo formation (black arrow) and branch development directly from explant (white arrow) in media containing 60 g l^{-1} of PEG (a), five (h) and 10 µM ABA (i); b: formation of bipolar embryo (black arrow) in culture medium containing 30 g (b) and 15 g l^{-1} PEG (c); Four (d) and six dS m^{-1} of salinity (e); Formation of spherical embryo (white arrow) in culture medium containing 60 g l^{-1} sucrose (f) and formation of bipolar embryo (black arrow) and formation of secondary embryo (white arrow) in culture medium containing 40 g l^{-1} sucrose (g). The observation of chlorophyll in the fetus in Figures a, d, e, f, g and the observation of anthocyanin in the fetus in Figures b, c, h and i are of interest. Scale = 1 mm

با افزایش مقدار آبسیزیک‌اسید میزان کلروفیل کاهش یافت. در غلظت پنج میکرومولار از این ماده باعث افزایش محتوی کلروفیل نسبت به غلظت ۱۰ میکرومولار شد (جدول ۱)، بنابراین وجود غلظت کم این

ماده در محیط کشت، باعث تعدیل اثرات تنش اسمزی می‌شود. در راستای نتایج آزمایش حاضر، گزارش شده است که آبسیزیک‌اسید تنها در غلظت‌های پایین باعث افزایش مقدار کلروفیل می‌شود و در غلظت بالا سرعت فتوسنتز و مقدار کلروفیل برگ را کاهش می‌دهد (Zhang *et al*., 2006). کاهش محتوای کلروفیل در تنش اسمزی به‌دلیل کاهش عوامل ضروری برای سنتز کلروفیل و تخریب ساختمان آن‌ها است. علاوه بر این، گزارش شده است که آبسیزیک‌اسید در شرایط تنش خشکی با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌تواند باعث حفظ کلروفیل گیاه شود (Taiz & Zeiger, 2002).

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج مربوط به شرایط اسمزی محیط رشد جنین‌های رویشی مارچوبه بیانگر این بودند که تنش شوری شش دسی‌زیمنس بر متر و ۶۰ گرم پلی‌اتیلن‌گلایکول با کمترین اثر تنش‌زا در مقایسه با ساکارز، بیشترین تأثیر را در بهبود تکامل جنین‌های رویشی مارچوبه داشته است. تیمار آبسیزیک‌اسید در غلظت پنج میکرومولار، سبب افزایش رشد رویشی جنین رویشی مارچوبه گردید. با اعمال غلظت‌های بالای پلی‌اتیلن‌گلایکول به‌دلیل ایجاد فشار اسمزی و حالت تنشی، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش یافته و تخریب ساختمان کلروپلاست اتفاق می‌افتد که در ادامه با ممانعت از بیوسنتز کلروفیل‌های جدید و تبدیل کاروتنوئیدها به سایر رنگدانه‌ها از جمله آنتوسیانین، سبب کاهش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید و افزایش آنتوسیانین شده است. پاسخ‌های درون شیشه‌ای جنین‌های رویشی مارچوبه اکتاپلوئید به افزایش فشار اسمزی محیط کشت با پلی‌اتیلن‌گلایکول، افزایش غلظت کلروفیل و آنتوسیانین می‌باشد. افزایش فشار اسمزی محیط کشت با ساکارز منجر به افزایش پرولین در جنین‌های رویشی گردید. میزان سنتز پرولین با افزایش تنش افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که با افزایش فشار اسمزی میزان سنتز پرولین نیز افزایش یافت که نشانگر تلاش جنین‌های رویشی برای افزایش مقاومت در برابر شرایط تنش‌زا بوده است.

References

- Aguilar, M., Espadas, F., Coello, J., Maust, B., Trejo, C., Robert, M. & Santamaria, J. (2000). The role of abscisic in controlling leaf water loss, survival and growth of micropropagated *Tagetes erecta* plants when transferred directly to the field. *Journal of Experimental Botany*, 51(352), 1861-1866.
- Bano, A., Ullah, F. & Nosheen, A. (2012). Role of absicisic acid and drought stress on the activities of antioxidant enzymes in Wheat. *Plant Soil Environment*, 58(4), 181-185.
- Bates, L. S., Waldern, R. P. & Tear, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil Science*, 39, 205-207.
- Bayarash, M., Raghami, M., Roosta, H. & Karimi, H. (2020). Evaluation of growth, physiological and photosynthetic characteristics of two spinach cultivars (Hybrid and Iranian) under alkaline water stress. *Journal of Vegetables Sciences*, 4(1), 25-39.
- Bittencourt, M. L. C., Dias, D. C. F. S., Dias, L. A. S. & Araujo, E. F. (2004). Effects of priming on asparagus seed germination and vigour under water and temperature stress. *Seed Science & Technology*, 32, 607-616.
- Bolli, R. & Dalmear, S. (2010). Effect of exogenous abscisic acid and drought stress on growth maize. *Plant Physiology*, 99, 762-764.
- Dogan, M. (2020). The effects of different sucrose concentrations on the regeneration area of *Riccia Fluitans* L., a medicinal aquatic plant. *Journal of Engineering Technology and Applied Sciences*, 5(2), 51-58.
- Fanourakis, D., Bouranis, D., Giday, H., Carvalho, D. R., Nejad, A. R. & Ottosen,

C. O. (2016). Improving stomatal functioning at elevated growth air humidity: a review. *Journal of Plant Physiology*, 207, 51-60.
- Faville, M.J., Silvester, W. B., Green, T. G. A. & Jermyn, W. A. (1999). Photosynthetic characteristics of three asparagus cultivars differing in yield. *Crop Science*, 39, 1070-1077.
- Flowers, T. J., Troke, P. F. & Yeo, A. R. (1977). The mechanisms of salt tolerance in halophytes. *Annual Review Plant Physiology*, 28, 89-121.
- Gamburg, O. L., Miller, R. A. & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Response*, 50, 151-158.
- Giday, H., Fanourakis, D., Kjaer, K. H., Fomsgaard, I. S. & Ottosen, C. O. (2014). Threshold response of stomatal closing ability to leaf abscisic acid concentration during growth. *Journal of Experimental Botany*, 65, 4361-4370.
- Hashemi, E. Fakheri, B. MahdiNezhad, N. & Mohammadpour Vashvaei, R. (2018). Effects of nano and nano bio-fertilizer on physiological, biochemical characteristics and yield of roselle (*Hibisicus sabdariffa* L.) under drought stress. *Agricultural Crops Production*, 20, 1, 45-66.
- Hosseini, Z., Zare Bavani, M. & Zare, A. (2020). Investigation of salinity Tolerance in Onion (*Allium cepa* L.) cultivars using stress tolerance indices. *Journal of Vegetables Sciences*, 3(2), 43-61. (In Farsi)
- Jain, M. S. Gupta, P. K. & Newton, R. J. (1995). Somatic embryogenesis in woody Plants. *Kluwer Academic Publishers*, 1, 253-263.
- John J. F. & Jones, M. L. (2010). Abscisic acid application enhances drought stress tolerance in bedding plants. *Horticultural Science*, 45(3), 409-413.
- Khalid, K. A., da Silva, J. A. T. & Cai, W. (2010). Water deficit and polyethylene glycol 6000 affects morphological and biochemical characters of *Pelargonium odoratissimum* (L.). *Scientia Horticulturea*, 125, 159-166.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotinoids. Pigments of photosynthetic membranes. *Method Enzye*, 148, 350-382
- Madava-Rao, K.V., Raghavendra, A. S. & Janardhan-Reddy, K. (2006). Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. Springer. 345 p.
- Mashyekhi, K. (2007). Plant Somatic Embryogenesis. Makhtomgholi Fraghi (Sarli) press. 488 P. (In Farsi)
- Memon, A. A., Raza, A., Palijo, S., Wenqian, X. & Xueyan, X. (2019). Effect of carbon sources and their various concentrations for optimize in in vitro micro propagation of banana (*Musa* spp.) Basrai. *International Journal of Environment Agriculture and Biotechnology*, 4(4), 1108-1115.
- Mills, D. (1989). Differential response of various tissues of *Asparagus officinalis* to sodium chloride. *Journal of Experimental Botany*, 40(4), 485-491.
- Mousavizadeh, S. J., Mashayekhi, K., Hemmati, K. & Kamkar, B. (2010). Evaluation of media elements and materials on petiole somatic embryogenesis of Carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Plant Production*, 17(1), 1-21. (In Farsi)
- Mousavizadeh, S. J., Hassandokht, M. R. & Kashi, A. (2015). Multivariate analysis of edible Asparagus species in Iran by morphological characters. *Euphytica*, 206, 445-457.
- Mousavizadeh, S. J., Hassandokht, M. R., Kashi, A., Gil, J., Cabrera, A. & Moreno, R. (2016). Physical mapping of 5S and 45S rDNA genes and ploidy levels of Iranian *Asparagus* species. *Scientia Horticulturae*, 211(4), 269-276.
- Mousavizadeh, S., Mashayekhi, K. & Hassandokht, M. R. (2017a). Indirect somatic embryogenesis on rare octoploid *Asparagus breslerianus* plants. *Scientia*

Horticulturae, 226, 184-190.
- Mousavizadeh, S. J., Hassandokht, M. R. & Kashi, A. (2017b). *In vitro* response of *Asparagus breslerianus* to NaCl. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 2, 153-163.
- Neumann, K. H. (1995). Pflanzliche zell and gewebekulturen. Verlag Eugen Ulmer. 304 p.
- Nishiuchi, Y. (2012). Multiplication of tulip bulb by tissue culture In-vitro. *Acta Horticulture*, 177, 56-69.
- Nowakn, B., Miczynski, K. & Hudy, L. (2004). Sugar up take and utilization during adventitious buds differentiation on in vitro leaf explants of Wegirka Zwyka plum (*Prunus domestica*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 76, 255-260.
- Rai, M. K., Akhtar, N. & Jaiswal, V. S. (2007). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. *Scientia Horticulture*, 113(2), 129-133.
- Rock, C. D. & Quatrano, R. S. (1995). Plant hormones physiology, Biochemistry and Molecular Biology. The Netherlands. Kluwer Acad. Publish. 611pp.
- Salma, U. K, Khatun, F., Bhuiyan, M. J. H., Yasmin, S. & Khan, T. H .(2016). *In vitro* screening for drought tolerance of some chickpea varieties in Bangladesh. *Agriculture & Progress*, 27(2), 110-118.
- Shah, S. H., Wainwright, S. J. & Merrett, M. J. (1990). The interaction of sodium and calcium chlorides and light on growth, potassium nutrition, and proline accumulation in callus cultures of Medicago sativa L. *New Phytological*, 116, 37-45.
- Sharkey, T. D. & Seemann, J. R. (2005). Mild water stress effect on carbon-reduction-cycle intermediates, Ribulose Bisphosphate Carboxylase activity, and spatial homogeneity of photosynthesis in intact leaves. *Plant Physiology*, 89, 1060-1065.
- Sharma, N., Abrams, S. R. & Waterer, D. R. (2006). Evaluation of abscisic acid analogs as holding agents for bedding plant seedlings. *Horticulture Tech*nology, 16, 71-77.
- Shimasaki, K., and Fukurnoto, Y. (2013). *In-vitro* bulbing in *Lilium x formolongi* hort seedlings. XXV *International Horticulture Congress*, 520-536.
- Sircelj, H., Tausz, M., Grill, D. & Batic, F. (2007). Detecting different levels of drought stress in apple trees (*Malus domestica* Borkh.) with selected biochemical and physiological parameters. *Scientia Horticulturae*, 113, 362-369.
- Sundararajan, S., Nayeem, S., Subiramani, S., Venkatesh, R. & Sathishkumar, R. (2019). Optimizing culture conditions for high frequency somatic embryogenesis and plantlet conversion in (*Daucus carota L*). *Biologia*, 74, 695-707.
- Taiz, L. & Zeiger, E .(2002). Plant Physiology, Sinauer Associates; 3 edition, 690 p.
- Urban, M. O., Planchon, S., Hostickova, I., Vankova, R., Dobrev, P., Renaut, J., Klima, M. & Vitamvas, P. (2021). The resistance of oilseed rape microspore-derived embryos to osmotic stress is associated with the accumulation of energy metabolism proteins, redox homeostasis, higher abscisic acid, and cytokinin contents. *Frontiers in Plant Science*, 12, 628167.
- Wanger, G. J. (1979). Content and vacuole/extra vacuole distribution of netural sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplasts. *Plant Physiology*, 64, 88-93.
- Waskiewicz, A., Beszterda, M. & Golinski, P. (2013). ABA: Role in plant signaling under salt stress. *Salt Stress in Plants*, 175-196
- Wu, G., Wei, X., Wang, X. & Wei, Y. (2021). Changes in biochemistry and histochemical characteristics during somatic embryogenesis in *Ormosia henryi* Prain. *Plant Cell, Tissue and*

B. & Qingzhang, X. (2003). Effect of abscisic acid on drought responses of *Kentucky bluegrass*. *American Society of Horticultural Sciences*, 128(1), 36-41.

- Zhang, J., Jia, W., Yang, J. & Ismail, A. M. (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crop Research*, 97, 111-119.

Organ Culture, 144(3), 505-517.

- Yan-Lun, J., Min, L., Hui, Z., Jiang-Fei M. & Yu-Lin F. (2016). Effect of exogenous abscisic acid and aethyl aasmonate on anthocyanin aomposition, fatty acids, and volatile compounds of cabernet sauvignon (*Vitis vinifera* L.) grape berries. *Molecul*, 21, 2-15
- Zeevart, J. A. D., Zhaolong, W., Huang,